



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Limitación de nitrógeno en la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*:
gotas lipídicas y perfil de expresión de genes de la vía de síntesis de
lípidos neutros

T É S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Biól. Alberto Zamora Bello

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

Ciudad de México, septiembre 2023



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.

ZAMORA BELLO ALBERTO
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria de **julio de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Limitación de nitrógeno en la levadura Rhodotorula mucilaginosa: gotas lipídicas y perfil de expresión de genes de la vía de síntesis de lípidos neutros**", dirigida por el/la Dr(a). **GONZÁLEZ FLORES JAMES ENRIQUE**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PEÑA DÍAZ ANTONIO	PMDCBQ	PRESIDENTE
URIBE CARVAJAL SALVADOR	PMDCBQ	SECRETARIO
GAVILANES-RUIZ RUÍZ MARINA	PMDCBQ	VOCAL
PERAZA REYES CARLOS LEONARDO	PMDCBQ	VOCAL
SERVIN GONZALEZ LUIS	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de julio de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Reconocimientos

El trabajo de esta tesis de maestría se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Tutor Principal: Dr. James Enrique Gonzalez Flores, Facultad de Ciencias, UNAM.

Comité tutor: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Facultad de Medicina, UNAM.

Comité tutor: Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho, Facultad de Ciencias, UNAM.

Se reconoce el apoyo otorgado por la Dra. Claudia Segal Kischinevzky, Dra. Lucero Romero Aguilar, Q. Oscar Iván Luqueño Bocado, Dra. Nayeli Torres Ramírez, Dra. Rosario Ortiz Hernández, y el Dr. Jose Carlos Campero Basaldua. Su participación y asesoría fueron cruciales para diseñar y concluir varios experimentos esenciales. A la Q. Viviana Escobar Sánchez por su apoyo técnico en el laboratorio a lo largo de todo este trabajo. A la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch por los protocolos de crecimiento. Se reconoce la asistencia secretarial y el apoyo constante de Raquel Chávez Chávez Núñez.

Agradezco al Dr. Marcelo Enrique Baeza Cancino por donar la cepa *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9 al laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias UNAM, lo cual permitió el desarrollo del trabajo presente.

El trabajo realizado se financió por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, donativo PAPIIT IA208820, IA204923 y IN225320. Durante el desarrollo de este proyecto se recibió una beca de maestría otorgada por el CONACyT, número de CVU 1086350. Se reconoce el apoyo del Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Agradezco igualmente a los miembros del jurado de grado conformado por el Dr. Antonio Peña Díaz, el Dr. Salvador Uribe Carvajal, la Dra. Marina Gavilanes-Ruíz Ruíz, el Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes y el Dr. Luis Servín González, por la revisión y sus valiosos comentarios y correcciones para este trabajo de tesis.

Agradecimientos

Antes que a nadie, a mi mamá y a mi familia. Su apoyo a través de estos años me mantuvo firme en el camino a pesar de todo.

Al grupo del laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias. A James, Claudia y Viviana. Gracias por haberme brindado su apoyo, conocimiento y experiencia. A mis compañeros, Miguel y Diana, que en el peor de los casos fueron amena compañía, en el mejor de los casos mis amigos.

A una gran cantidad de personas que se involucraron directa o indirectamente en el trabajo de esta tesis, así como a aquellas que me apoyaron personalmente.

*“Light the fuel
Propagate oxygen and heat
Deify motor spirit
Kiss goodbye the weak”*

King Gizzard and the Lizard Wizard

Contenidos

Resumen	VI
Lista de Abreviaturas	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tablas	IX
1 Introducción	1
1.1 Oleoquímicos y biocombustibles	1
1.2 Adapatación al frío y síntesis de lípidos	3
1.3 La lipogénesis en las levaduras y otros eucariotas	4
1.3.1 Acetil-CoA: ATP citrato liasa y Acetil CoA carboxilasa	4
1.3.2 La acetil-CoA carboxilasa y el complejo de Sintetas de ácidos grasos	6
1.3.3 De los ácidos grasos a los triglicéridos	7
1.4 Administración y manejo de los lípidos	10
1.5 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12
2 Planteamiento del problema	14
3 Hipótesis	15
4 Objetivos	16
5 Materiales y Métodos	17
5.1 Origen de la cepa	17
5.2 Cultivos de <i>R. mucilaginosa</i>	17
5.3 Curvas de crecimiento	18
5.4 Cuantificación de biomasa	18
5.5 Microscopía electrónica de transmisión	19
5.6 Extracción de DNA	19

5.7	Extracción de RNA total	20
5.8	Búsqueda de genes involucrados en la síntesis de lípidos	20
5.9	Construcción de la base de datos local para realizar búsquedas y alineamientos	21
5.10	Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR	21
5.11	Cuantificación de mRNA mediante RT-qPCR	21
5.12	Extracción y cuantificación de TAGs	22
5.13	Modelado de homología	22
6	Resultados y Discusión	26
6.1	La disponibilidad de nitrógeno afecta el crecimiento y la acumulación de biomasa	26
6.2	La limitación de nitrógeno es una condición lipogénica para <i>R. mucilaginosa</i>	27
6.2.1	La acumulación de gotas lipídicas depende la disponibilidad de nitrógeno	27
6.2.2	La acumulación de TAGs correlaciona con la disminución de nitrógeno	32
6.3	Búsqueda de secuencias de algunos genes de la vía de la lipogénesis en <i>R. mucilaginosa</i>	33
6.3.1	Búsqueda de secuencias en una base local	33
6.3.2	Análisis de secuencias utilizando la plataforma Mycocosm	35
6.3.3	Modelado de secuencias con SWISS-Model	38
	Modelado de AclY (ATP Citrato Liasa)	38
	Modelado de Acc1 (Acetil-CoA Carboxilasa)	39
	Modelado de Fas1 y Fas2 (Ácido graso sintasa 1 y Ácido graso sintasa 2)	41
	Modelado de Pah1 (Ácido fosfatídico fosfatasa)	42
	Modelado de Dga1 (Diacilglicerol-O-aciltransferasa)	44
6.4	La limitación de nitrógeno favorece la expresión de algunos genes de la lipogénesis	45
7	Conclusiones	52
8	Perspectivas	53
	Referencias	54
	Anexos	67

Resumen

Rhodotorula mucilaginosa M94C9 es una levadura oleaginosa aislada del suelo antártico y considerada poliextremotolerante que crece en condiciones extremas de temperatura, alta osmolaridad, alta salinidad y oligotrofia. Esta levadura es capaz de acumular grandes cantidades de lípidos, en respuesta a factores de estrés nutricional como la limitación de nitrógeno usando glucosa como fuente de carbono. Bajo estas condiciones, la mayoría de las levaduras oleaginosas canalizan el flujo de carbono hacia la biosíntesis de triacilgliceroles (TAGs) a través de algunas enzimas como la ATP-citrato liasa (Acy), la acetil-CoA carboxilasa (Acc1), las ácido graso sintasas 1 y 2 (Fas1 y Fas2), la fosfatidato fosfatasa (Pah1) y la diacilglicerol aciltransferasa (Dga1). Sin embargo, los estudios de biosíntesis de lípidos en *R. mucilaginosa* a nivel molecular son escasos, debido a que la mayoría de los genes implicados en la lipogénesis no han sido completamente identificados en el genoma. Este estudio caracterizó el efecto de la limitación de nitrógeno en la levadura antártica *R. mucilaginosa* M94C9 y analizó el perfil de expresión de seis genes involucrados en la síntesis de lípidos neutros. Para ello, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno se evaluó el crecimiento, la biomasa, la producción de TAGs, la formación de gotas lipídicas (LDs), y se midió la expresión de seis genes que participan en la lipogénesis. Se observó que el crecimiento y la producción de biomasa depende de la disponibilidad de nitrógeno, y que la mayor acumulación de TAGs ocurre en condiciones de inanición de nitrógeno. Además, se encontró un incremento de tamaño de las LDs durante la fase estacionaria en cualquier medio, siendo más evidente en las condiciones de limitación de nitrógeno. Posteriormente, se identificaron los marcos de lectura abiertos de los genes *RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1*, *RmFAS2*, *RmPAH1* y *RmDGA1* y se determinó su perfil de expresión en diferentes condiciones de limitación de nitrógeno. Los análisis de expresión génica durante la fase exponencial nos sugieren que *RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1* y *RmFAS2* tienen regulación positiva, mientras que *RmPAH1* y *RmDGA1* (los últimos de la vía) están regulados de manera negativa. Por lo tanto, es posible que la regulación negativa de *RmPAH1* y *RmDGA1* limite la lipogénesis durante el crecimiento exponencial. Aparentemente, la expresión de *RmPAH1* y *RmDGA1* durante la fase estacionaria permite la redirección del metabolismo del carbono hacia la producción de TAGs o lípidos neutros. Este estudio es uno de los primeros análisis que comprende la síntesis de TAGs o lípidos neutros e identifica algunos ORFs de genes de la lipogénesis en *R. mucilaginosa*, lo cual puede ser aplicado en un futuro en la industria de los oleoquímicos.

Lista de Abreviaturas

<i>ACLY</i>	Gen que codifica a la ATP citrato liasa
<i>ACC1</i>	Gen que codifica a la acetil-CoA Carboxilasa
<i>FAS1</i>	Gen que codifica a la ácido graso sintasa 1
<i>FAS2</i>	Gen que codifica a la ácido graso sintasa 2
<i>DGA1</i>	Gen que codifica a la diacilglicerol-O-aciltransferasa
<i>PAH1</i>	Gen que codifica a la ácido fosfatídico fosfatasa
Acly	ATP Citrato Liasa
Acc1	Acetil-CoA Carboxilasa
Fas1	Ácido Graso Sintasa 1
Fas2	Ácido Graso Sintasa 2
Dga1	Diacilglicerol-O-aciltransferasa
Pah1	Ácido fosfatídico fosfatasa
LDs	Gotas lipídicas
RE	Retículo Endoplasmático
FAs	Ácidos grasos
TAGs	Triglicéridos
DAGs	Diglicéridos
Sct1	G3P aciltransferasa
LPA	Ácido lisofosfatídico
PA	Ácido fosfatídico
UV	Ultravioleta
Slc1	Ácido lisofosfatídico acil transferasa
G3P	Glicerol 3-fosfato
<i>OD</i> ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
MM	Medio mínimo
DEPC	Dietilpirocarbonato
TES	Tris-HCl/EDTA/SDS
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose
PDB	Protein Data Base (siglas en inglés)
RMSD	Raíz del error cuadrático medio (siglas en inglés)
AMP	Adenosín monofosfato
IMP	Inosina 5-monofosfato
mRNA	RNA mensajero

Lista de Figuras

Figura 1. Producción de ésteres de ácidos grasos a partir de la transesterificación de TAGs.

Figura 2. Esquema representativo de la vía general de síntesis de TAGs en levaduras oleaginosas.

Figura 3. Síntesis de TAGs y carotenoides.

Figura 4. Crecimiento y acumulación de biomasa de *R. mucilaginosa* en cultivos con distintas proporciones de carbono y nitrógeno.

Figura 5. Observación de cambios ultraestructurales en *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno mediante TEM tras 18 h de cultivo.

Figura 6. Observación de cambios ultraestructurales en *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno mediante TEM tras 48 h de cultivo.

Figura 7. Cuantificación de TAGs de *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de C/N y C.

Figura 8. Comparación entre el modelo 3D de Acly predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Acly de *H. sapiens*.

Figura 9. Comparación entre el modelo 3D de Acc1 predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Acc1 de *S. cerevisiae*.

Figura 10. Comparación entre el modelo 3D de Fas1 y Fas2 predichos por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Fas1 y Fas2 de *S. cerevisiae*.

Figura 11. Comparación entre el modelo 3D de Pah1 predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Pah1 de *T. thermophila*.

Figura 12. Evaluación de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos que se utilizaron para medir la expresión de genes de la vía de síntesis de lípidos mediante curva estándar por PCR cuantitativo utilizando diluciones seriadas de DNA genómico de *R. mucilaginosa*.

Figura 13. Análisis RT-qPCR de genes relacionados con la lipogénesis de *R. mucilaginosa* en diferentes condiciones en medio rico o limitación de nitrógeno.

Figura 14. Esquema representativo de la expresión relativa y el hipotético estado metabólico de *R. mucilaginosa* durante 18 h de crecimiento.

Lista de Tablas

Tabla 1. Componentes utilizados en los medios de cultivo.

Tabla 2. Identificación y comparación de genes ortólogos que codifican proteínas que participan en las vías de biosíntesis de lípidos en *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* y *Rhodotorula* sp.

Tabla 3. Especies y cepas de levaduras utilizadas en la construcción de la base de datos local para realizar búsquedas y alineamientos.

Tabla 4. Especies de levaduras, cepas, genes y ORFs utilizados en el análisis de BLAST contra la base de datos local.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos para amplificar los transcritos de los genes descritos en *R. mucilaginosa*.*.

Tabla 6. Identidad y cobertura de los alineamientos de los genes de interés de distintas levaduras contra la base local del genoma de *R. mucilaginosa*.*.

Tabla 7. Identidad de las secuencias de aminoácidos de *R. mucilaginosa** de los genes involucrados en la biosíntesis de lípidos en otras levaduras como *R. toruloides**, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*.

Tabla 8. Estructuras cristalizadas de las distintas proteínas utilizadas para el modelado por homología en SWISS-Model. RMSD= Raíz de la desviación estándar cuadrática media.

1. Introducción

1.1. Oleoquímicos y biocombustibles

Los oleoquímicos son derivados químicos de aceites y grasas de animales y plantas. Usualmente, los oleoquímicos básicos son los ácidos grasos y el glicerol, los cuales permiten la formación de muchos otros derivados, como ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos, entre otros (Behr & Seidensticker, 2020). Estos químicos son materiales de gran importancia y demanda en diversas industrias a nivel mundial. Durante la primera década de este siglo, entre 80 y 81 % de la producción de aceites a nivel mundial eran para consumo humano, aproximadamente 14 % para uso industrial y de 5 a 6 % para forraje (Metzger & Bornscheuer, 2006). Dentro de los usos que han incrementado la demanda reciente de oleoquímicos se encuentra la producción de biocombustibles, pues los metil ésteres de ácidos grasos han cobrado un nuevo uso en años recientes como combustibles líquidos (Yang, 2006).

Los biocombustibles son combustibles alternativos a los combustibles fósiles y son obtenidos de fuentes biológicas y renovables. Usualmente se distinguen cuatro formas de biocombustibles: (i) biocombustibles primarios (aquellos que provienen de fuentes biológicas y se consumen directamente, como la madera), (ii) biocombustibles de primera generación (producidos a partir de plantas de consumo alimenticio como el maíz), (iii) de segunda generación (producidos a partir de partes no comestibles de las plantas como hojas, tallos y desechos de su cosecha), y (iv) de tercera generación (aquellos cuya producción no requiere de productos vegetales y hace uso de otras fuentes biológicas como algas, levaduras o bacterias) (Dahman, Syed y col., 2019). Uno de los biocombustibles en mayor demanda es el biodiésel, el cuál consiste principalmente de mono-alkil ésteres de ácidos grasos de cadena larga (Dahman, Syed y col., 2019).

El uso de biocombustibles primarios se remonta probablemente un millón de años (Berna y col., 2012), mientras que el uso de biocombustibles de primera generación como combustibles viables en motores modernos se remonta a principios del siglo XX, cuando los motores Diesel presentados en la exposición de París de 1900 utilizaban aceites de distintos orígenes, incluyendo aceites minerales o el aceite de cacahuete (Knothe, 2010). Se espera que el incremento de la demanda energética mundial aumente debido al crecimiento poblacional (Dahman, Dignan y col., 2019). Por lo que la

investigación de fuentes alternativas y renovables de combustibles ha cobrado una enorme importancia a nivel mundial. En el caso del biodiesel, la producción mundial aumentó casi 5 veces entre los años 2005 a 2010, de 3.9 a 18.1 mil millones de litros, con proyecciones para el año 2025 de más de 41.4 mil millones de litros (Rouhany & Montgomery, 2019).

En el caso de los biocombustibles, el aumento en su demanda se debe principalmente a que son una alternativa viable a los combustibles fósiles con beneficios ambientales inmediatos como la reducción de emisiones de gas de efecto invernadero y la sostenibilidad de su producción. Distintos análisis del ciclo de vida del biodiesel han demostrado que su uso resulta en 60 a 94% menos emisiones de gases de efecto invernadero (Araújo y col., 2017).

El uso de fuentes renovables de combustibles como el biodiesel tiene la ventaja de permitir el reemplazo a largo plazo de los combustibles fósiles, reduciendo su impacto climático debido a que la materia prima utilizada es prácticamente carbono neutral. Sin embargo, el mayor obstáculo en la adopción de los biocombustibles como fuentes energéticas principales sigue siendo la logística involucrada en su producción, procesamiento y transporte (Behr & Seidensticker, 2020).

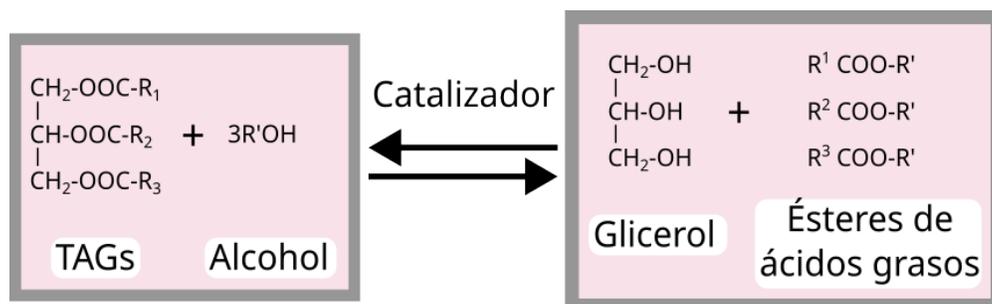


Figura 1: Producción de ésteres de ácidos grasos a partir de la transesterificación de TAGs. Los ésteres de ácidos grasos producidos son metil ésteres o etil ésteres de ácidos grasos, dependiendo del alcohol utilizado en la reacción de transesterificación.

La producción de biocombustibles, tales como biodiésel, a partir de lípidos de origen microbiano, se lleva a cabo a partir de la transesterificación de los triglicéridos (TAGs) con un alcohol de cadena corta, usualmente metanol debido a su bajo costo y facilidad de purificación en comparación al etanol (Dahman, Dignan y col., 2019). La reacción es llevada a cabo con la adición de un catalizador que puede ser ácido o básico (peróxido de sodio o peróxido de potasio, así como metoxilato de sodio) e implica el paso de TAGs a diglicéridos (DAGs), de DAGs a monoglicéridos y finalmente la

formación de glicerol, de forma que el producto final son ésteres de ácidos grasos (**Figura 1**) (Mishra & Goswami, 2017). Este proceso requiere el control de distintos factores, tales como la temperatura (la reacción se lleva a cabo aproximadamente a 60 °C), la presencia de agua en el alcohol o los triglicéridos y la mínima presencia de ácidos grasos, de forma que se evite la saponificación. Ante esto, recientemente se ha hecho uso de catalizadores enzimáticos que puedan evitar estos problemas, reduciendo costos (Bohlouli & Mahdavian, 2021). Por estos motivos la investigación para mejorar la producción de biocombustibles y otros oleoquímicos se ha enfocado en el uso de microorganismos como algas o levaduras. Debido a que pueden utilizar de manera eficiente materias primas de diversas calidades y composiciones en la producción de oleoquímicos con potencial en la industria (Sitepu y col., 2014; Spagnuolo y col., 2019).

1.2. Adaptación al frío y síntesis de lípidos

Alrededor del 80 % de la biósfera del planeta Tierra se encuentra en ambientes de frío permanente, con temperaturas por debajo de los 5 °C, incluyendo desde los océanos o las regiones polares, hasta la estratósfera e incluso ambientes fabricados por el ser humano. Junto con factores como la disponibilidad de agua o nutrientes, la presión atmosférica, la radiación ultravioleta y la salinidad, estas temperaturas usualmente presentan una limitante para el desarrollo de la vida (De Maayer y col., 2014).

Debido a las propiedades fisicoquímicas del agua, las bajas temperaturas suelen tener un efecto negativo en la integridad celular. Como consecuencia de la deshidratación o la congelación intracelular, la fluidez membranal se ve alterada a la par de un desbalance osmótico en la célula. Esto tiene repercusiones tanto en su capacidad para mantener las reacciones bioquímicas necesarias para su funcionamiento correcto, al verse reducida la afinidad por los substratos de las enzimas metabólicamente necesarias, como en la capacidad de captación de substratos orgánicos o inorgánicos, lo cual reduce la actividad enzimática (Rodrigues & Tiedje, 2008). Otros efectos incluyen la formación de estructuras secundarias de RNA o la disminución del transporte proteico, lo cual lleva a un incremento en la acumulación de proteínas mal plegadas (Schade y col., 2004). En este contexto, la respuesta a bajas temperaturas se da a través de la acumulación de sustancias como la trehalosa y el

glicerol, o la producción de proteínas de choque frío (CSP, por sus siglas en inglés), involucradas en la transcripción y traducción, tales como Nsr1, una proteína encargada de la síntesis de ribosomas en condiciones de estrés (Kondo y col., 1992).

Así mismo, la producción de ácidos grasos insaturados y sus respectivos fosfolípidos insaturados es otra respuesta adaptativa de la célula, de manera que le es posible mantener la homeostasis membranal en un ambiente hostil. En este caso, la célula mantiene sus funciones habituales al afinar la composición de la membrana (Gunde-Cimerman y col., 2014). En microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* esta respuesta se da a través de inducir la producción de ácidos grasos insaturados, producto de desaturasas y deshidratasas de ácidos grasos, lo cual aumenta la proporción entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados (Al-Fageeh & Smales, 2006).

Las levaduras suelen obtener lípidos a través de tres vías: (i) la captación de ácidos grasos (FAs) exógenos, (ii) mediante el recambio lipídico, o (iii) la síntesis *de novo* (lipogénesis). Esta última vía, la síntesis *de novo*, es considerada la más importante, pues es la principal fuente de ácidos grasos en levaduras (Tehlivets y col., 2007).

1.3. La lipogénesis en las levaduras y otros eucariotas

1.3.1. Acetil-CoA: ATP citrato liasa y Acetil CoA carboxilasa

La acetil-CoA es una molécula de suma importancia para la célula pues se encuentra involucrada en distintos procesos, como la glucólisis, la lipogénesis, la síntesis de terpenoides y la acetilación de histonas (Wellen y col., 2009). Su origen puede ser de reservas mitocondriales, peroxisomales, núcleo-citosólicas o intrarreticulares, y es a través de la concentración de este compuesto que se lleva a cabo la regulación de una gran variedad de procesos celulares (Pietrocola y col., 2015).

En la síntesis de FAs, la poza de acetil-CoA núcleo-citosólico es la fuente más importante. En levaduras oleaginosas se obtiene a partir de la descarboxilación del piruvato en la mitocondria y su transporte al citosol como citrato (**Figura 2**) mientras que en levaduras no oleaginosas como *S. cerevisiae*, se obtiene principalmente a partir de la glucólisis (Fakas, 2017). Sin embargo, esta vía de síntesis de acetil-CoA no es la única, y se ha reportado la existencia de vías alternas de su síntesis, tanto en el citosol (a partir de fosfoenol piruvato, malato, lactato o acetato), en la mitocondria

y los peroxisomas (la beta oxidación de los ácidos grasos), o como producto de la degradación de la leucina, lisina o glutaril-CoA (Vorapreeda y col., 2012). En *R. azoricum*, se ha mostrado la posibilidad de desacoplar e incrementar la producción de lípidos mediante la inanición de nitrógeno a partir del uso de una fuente alterna de acetil-CoA citosólico gracias a la sobre expresión de fosfoacetolasas y la introducción de una fosfotransacetilasa bacteriana (Donzella y col., 2019)

En la levadura no oleaginosa *S. cerevisiae*, la principal fuente de acetil-CoA proviene de las sintetasas Acs1 y Acs2, que generan acetil-CoA a partir de la acetilación de coenzima A (Fakas, 2017). Ambas enzimas son importantes debido a que la acetil-CoA que producen se utiliza para la acetilación de las histonas (Takahashi y col., 2006). Además de que el gen *ACS2*, en su secuencia promotora, contiene elementos de activación compartidos con otros genes involucrados en la vía de síntesis de triacilgliceroles (TAGs), como *ACS1*, *FAS1* y *FAS2* (Hiesinger y col., 1997).

Por otro lado, en la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, la acetil-CoA utilizada en la lipogénesis se produce por la interrupción del ciclo del ácido cítrico cuando la célula se encuentra en condiciones de baja disponibilidad o total inanición de nitrógeno (Beopoulos y col., 2009). Esto conduce directamente a la desaminación del adenosín monofosfato (AMP) mediante la proteína AMP desaminasa, produciendo inosina 5-monofosfato (IMP) y iones amonio, como una forma de obtener el nitrógeno necesario para la producción de aminoácidos o bases nitrogenadas. Al mismo tiempo, se da un cambio en el consumo de oxígeno debido a que la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) es una proteína cuya actividad en organismos oleaginosos, como *Y. lipolytica*, está regulada de forma alostérica por la unión de AMP, por lo que la disminución en la concentración de este nucleótido provoca una reducción en la actividad de la ICDH (Evans y col., 1983; Morgunov y col., 2004; Ratledge, 2002). Este proceso provoca la acumulación de citrato, mediada por la aconitasa, en el interior de la mitocondria, el cual después es expulsado al citosol a través de la lanzadera de citrato-malato (Beopoulos y col., 2009; Fakas, 2017) (**Figura 2**). La acumulación de citrato en la mitocondria y su posterior expulsión al citosol es esencial para producir las cantidades necesarias de acetil-CoA citosólico que constituye la pieza básica de la síntesis de ácidos grasos y esteroides (Bauer y col., 2005; Botham & Ratledge, 1979; Ratledge, 2004).

Durante la lipogénesis, la producción de acetil-CoA a partir de citrato es catalizada por la enzima citosólica ATP citrato liasa (AclY), característica de levaduras oleaginosas (Adrio, 2017). El

gen *ACLY* es esencial durante la lipogénesis dependiente de la glucosa, ya que los genes *ACS* son incapaces de complementar su actividad (Adrio, 2017; Bauer y col., 2005).

Acly es el nodo que conecta el metabolismo de la glucosa con vías metabólicas importantes como la síntesis de ácidos grasos, la vía del mevalonato (**Figura 3**) (producción de terpenoides) y procesos como la acetilación de proteínas (Chypre y col., 2012). Debido a que la acetil-CoA es utilizada por los tres dominios de la vida como un metabolito transportador esencial de carbonos, la *Acly* es una proteína altamente conservada por ser la fuente principal de esta molécula (Bazilevsky y col., 2019; Gawryluk y col., 2015). Para que la *Acly* pueda llevar a cabo su actividad enzimática se requiere la formación de un homotetrámero. La formación de la holoenzima está regulada en conjunto por los dos superdominios que posee el monómero de la *Acly*: un superdominio homólogo a citrato sintasa (CS) y un dominio homólogo a acil-CoA sintetasa (ACS) (Bazilevsky y col., 2019; Chávez Cabrera y col., 2015). La reacción catalítica de la *Acly* corresponde a la reacción reversa de la citrato sintasa en el ciclo del ácido cítrico, produciendo acetil-CoA y oxalacetato a partir de citrato. Se ha reportado con anterioridad que esta cualidad de tetrámero guarda una relación de la *Acly* con el origen evolutivo del ciclo de Krebs, que vincula a la citrato sintasa con una proteína tetramérica ancestral que opera en el ciclo de Krebs reverso (Verschueren y col., 2019).

1.3.2. La acetil-CoA carboxilasa y el complejo de Sintetas de ácidos grasos

El siguiente paso tras la producción de la acetil-CoA citosólico es la producción de malonil-CoA mediante la carboxilación de la acetil-CoA por la acetil-Coa carboxilasa (*Acc1*). Este es considerado el paso limitante y a su vez comprometedor en la síntesis *de novo* de FAs (Fakas, 2017; Hasslacher y col., 1993).

En eucariotas, el monómero de *Acc1* suele tener un tamaño de 250 kilodaltones (kDa) y forma un homodímero de 530-560 kDa (Brownsey y col., 2006). Contiene tres dominios principales a través de los cuales lleva a cabo su actividad catalítica: un dominio de proteína portadora de biotina carboxilada, un dominio de biotina carboxilasa y un dominio de carboxiltransferasa (J. Wei & Tong, 2015). Se le ha propuesto como blanco para el tratamiento de distintas condiciones médicas como el síndrome metabólico, o el cáncer (Hunkeler y col., 2016), mientras que en levaduras como *Y. lipolytica* ha sido blanco de sobreexpresión en búsqueda de aumentar la producción de lípidos

(Qiao y col., 2015; Tai & Stephanopoulos, 2013; Xu y col., 2017).

Tras la producción del malonil CoA, Fas1 y Fas2 forman un complejo que cataliza una serie de reacciones cíclicas sobre la malonil-CoA, lo cual permite que crezca una cadena de acil-ACP por la adición de acetil-CoA, hasta formar cadenas de 16 o 18 carbonos, las cuales son transferidas a la CoA para formar palmitoil-CoA (16 carbonos) o estearoil-CoA (18 carbonos). Estos ácidos grasos a su vez pueden ser insaturados por la δ -9 ácido graso desaturasa Ole1 (Fakas, 2017).

Fas1 y Fas2 son proteínas de gran complejidad. Fas1 es la subunidad β del complejo Fas1/Fas2. En *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* se le ha descrito como una proteína penta-funcional debido a los cinco dominios que contiene: acetil transferasa, enoil reductasa, deshidratasa y malonil/palmitoil transferasa, mientras que Fas2, la subunidad α , contiene los dominios cetosintasa y fosfopanteteína transferasa. Todos estos dominios catalíticos funcionan en serie para producir cadenas de ácidos grasos de 16 o 18 carbonos a partir de moléculas de malonil-CoA producto de la Acc1 (Köttig y col., 1991; K. Singh y col., 2020). Sin embargo, en levaduras como *Rhodotorula toruloides*, los dominios de ambas subunidades tienen una organización distinta: en la subunidad β se encuentran sólo los dominios acil transferasa y enoil reductasa, mientras que los otros dominios se encuentran en la subunidad α . Además tiene dos dominios de proteína portadora de acilo en tándem. Se ha hipotetizado que lo anterior puede mejorar la eficacia de la síntesis de ácidos grasos al promover una mayor concentración en el sitio de catálisis del complejo Fas (Xue y col., 2018; Zhu y col., 2012).

1.3.3. De los ácidos grasos a los triglicéridos

Una vez que se han producido los FAs a través del complejo de Fas1/Fas2, la célula debe almacenarlos en estructuras que prevengan la toxicidad, debido a que la presencia de FAs libres en el citosol puede provocar efectos adversos, como estrés oxidante o daño citotóxico (Jarc & Petan, 2019).

Los FAs recién sintetizados son dirigidos a la vía de síntesis de TAGs para ser almacenados como gotas lipídicas (LDs). Los acil-CoA generados a partir de la elongación de las cadenas de carbono son transportados al retículo endoplásmico (RE), donde pueden pasar por la desaturación dependiente de NADPH o por una elongación adicional de dos carbonos, tras la cual son dirigidos

hacia la síntesis de TAGs (Fakas, 2017). Los TAGs producidos durante la síntesis *de novo* se acumulan al interior del RE, y al alcanzar un tamaño crítico, se separan de éste, permitiendo la compartimentación y el almacenamiento de los FAs en el citoplasma.

Para la síntesis *de novo* de TAGs, la célula requiere de glicerol 3-fosfato (G3P), el cual se obtiene a partir de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), un intermediario de la glucólisis, o por la ingesta y posterior fosforilación del glicerol presente en el medio extracelular al ser usado como fuente de carbono (Qin y col., 2017).

El ensamblado de los TAGs ocurre de manera canónica por la vía de Kennedy, donde el G3P es acilado por la Sct1, formando ácido lisofosfatídico (LPA). El LPA es acilado una vez más por la Slc1 y como producto se obtiene ácido fosfatídico (PA) (Beopoulos y col., 2009). La obtención del PA es un punto metabólico importante ya que este ácido puede ser dirigido hacia la síntesis de TAGs o la síntesis de fosfolípidos a través de la vía CDP-DAG. Cuando la ruta favorecida es la síntesis de TAGs, el PA es desfosforilado a diacilglicerol (DAG) por una ácido fosfatídico fosfatasa (Pah1) (**Figura 2**) (Carman & Han, 2006).

Pah1 es una enzima dependiente de Mg_2^+ codificada por el gen *PAH1* y juega un papel importante en la formación de LDs, ya que su síntesis ocurre en grandes cantidades durante el cambio hacia el metabolismo de lípidos. Este cambio metabólico es facilitado por la activación de Snf1/AMPK, el cual responde al desabasto de la glucosa y promueve la desrepresión de genes oxidativos. Por lo tanto, la formación de LDs depende de la expresión y/o actividad de Pah1 (Jarc & Petan, 2019).

Además de la producción de LDs, Pah1 es importante ya que permite el control no solo de la producción de diacilglicerol (DAG), sino también la regulación de la expresión de genes involucrados en la síntesis de fosfolípidos y por consiguiente el crecimiento de la membrana nuclear y del retículo endoplasmático. Así mismo, Pah1 se encuentra involucrada en la homeostasis y fusión de las vacuolas (Pascual & Carman, 2013).

La actividad de Pah1 es bastante dinámica, llevando a cabo su actividad catalítica e interactuando a lo largo de las membranas del núcleo y el RE (Kwiatek y col., 2020). Esta actividad es regulada finalmente a través de procesos dinámicos de fosforilación en el citosol y desfosforilación en la superficie membranal a la cual se encuentra acoplada por múltiples cinasas (Carman & Han, 2006), así como por metabolitos que forman parte del proceso de síntesis de lípidos, como el citrato,

malato y piruvato (Pasham & Fakas, 2022). La mutación en *PAH1* tiene efectos severos en humanos y ratones, incluyendo enfermedades autoinmunes, pues la enzima Pah1 se ve involucrada no solo en la síntesis de TAGs, sino también en la regulación de la expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de fosfolípidos CDP-DAG y en la de síntesis de TAGs. Igualmente, se ha observado en mutantes Δ pah1 susceptibilidad a la lipotoxicidad y al estrés oxidante, así como niveles elevados de PA y la expansión de la membrana nuclear y del RE (Kwiatek y col., 2020; Reue & Wang, 2019).

El paso final en la síntesis de TAGs es la acilación de los DAGs producidos en la membrana del RE por Pah1. Esto puede ser dependiente o independiente de acil-CoA. La manera independiente de acil-CoA ocurre por la acción de la Lro1, que es similar a la lecitina colesterol acil-transferasa de *Homo sapiens* (Jacquier y col., 2011). La ruta dependiente de acil-CoA involucra la acción de la Dga1, siendo la principal vía de síntesis de TAGs tanto en levaduras oleaginosas como no oleaginosas (Fakas, 2017). Sin embargo, la contribución de estas formas de acilación de DAG depende de la fase de crecimiento de las células, siendo Lro1 más importante durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que Dga1 tiene una mayor contribución durante la fase estacionaria (Oelkers y col., 2002). Se ha observado que ante la pérdida de *DGA1*, la célula es capaz de mantener una producción de TAGs, aunque relativamente menor, a través de Lro1, y al realizar la delección tanto de *LRO1* y de *DGA1*, aún es posible una síntesis residual a través de *ARE2*, gen que codifica una acil-CoA esterol aciltransferasa, usualmente involucrada en la síntesis de ésteres de esteroides. Por ello, la esterificación del diacilglicerol no es responsabilidad única de Dga1 (Oelkers y col., 2002). Precisamente, la sobre-expresión tanto de *DGA1* como de *LRO1* han sido blancos para la generación cepas de *S. cerevisiae* con un fenotipo oleaginoso, sobre todo en aquellas con un fondo genético Δ snf2 (Kamisaka y col., 2007), así como en *Y. lipolytica* para incrementar la eficiencia de la producción de lípidos (Kerkhoven y col., 2017).

1.4. Administración y manejo de los lípidos

La síntesis de TAGs tiene lugar en la membrana del RE, lo que provoca la formación de brotes en la membrana que crecen de tamaño hasta separarse del RE. Estos brotes con una monocapa dan lugar a las LDs, las cuales contienen varias proteínas que pueden transferirse entre el RE y

las LDs, o viceversa. Esta naturaleza dinámica de las LDs indica una cierta dependencia del RE (Jacquier y col., 2011). Sin embargo, la población de LDs es muy dinámica y sus ciclos de formación y degradación responden a las necesidades celulares y a señales ambientales. La formación de LDs se promueve cuando la célula se encuentra con cantidades excesivas de lípidos, estrés oxidante o estrés nutricional, o a desbalances energéticos y redox. Los LDs juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares como la homeostasis, el almacenamiento de lípidos, procesos de autofagia, protección contra el estrés del RE, o la β -oxidación. Además, una de sus funciones más inmediatas es la protección contra la lipotoxicidad de ácidos grasos en exceso (Jarc & Petan, 2019). Existen reportes que indican que la formación de LDs es desigual, pues distintas LDs en una misma célula pueden crecer a distintas tasas debido a la disponibilidad de la maquinaria biosintética que les da origen. Las LDs son capaces de mantener en su membrana a acil-CoA sintetasas, lo que permite la generación de acil-CoA en su periferia para ser utilizada en la síntesis posterior de TAGs (Kuerschner y col., 2008).

Otra de las funciones importantes de las LDs es su participación en los procesos autofágicos de la célula. En principio, el uso de los lípidos almacenados en las LDs es práctico para la célula dado que permite la producción de energía o la síntesis de otros compuestos, como terpenoides, a partir de la β -oxidación. Esto es crítico para mantener la homeostasis celular, ya que, como la formación de LDs, los procesos autofágicos son una respuesta a condiciones de estrés como deficiencia nutricional, estrés oxidante, infecciones o inflamación, entre otros (Mamaev & Zvyagilskaya, 2019). La autofagia también implica la eliminación de patógenos, proteínas agregadas y organelos no funcionales, y a pesar de que se ha considerado un proceso aleatorio, es un proceso ordenado y se ha reportado que existen formas autofágicas altamente selectivas, como la mitofagia (Fukuda & Kanki, 2018).

Dado lo anterior, existe un diálogo entre los procesos de formación y utilización de LDs y los procesos autofágicos de la célula. Mientras que la autofagia puede promover la biogénesis de las LDs bajo condiciones de inanición, los lípidos contenidos en las LDs pueden ser utilizados en la formación de las membranas del fagóforo. De tal forma, la autofagia y las LDs se encuentran en una relación regulatoria estricta a través de mecanismos como la macrolipofagia (Bhatia-Kissova & Camougrand, 2021; Jarc & Petan, 2019; R. Singh y col., 2009).

1.5. *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula mucilaginosa es una levadura roja saprófita que ha sido aislada de ambientes fríos (lagos de gran altitud en la Patagonia o suelos antárticos) con condiciones adversas, que incluyen desecación o radiación UV (Bialkowska y col., 2017; Landolfo y col., 2018; Troncoso y col., 2017). Existen reportes de que algunas cepas y especies del género *Rhodotorula* pueden ser patógenas oportunistas (Kot y col., 2016). Las levaduras del género *Rhodotorula* son de particular interés para la biotecnología debido a su capacidad de producir grandes cantidades de carotenoides, como la torularodina, toruleno y β -caroteno (Aksu & Eren, 2005). También son capaces de producir grandes cantidades de lípidos, principalmente TAGs y FAs insaturados, entre los que destacan los ácidos oleico (18:1) y palmitoleico (16:1), los cuales son de gran interés industrial en la producción de biocombustibles como el biodiésel (Kot y col., 2019; Landolfo y col., 2018). *R. mucilaginosa* es capaz de acumular más del 20% de su peso seco en forma de lípidos, principalmente TAGs y esteroides, por lo que se considera una levadura oleaginosa (Landolfo y col., 2018).

Estas características oleaginosas son una adaptación que muchos microorganismos considerados psicrófilos presentan para lidiar con las condiciones adversas que los ambientes fríos implican. La capacidad de alterar su contenido lipídico les permite contender con las limitantes físicas que provocan las bajas temperaturas, tales como la disminución de la fluidez de membrana o la baja disponibilidad de agua (Carrasco y col., 2011; Troncoso y col., 2017).

R. mucilaginosa es una levadura capaz de producir carotenoides, los cuales son pigmentos solubles en lípidos y cuya síntesis, junto con la síntesis de lípidos, se ha propuesto como un mecanismo de protección contra el estrés ambiental al que se enfrentan microorganismos como las levaduras de ambientes fríos o de estrés fotooxidante por la luz UV (Gan y col., 2017; Pham y col., 2020). La biosíntesis de carotenoides se da a partir de la vía del mevalonato (**Figura 3**) y requiere la actividad de dos enzimas: la fitoeno deshidrogenasa, codificada por el gen *CAR1*, y la fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, la cual es una enzima bifuncional codificada por el gen *CAR2*, así como de la presencia de acetil-CoA como sustrato inicial de las enzimas de esta vía (Landolfo y col., 2018).

En la levadura *Rhodospiridium toruloides*, la regulación transcripcional de *CAR1* y *CAR2* es mediada por la luz. En condiciones de oscuridad o luz, *R. toruloides* muestra diferencias tanto en

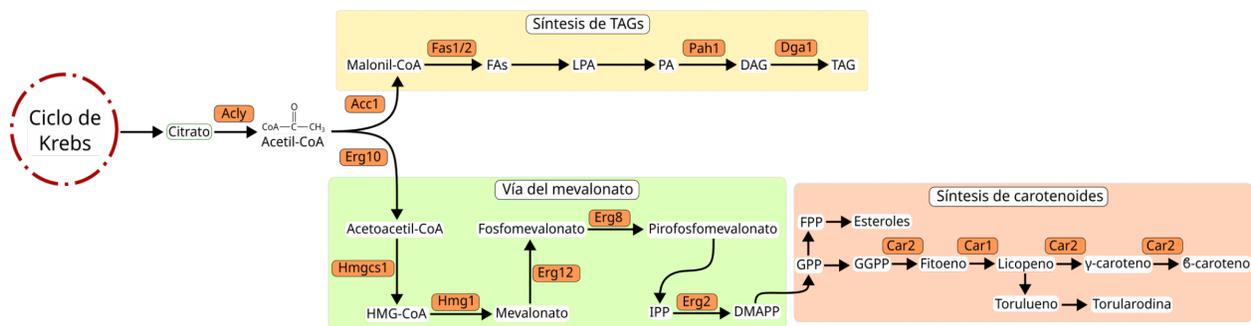


Figura 3: Síntesis de TAGs y carotenoides. Comparación entre la vía de síntesis de TAGs (amarillo) y la síntesis de carotenoides (rojo) a partir de la vía del mevalonato (verde). El paso inicial necesario para ambas rutas metabólicas es la salida del citrato a partir del ciclo de Krebs. A partir de la acetil-CoA, ambas rutas divergen, la enzima Acc1 inicial la síntesis de TAGs, mientras que la enzima Erg10 para la síntesis del mevalonato. El producto final de la síntesis de carotenoides es β -caroteno o torularodina, ambos productos se sintetizan en *R. mucilaginosa*. HMG-CoA: Hidroximetilglutaril-CoA, IPP: Isopentenil pirofosfato, DMAPP: Dimetilalil pirofosfato, GPP: Geranyl pirofosfato, FPP: Farnesil pirofosfato, GGPP: Geranylgeranyl pirofosfato.

la producción de carotenoides como en la expresión de mRNA. Sin embargo, a pesar de observar una diferencia en la expresión de *CAR1* y *CAR2*, no se observan diferencias en la producción de lípidos o en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de FAs y TAGs (Landolfo y col., 2018; Pham y col., 2020), pero se ha reportado que en *R. mucilaginosa* la sobre expresión de *ACC1* mediante citrato de sodio como inductor, a la par de la represión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa utilizando rosuvastatina, lleva a un incremento de hasta el 62% en la concentración lipídica (Chaturvedi y col., 2021).

Esto muestra el potencial de *R. mucilaginosa* en aplicaciones biotecnológicas para la producción de lípidos de interés en la industria oleoquímica, ya sea de consumo humano o para la producción de biocombustibles como biodiesel, así como para otras aplicaciones donde las características de esta levadura, como la oleaginosidad, la resistencia a distintos tipos de estrés o la psicofilia puedan ser deseables. No obstante, aunque su genoma está secuenciado y disponible en bases de datos públicas (Deligios y col., 2015; Gan y col., 2017), carece de anotaciones extensas. Entre las no indicadas se encuentran los genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos, lo que dificulta la investigación sobre el potencial de *R. mucilaginosa*.

2. Planteamiento del problema

El interés por las levaduras no convencionales ha aumentado debido a su potencial biotecnológico, pero la posibilidad de su aprovechamiento en sectores como la producción industrial de oleoquímicos y sus derivados, como los biocombustibles, requiere un conocimiento detallado de los mecanismos que gobiernan su metabolismo, principalmente la dinámica de la síntesis de lípidos neutros como los TAGs. A pesar de que en levaduras como *Y. lipolytica* se han caracterizado en gran detalle, estos procesos en levaduras como *R. mucilaginosa*, con características importantes como lo son la resistencia a la salinidad o al frío, aún se desconoce tanto a nivel de la actividad enzimática, así como el perfil de expresión de los genes involucrados en la síntesis de estos compuestos. Por lo tanto, determinar el perfil de expresión de los genes importantes de la síntesis de TAGs o ácidos grasos (*ACLY*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*, *PAH1* y *DGA1*) en condiciones que favorecen estos procesos es un punto de partida para investigar el potencial de *R. mucilaginosa*.

3. Hipótesis

Si la síntesis de lípidos en *R. mucilaginosa* sigue la misma ruta metabólica que otras levaduras oleaginosas como *Y. lipolytica*, entonces su comportamiento en condiciones de cultivo de limitación de nitrógeno será redireccionar el flujo de carbono hacia la acumulación de lípidos, lo cual se observará al cuantificar la cantidad de triglicéridos, el incremento de las gotas lipídicas o el incremento de la expresión de los genes que codifican enzimas de la vía de síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.

4. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el efecto de la limitación de nitrógeno en la levadura *R. mucilaginosa* M94C9 y analizar la expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de lípidos neutros.

Objetivos particulares

- Caracterizar el crecimiento y la producción de biomasa de *R. mucilaginosa* bajo distintas concentraciones de una fuente de nitrógeno (condiciones lipogénicas).
- Determinar la formación de gotas lipídicas y cuantificar la acumulación de triglicéridos en las condiciones lipogénicas descritas.
- Identificar *in silico* los marcos de lectura abiertos de genes que participan en la vía de síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (*ACLY*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*, *PAH1* y *DGA1*.)
- Analizar el perfil de expresión de los genes mencionados bajo condiciones lipogénicas.

5. Materiales y Métodos

5.1. Origen de la cepa

En este estudio se utilizó la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* cepa M94C9, aislada de la isla Litchfield del archipiélago Shetland del Sur de la Antártica, por el grupo de trabajo del Dr. Marcelo Baeza Cancino de la Universidad de Chile en enero de 2014 (Troncoso y col., 2017). Posteriormente, la cepa M94C9 se donó al grupo de trabajo del laboratorio Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, UNAM.

5.2. Cultivos de *R. mucilaginosa*

Se descongeló un vial con la cepa *R. mucilaginosa* y se colocaron células en medio sólido YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose), el cual contiene extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2%), glucosa (2%) y agar (2%). Se observaron colonias después de 3 días de incubación a 28 °C. Para los ensayos de crecimiento, biomasa, cuantificación de TAGs y expresión génica se utilizaron pre-inóculos cultivados en medio YPD (16-18h), denominados cultivo semilla (tiempo 0). Posteriormente, se inocularon células en medio mínimo (MM) con glucosa (10%) como única fuente de carbono y sulfato de amonio ($(NH_4)_2 SO_4$) como fuente de nitrógeno.

El MM se suplementó con YNB (Yeast Nitrogen Base) sin fuente de nitrógeno o aminoácidos (**Tabla 1**). Los cultivos de MM se diferencian por las proporciones de carbono/nitrógeno (C/N), las cuales se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\frac{C}{N} = \frac{m_C \left(\frac{C \cdot MA_C}{PM_C} \right)}{m_N \left(\frac{N \cdot MA_N}{PM_N} \right)} \quad (1)$$

Donde m_C y m_N son las cantidades (g) de las fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (sulfato de amonio). C y N son la cantidad de átomos de carbono y nitrógeno presentes en las moléculas de las fuentes nutricionales (glucosa y sulfato de amonio). MA_C y MA_N son los pesos atómicos de carbono y nitrógeno respectivamente. PM_C y PM_N son los pesos moleculares de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (sulfato de amonio). De esta manera, se calcularon tres distintas relaciones de C/N, manteniendo constante la concentración de carbono y disminuyendo la cantidad

Tabla 1: Componentes utilizados en los medios de cultivo. C/N: Proporción disponible de carbono/nitrógeno, el sufijo indica la relación entre ambos elementos (40:1, 1200:1 o 2400:1). C: Fuente de carbono sin nitrógeno. YPD: *Yeast extract, Peptone, Dextrose*. Medio rico compuesto de extracto de levadura, peptona de casína y dextrosa. YNB: *Yeast Nitrogen Base*. Suplemento sin nitrógeno.

	YPD	C/N _{40:1}	C/N _{1200:1}	C/N _{2400:1}	C
Glucosa (g/L)	20	100	100	100	100
Peptona de caseína (g/L)	20	-	-	-	-
Extracto de levadura (g/L) 10	-	-	-	-	-
Agar (g/L)	20	-	-	-	-
Sulfato de amonio (g/L)	-	5	0.16	0.083	-
YNB sin nitrógeno (g/L)	-	1.7	1.7	1.7	1.7

de nitrógeno (**Tabla 1**). De esta manera, las proporciones aproximadas de cada medio de cultivo fueron 40:1, 1200:1, 2400:1 y total ausencia de nitrógeno (C/N_{40:1}, C/N_{1200:1}, C/N_{2400:1}, C).

5.3. Curvas de crecimiento

A fin de evaluar el crecimiento de *R. mucilaginosa* M94C9 en distintos medios de cultivo con limitación de nitrógeno, se inocularon células provenientes de un preinóculo cultivado en medio rico en 50 mL de MM (densidad óptica inicial de 0.05) de cada condición de disponibilidad de nitrógeno. Los cultivos se incubaron a 28 °C a 180 rpm durante 72 h por triplicado. El crecimiento se midió cada 2-3 horas mediante absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀) en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos se graficaron con el lenguaje de programación R, utilizando la paquetería `ggplot2` (Wickham, 2016).

5.4. Cuantificación de biomasa

Las células cultivadas en los medios descritos se separaron en alícuotas con distintos volúmenes dependiendo de la OD₆₀₀. Las alícuotas se tomaron cada 24 h y se centrifugaron a 3000 rpm. Las células sedimentadas se suspendieron en agua estéril y se colocaron en tubos de 1.5 mL pesados previamente. Las células se deshidrataron con calor a 70 °C durante 72 h como se describió previamente (Romero-Aguilar y col., 2020). Las muestras se pesaron y se calculó la biomasa (peso seco, g/L).

5.5. Microscopía electrónica de transmisión

Las células de *R. mucilaginosa* se cultivaron en los medios descritos y se prepararon muestras para observarlas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) en la fase de crecimiento exponencial (18 h) y fase estacionaria (48 h). Las células se colectaron por centrifugación durante 5 min a 3000 rpm y se lavaron con agua destilada estéril. Se suspendieron 500 μL de células en fijador de permanganato de potasio 1X y se incubaron durante 5 min. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y se suspendieron en 1 mL de fijador para ser incubadas a 4 °C durante toda la noche. Al siguiente día se lavaron 6 veces consecutivas durante 15 min con H₂O MiliQ. Tras los lavados, las células fueron deshidratadas con etanol al 50 % incrementando la concentración 10 % cada 10 min hasta alcanzar un total de etanol 100 %. Finalmente, se prepararon para su inclusión en resina epóxica EPON mediante lavados sucesivos de etanol-acetona (1:1, 8 min), acetona (5 min), acetona-EPON (3:1, 1 h), acetona-EPON (1:1, toda la noche) y acetona-EPON (1:3, 1 h), para la observación de cortes a través de MET.

5.6. Extracción de DNA

Las células de *R. mucilaginosa* se inocularon en medio líquido rico (YPD) en matraces de 250 mL, que se incubaron a 27 °C a 180 rpm durante 24 h. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. La pastilla de células se lavó dos veces con agua estéril, posteriormente se resuspendió en 500 μL de agua bidestilada y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 s. Se agregaron 200 μL de solución de 2 % tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, y 200 μL de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (PCI). Después, a las muestras se les agregaron 300 μL de volumen de perlas de vidrio y se mezcló por agitación en vórtex. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se separó la fase acuosa a un tubo limpio. Se procedió a realizar un lavado con PCI y dos lavados consecutivos con cloroformo. Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm nuevamente, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se mezcló por inversión con 1 mL de etanol absoluto. Después de incubar 30 min a -20 °C se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en 400 μL de TE pH 8 y se agregaron 1.5 μL de RNAsa 20 mg/mL. Se incubó durante 30 min a 37 °C.

Posteriormente, se agregaron 40 μL de acetato de sodio 3 M, más 1 mL de etanol absoluto y se agitó por inversión. Se incubó durante 20 min a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, tras lo cual se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se hizo un lavado con etanol al 70% a la pastilla de ácidos nucleicos, se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar durante 1 h a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μL de agua inyectable. El DNA extraído se cuantificó con un nanoespectrofotómetro y se guardó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5.7. Extracción de RNA total

Se cultivaron células de *R. mucilaginosa* en 100 mL en las condiciones descritas. Las células se colectaron en la fase de crecimiento exponencial (18 h) y se lavaron con agua fría libre de RNAsas preparada con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.01%. Tras centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y desechar el sobrenadante, se agregó 400 μL de solución de Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8 y SDS 0.5% (TES). Después se agregaron 400 μL de fenol ácido (pH 4.5) y se agitó vigorosamente con un vórtex durante 10 s, tras lo cual se incubó a $65\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 min. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a máxima velocidad a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y se llevó a cabo un lavado con 400 μL de fenol ácido. Posteriormente, se realizó un lavado con 400 μL de cloroformo. Se agregaron 40 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 1 mL de etanol absoluto frío y se dejó precipitar toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a velocidad máxima a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y se lavó el pellet de RNA con etanol al 70% frío. La pastilla se resuspendió en 50 μL de agua bidestilada con DEPC. El RNA extraído se cuantificó con un nanoespectrofotómetro y se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$. La integridad del RNA se corroboró mediante electroforesis en un gel de agarosa desnaturalizante al 1% con formaldehído al 6%.

5.8. Búsqueda de genes involucrados en la síntesis de lípidos

Como parte de la identificación de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los genes y las proteínas involucradas en la biosíntesis de lípidos en los genomas de cepas de *R. mucilaginosa* reportados, se recuperaron los números de acceso (IDs) de los genes ortólogos que previamente han sido identificados en otras levaduras, principalmente *R. toruloides* (Zhu y col., 2012). Se utilizaron

los números de acceso de *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* y *Rhodotorula* sp, que se reportan en las bases de datos del GenBank (*S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*) y MycoCosm (*Rhodotorula* sp.) (**Tabla 2**).

5.9. Construcción de la base de datos local para realizar búsquedas y alineamientos

Se construyó una base de datos local en formato FASTA con las secuencias de los genomas de distintas especies y cepas de *Rhodotorula* secuenciadas, y de otras especies de levaduras (**Tabla 3**). Se realizó un análisis BLAST local a partir de esta base de datos utilizando como secuencias de consulta (*query*) las secuencias de nucleótidos obtenidas de distintas levaduras registradas en GenBank (**Tabla 4**). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Acly, Acc1, Fas1, Fas2, Pah1 y Dga1 de *R. toruloides* que se han reportado previamente (Zhu y col., 2012) se utilizaron para el análisis de tBLASTn con la base de datos en la plataforma en línea de MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

5.10. Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR

Se diseñaron oligonucleótidos para el análisis de RT-qPCR de los transcritos de los ORFs que codifican para los genes putativos de *ACLY*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*, *PAH1* y *DGA1* de *R. mucilaginosa*. Se diseñaron considerando un tamaño de amplicón de alrededor de 100 pb y regiones conservadas sin intrones (**Tabla 5** y **Anexos 8**). Para cada par de oligonucleótidos diseñados se verificó que no formaran estructuras secundarias o dímeros. Se realizó una prueba de eficiencia para RT-qPCR por curva estándar utilizando DNA genómico como molde para cada par de oligonucleótidos incluyendo oligonucleótidos del gen de actina (*ACT1*), que ha sido reportado como gen de expresión constitutiva (*housekeeping*) (Landolfo y col., 2018).

5.11. Cuantificación de mRNA mediante RT-qPCR

El RNA total extraído se incubó con DNAsa (RQ1 RNase free DNase, Promega) para eliminar el DNA contaminante en la muestra. La síntesis del cDNA se realizó utilizando 500 ng de RNA molde en 5 μ L más 1 μ L de oligonucleótido dT y 6 μ L de agua inyectable. Se mezcló suavemente

por inversión y se incubó a 65 °C durante 5 min, se centrifugó por 15 s a 3000 rpm y se mantuvo en hielo. A esta reacción se agregó 4 μL del amortiguador de reacción, 1 μL de *Riboblock*, 2 μL de mezcla de dNTP 10 mM y 1 μL de retrotranscriptasa. Se mezcló suavemente y se incubó durante 60 min a 42 °C. Finalmente, la reacción se detuvo elevando la temperatura a 70 °C durante 5 min. La cuantificación de los transcritos de los distintos genes de interés se llevó a cabo mediante la reacción acoplada de RT-qPCR con el método de curva estándar, utilizando los oligonucleótidos descritos. Para cada gen se realizó una curva estándar a partir de diluciones seriadas de DNA genómico con una concentración inicial de 20 ng/ μL y un factor de dilución 1:4. Se utilizó el reactivo de KAPA SYBR FAST qPCR de Kapa Biosystems Inc., el cual tiene una longitud de onda de absorción de 497 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm, con un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). La reacción de qPCR se llevó a cabo de la siguiente manera: un ciclo inicial de 95 °C por 5 min, y 35 ciclos de 95 °C durante 15 s, 58 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s.

5.12. Extracción y cuantificación de TAGs

La extracción de lípidos y TAGs se realizó de acuerdo con Folch y col. (1957). Las células se incubaron en buffer Tris-HCl 0.3% Tritón X100 pH 7.5. Posteriormente, se agregó la mezcla Folch (cloroformo/metanol 3:1 v/v) y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 3 h. Se recuperó la fase orgánica tras centrifugar durante 10 min a 3000 g, y se llevaron a cabo lavados de cloroformo del pellet para recuperar la mayor cantidad de lípidos de la fase orgánica. Esta fase se secó a temperatura ambiente durante toda la noche. Finalmente, el análisis de contenido de TAGs se llevó a cabo mediante el kit de Spinreact Triacylglycerols-LQ. Se hizo una curva estándar de glicerol y se normalizó el contenido de TAGs por peso seco.

5.13. Modelado de homología

A la par de los alineamientos, se realizaron análisis de modelado de homología para obtener una predicción de la estructura tridimensional de la proteína a partir de cada secuencia de aminoácidos mediante la plataforma en línea de SWISS-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>), utilizando las secuencias obtenidas mediante el análisis de BLAST. La plataforma SWISS-Model alinea las

secuencias de aminoácidos obtenidas por el análisis de BLAST y las secuencias de aminoácidos de proteínas encontradas en Protein Data Base (PDB). Los cristales mejor ajustados a cada modelo se extrajeron de PDB y fueron visualizados junto con el modelo de SWISS-Model utilizando el programa ChimeraX en su versión 1.1 para GNU/Linux (Goddard y col., 2018).

Tabla 2: Identificación y comparación de genes ortólogos que codifican para proteínas que participan en las vías de biosíntesis de lípidos en *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* y *Rhodotorula* sp.

Proteína	Gen en <i>S. cerevisiae</i>	Ortólogo en <i>Y. lipolytica</i>	Ortólogo en <i>Rhodotorula</i> sp.
Acetil-CoA sintetasa	<i>ACS1</i>	–	B0A53_04701
ATP: Citrato Liasa subunidad 1	–	YALIOE34793g	B0A53_01892
ATP: Citrato Liasa subunidad 2	–	YALIOD24431g	
Acetil-CoA Carboxilasa	<i>ACC1</i>	YALIOC11407g	B0A53_02691
Ácido graso sintasa subunidad 1	<i>FAS1</i>	YALIOB15059g	B0A53_02729
Ácido graso sintasa subunidad 2	<i>FAS2</i>	YALIOB19382g	B0A53_02691
Desaturasa de $\delta 9$ ácido graso	<i>OLE1</i>	YALIOC05951g	B0A53_01889
Desaturasa de $\delta 12$ ácido graso	–	YALIOB10153g	–
Aciltransferasa de Gro3P	<i>SCT1</i>	YALIOC00209g	B0A53_01396
Aciltransferasa de Gro3P	<i>GPT2</i>	–	–
Ácido lisofosfatídico acil-transferasa	<i>SLC1</i>	YALIOE18964g	B0A53_01396
1-Acil-sn-Gro3P acil-transferasa	<i>ALE1</i>	YALIOF19514g	A0A4U0VWA9
Sintasa de CDP-DAG	<i>CDS1</i>	YALIOE14443g	B0A53_05794
Sintasa de fosfatidilinositol	<i>PIS1</i>	YALIOF20328g	B0A53_01419
Sintasa de fosfatidilserina	<i>CHO1</i>	YALIOD08514g	–
Decarboxilasa 1 de fosfatidilserina	<i>PSD1</i>	YALIOD21604g	B0A53_02847
Decarboxilasa 2 de fosfatidilserina	<i>PSD2</i>	–	B0A53_03661
Metiltransferasa de fosfatidiletanolamina	<i>CHO2</i>	YALIOE06061g	B0A53_02663
Metiltransferasa de ffolípidos	<i>OPI3</i>	YALIOE12441g	B0A53_06065
Fosfatasa de Ácido fosfatídico	<i>PAH1</i>	YALIOD27016g	B0A53_03976
O-aciltrasnferasa de acil-CoA diacilglicerol	<i>DGA1</i>	YALIOE32769g	B0A53_04187
O-aciltrasnferasa de acil-CoA diacilglicerol	<i>DGA2</i>	YALIOD07986g	–
Aciltransferasa de fosfolípido:diacilglicerol	<i>LRO1</i>	YALIOE16797g	B0A53_04183
O-aciltransferasa 1 de acil-CoA:esterol	<i>ARE1</i>	YALIOF06578g	B0A53_05404
O-aciltransferasa 2 de acil-CoA:esterol	<i>ARE2</i>	–	–
Fosfatasa de ácido fosfatídico	<i>APP1</i>	YALIOD02233g	–
Fosfatasa de lípidos	<i>DPP1</i>	YALIOC11297g	–
	<i>LPP1</i>	YALIOB14531g	–

Tabla 3: Especies y cepas de levaduras utilizadas en la construcción de la base de datos local para realizar búsquedas y alineamientos.

Especie	Cepa	Número de acceso en GenBank
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IPL32	GCA_002806785.1
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	LS11	GCA_002917965.1
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	MD1149	GCA_002922495.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	CCFEE 5036	GCA_005059875.1
<i>Rhodotorula paludigena</i>	CM33	GCA_005281665.1
<i>Rhodotorula diobovata</i>	UCD-FST 08-225	GCA_006352295.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	ZM1	GCA_009806315.1
<i>Rhodotorula toruloides</i>	NP11	GCF_000320785.1
<i>Rhodotorula graminis</i>	WP1	GCF_001329695.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	FNED7-22	GCA_001914285.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	JG-1b	GCA_001541205.1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CLIB122	GCF_000002525.2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	GCF_000146045.2

Tabla 4: Especies de levaduras, cepas, genes y ORFs utilizados en el análisis de BLAST contra la base de datos local.

Levaduras	Cepas	Genes	ORFs
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	JCM 10317	<i>ACLY</i>	PAN0_002c1106
		<i>ACC1</i>	PAN0_002c1106
		<i>FAS1</i>	PAN0_002c1106
<i>Rhodoturla graminis</i>	WP1	<i>ACC1</i>	RHOBADRAFT_37308
		<i>DGA1</i>	XM_018413061
		<i>ACLY</i>	RHTO_03915
		<i>ACC1</i>	RHTO_02004
<i>Rhodoturla toruloides</i>	NP11	<i>FAS1</i>	RHTO_02032
		<i>FAS2</i>	RHTO_02139
		<i>PAH1</i>	RHTO_04894
		<i>DGA1</i>	RHTO_01962
		<i>ACC1</i>	<i>ACC1</i>
		<i>FAS1</i>	<i>FAS1</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	<i>FAS2</i>	<i>FAS2</i>
		<i>PAH1</i>	<i>PAH1</i>
		<i>DGA1</i>	<i>DGA1</i>
		<i>ACLY</i> sub 1	YALIO_E34793g
		<i>ACLY</i> sub 2	YALIO_D24431g
		<i>ACC1</i>	YALIO_C11407g
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CLIB122	<i>FAS1</i>	YALIO_B19382g
		<i>FAS2</i>	YALIO_B15059g
		<i>PAH1</i>	YALIO_D27016g
		<i>DGA1</i>	YALIO_E32769g
		<i>FAS1</i>	UMAG_10339
<i>Ustilago maydis</i>	521	<i>FAS2</i>	UMAG_06460

Tabla 5: Secuencias de oligonucleótidos para amplificar los transcritos de los genes descritos en *R. mucilaginosa*.

	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Tm (°)
A1	<i>RmACLYfw1</i>	GGCATGTCGAACGAGCTGAA	60.5
A2	<i>RmACLYrv1</i>	AGGTGGTCGATGAAGGTGGT	60.5
A3	<i>RmACLYfw1</i>	TGCTCGACTTTGACTTTGCC	58.4
A4	<i>RmACLYrv2</i>	TCCTTGGTACCCAGTAGAA	58.4
A5	<i>RmACC1fw1</i>	CCTCTACAGTCTTCGTCTCG	60.5
A6	<i>RmACC1rv1</i>	TCTTCGAGGACGATGCGGAT	60.5
A7	<i>RmACC1fw1</i>	AAGAACATGGTCGTCGCGCT	60.5
A8	<i>RmACC1rv2</i>	CCGTGGTGATCGTGTCTCT	60.5
A9	<i>RmFAS1fw1</i>	TCACTGGTTACGCCGAAGTC	60.5
A10	<i>RmFAS1rv1</i>	CCCCTCGAAGTGCTTGATCA	60.5
A11	<i>RmFAS1fw1</i>	TATCACCGACCCGATGAGC	60.5
A12	<i>RmFAS1rv2</i>	GTGCGGAACATCTTCGAGA	60.5
A13	<i>RmFAS2fw1</i>	TTCTCCGCCACCTTCTTGCA	60.5
A14	<i>RmFAS2rv1</i>	GTCTTGGCGAGGAAGTAGGA	60.5
A15	<i>RmFAS2fw1</i>	TCAAGGCCGGATTTCGTTTCG	60.5
A16	<i>RmFAS2rv2</i>	TTCTGGATCTCGGCGACCTT	60.5
A17	<i>RmPAH1fw1</i>	AGGGGATGAACACCATCTCG	60.5
A18	<i>RmPAH1rv1</i>	TGTCCGAGATGACGACCTGA	60.5
A19	<i>RmPAH1fw1</i>	TCTTCACCATGATCGGACGC	60.5
A20	<i>RmPAH1rv2</i>	ATGGCGCGTGAAGTCAGGTA	60.5
A21	<i>RmDGA1fw1</i>	TCTCATCGTCGCCTACCTCA	60.5
A22	<i>RmDGA1rv1</i>	ACTGGGTAGTACCCGGCAAA	60.5
A23	<i>RmDGA1fw1</i>	TGACCCCTCATTTGCTCACC	60.5
A24	<i>RmDGA1rv2</i>	CACGACTTCATCGAGACGGA	60.5

6. Resultados y Discusión

6.1. La disponibilidad de nitrógeno afecta el crecimiento y la acumulación de biomasa

Con la finalidad de caracterizar el crecimiento y la biomasa de *R. mucilaginosa* en condiciones lipogénicas (baja disponibilidad de nitrógeno), se prepararon cultivos en medio mínimo (MM) líquido con cuatro proporciones distintas de carbono y nitrógeno, manteniendo la disponibilidad de la fuente de carbono constante y disminuyendo la disponibilidad de la fuente de nitrógeno (**Materiales y Métodos**). En el cultivo con la proporción estándar C/N_{40:1}, la máxima densidad óptica (OD₆₀₀) alcanzada a las 72 h es cercana a 10. En los cultivos de C/N_{1200:1} y C/N_{2400:1} es entre $\tilde{3}$ y $\tilde{1}$, respectivamente, mientras que en ausencia de nitrógeno (condición C) es de 0.27 (**Figura 4a**).

El tiempo de duplicación en cada medio fue de 3.7 h (en C/N_{40:1}), 4.6h (C/N_{1200:1}) 5.36 h (C/N_{2400:1}) y 14 h en C. A las 72 h de cultivo en la condición C/N_{40:1}, la biomasa máxima alcanzada es de 6.46 g/L, mientras que en ausencia de nitrógeno fue de 0.05 g/L. En este mismo intervalo de tiempo, los cultivos en C/N_{1200:1} y C/N_{2400:1} alcanzaron valores de biomasa de 1.9 y 1.2 g/L, respectivamente (**Figura 4b**).

Estos datos muestran cómo la relación entre el crecimiento y la acumulación de biomasa de esta levadura es afectada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Los cocientes más altos de C/N tienen un efecto negativo en la velocidad de crecimiento y la acumulación de biomasa, mientras que en inanición de nitrógeno hay muy poca acumulación de biomasa.

Es importante mencionar que las condiciones de limitación de nitrógeno representan un claro estrés nutricional que afecta el crecimiento, la acumulación de biomasa y activa la lipogénesis en algunas levaduras oleaginosas (Braunwald y col., 2013; Han y col., 2016; Segal-Kischinevzky y col., 2022). Sin embargo, estos resultados, por sí solos, no permiten establecer con certeza que estas condiciones de limitación o inanición de nitrógeno, factor de estrés frecuente en la naturaleza (Granger y col., 1992; Segal-Kischinevzky y col., 2022), tengan un efecto lipogénico significativo en *R. mucilaginosa*. Por lo que se decidió explorar la acumulación de LDs intracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y la cuantificación de la producción de TAGs en las

mismas condiciones.

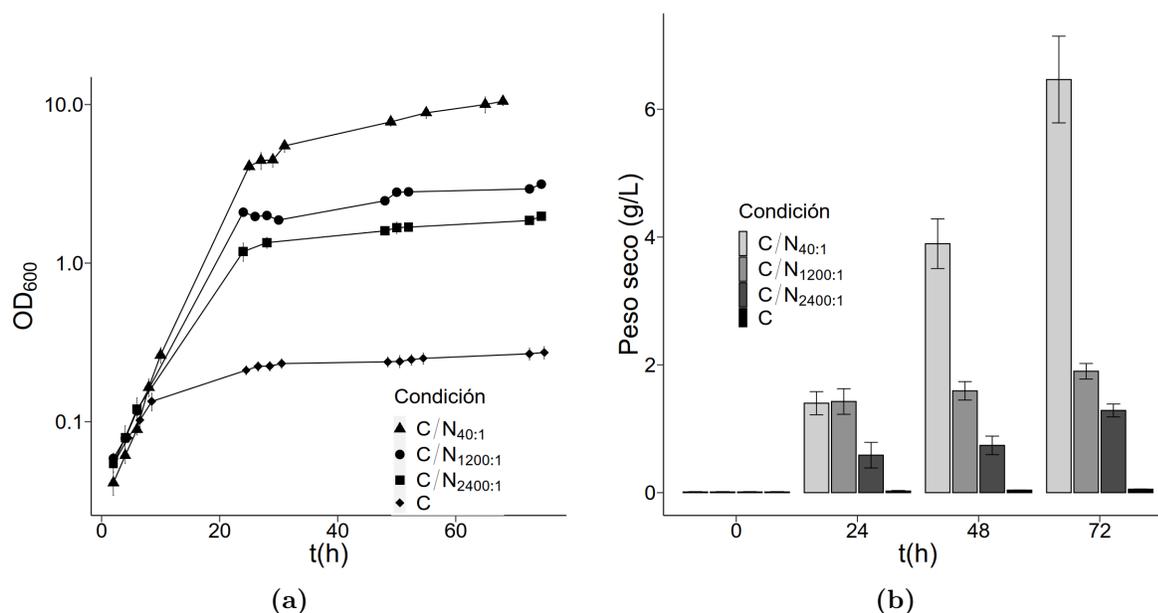


Figura 4: Crecimiento y acumulación de biomasa de en cultivos con distintas proporciones de carbono y nitrógeno. (a) Curvas de crecimiento de *R. mucilaginosa* en cuatro condiciones de disponibilidad de nitrógeno. Las células se crecieron en presencia de glucosa (C) y sulfato de amonio (N) en medio mínimo con proporciones de 40:1 (triángulos, C/N 40:1), limitación de nitrógeno 1200:1 (círculos, C/N_{1200:1}), limitación de nitrógeno 2400:1 (cuadrados, C/N_{2400:1}), e inanición de nitrógeno (diamantes, C). (b) Acumulación de biomasa de *R. mucilaginosa* en distintos intervalos de tiempo (0, 24, 48 y 72 horas de cultivo) en los mismos medios. Tiempo en horas: t (h). Densidad óptica a 600 nm= OD₆₀₀.

6.2. La limitación de nitrógeno es una condición lipogénica para *R. mucilaginosa*

6.2.1. La acumulación de gotas lipídicas depende la disponibilidad de nitrógeno

Con la finalidad de observar la formación de LDs como evidencia de un efecto lipogénico en las condiciones descritas anteriormente y medio rico (YPD), se colectaron alícuotas en dos puntos de tiempo del cultivo (18 y 48 h) y se prepararon muestras para la búsqueda de ultraestructuras celulares mediante MET similares a las encontradas por Gohain y col. (2020) y Siwina y Leasing (2021).

En la **figura 5a** y **5e**, así como en la **figura 6a** y **6e**, se observan las LDs, que incrementan su tamaño en relación con la disminución de la disponibilidad de nitrógeno. A las 18 horas de

cultivo, se aprecian las mitocondrias (m), el núcleo (N) y la acumulación de estructuras granulosas electrodensas que se encuentran dispersas en el citoplasma (**Figura 5h**), las cuales se asemejan a granos de glucógeno (Wilson, et al., 2010), o a carotenoides posiblemente embebidos en LDs de tamaño pequeño, que se dispersan hacia el citosol en las condición de limitación o inanición de nitrógeno (**Figura 5j**). En la inanición de nitrógeno (C), se observan LDs de mayor tamaño con respecto a las otras condiciones (**Figura 5b-d**), que aumentan en dimensiones o abundancia en la fase estacionaria de crecimiento (48 h) (**Figura 6a-e**). Estas estructuras identificadas como LDs presentan similitudes con otras estructuras intracelulares tales como vacuolas, peroxisomas o autofagosomas, ya que en ocasiones presentan contenido electrodensito dentro de una gota prácticamente transparente. Como se puede observar en la **figura 6h**, a pesar de presentar contenido electrodensito, parecen tener una monocapa lipídica, lo cual corresponde a LDs en lugar de peroxisomas o vacuolas debido a su origen en el RE. Sin embargo, otras estructuras similares parecen presentar una bicapa lipídica, lo que podría indicar un proceso de fusión de LDs con vacuolas o peroxisomas, o con autofagosomas en un proceso de lipofagia (Jarc & Petan, 2019).

Tanto en la condición estándar (C/N_{40:1}) como en la condición de medio rico YPD a las 18 h las LDs colocalizan con las estructuras electrodensas cuya forma y abundancia sugieren la presencia de gránulos de glucógeno, que de ser así podrían tener un papel importante durante el estrés que genera la fase estacionaria o la falta de nitrógeno.

En *S. cerevisiae* se ha observado que la síntesis de compuestos como el glucógeno se estimula en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo o azufre. Esto permite el almacenamiento de energía a largo plazo en condiciones de inanición para la levadura, lo cual permite su supervivencia ante la falta de nutrientes y quizás se involucre en el proceso de esporulación (Lillie & Pringle, 1980; Wilson y col., 2010). Sin embargo, se ha observado que la capacidad de almacenar carbono no es una característica esencial para las levaduras, pues en *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* se han obtenido mutantes incapaces de acumular carbono en forma de glucógeno, lo que provoca un incremento en la acumulación de TAGs de hasta 60% en *Y. lipolytica*. Esto puede deberse a que la síntesis de glucógeno se encuentra en competencia con la síntesis de lípidos neutros debido a que ambos procesos de acumulación de fuentes de energía son respuesta a condiciones de inanición de nitrógeno (Bhutada y col., 2017). Aunque esta condición promueve la

acumulación de glucógeno, en un cultivo en medio rico suele encontrarse durante la fase estacionaria de crecimiento tras el agotamiento de una fuente de nitrógeno en el medio (Parrou y col., 1999).

En medios con baja disponibilidad de nitrógeno, como los medios lipogénicos, estas condiciones están presentes desde la fase de crecimiento exponencial, lo que explicaría la abundancia de estos gránulos observados a través de MET.

En levaduras, la síntesis de glucógeno depende de la actividad de la glucogenina, proteína iniciadora codificada por *GLG1* y *GLG2*, la glucógeno sintasa, enzima que cataliza la síntesis en masa de glucógeno codificada por *GSY1* y *GSY2*, y finalmente la proteína ramificadora codificada por *GLC3*. El primer paso en la síntesis del glucógeno es la generación de UDP-Glucosa por la UPDG pirofosforilasa, codificada por *UGP1* (Lomako y col., 2004; Wilson y col., 2010). La síntesis de glucógeno contiene múltiples puntos de regulación, como en la glucógeno sintasa, la cuál es inducida a nivel transcripcional a través de la vía de PKA o inhibida a nivel post-traducciona mediante fosforilación, condición que es revertida debido a la presencia de glucosa-6-fosfato, intermediario de la glucólisis y principal efector en la síntesis de glucógeno (François & Parrou, 2001). Así mismo, las cinasa Psk1p y Psk2p son responsables de la regulación de la UPDG pirofosforilasa en respuesta a estrés mecánico en la pared celular o a condiciones nutrimentales.

En conjunto, la complejidad de la regulación en la síntesis de glucógeno está íntimamente ligada a las condiciones similares a las que dan lugar a la síntesis de lípidos. Es por eso que Bhutada y col. (2017) encontraron que la síntesis de TAGs y la síntesis de glucógeno se encuentran en competencia al eliminar la glucógeno sintasa de *Y. lipolytica*. Sin embargo, independientemente de la posible respuesta de acumulación de carbono por parte de la célula en forma de granos de glucógeno, estas condiciones muestran que las células incrementan el tamaño de los cuerpos intracelulares menos electrodensos, que corresponden a los LDs, indicando que se induce la lipogénesis en *R. mucilaginosa*. En este caso, la disponibilidad del nitrógeno, es el factor determinante que induce la lipogénesis. Dado que estas condiciones representan un estrés nutrimental y tienen un efecto negativo en el crecimiento y la acumulación de biomasa, representan igualmente una dificultad en caso de tratar de implementar a *R. mucilaginosa* como vehículo en la producción de oleoquímicos a nivel industrial.

[N]

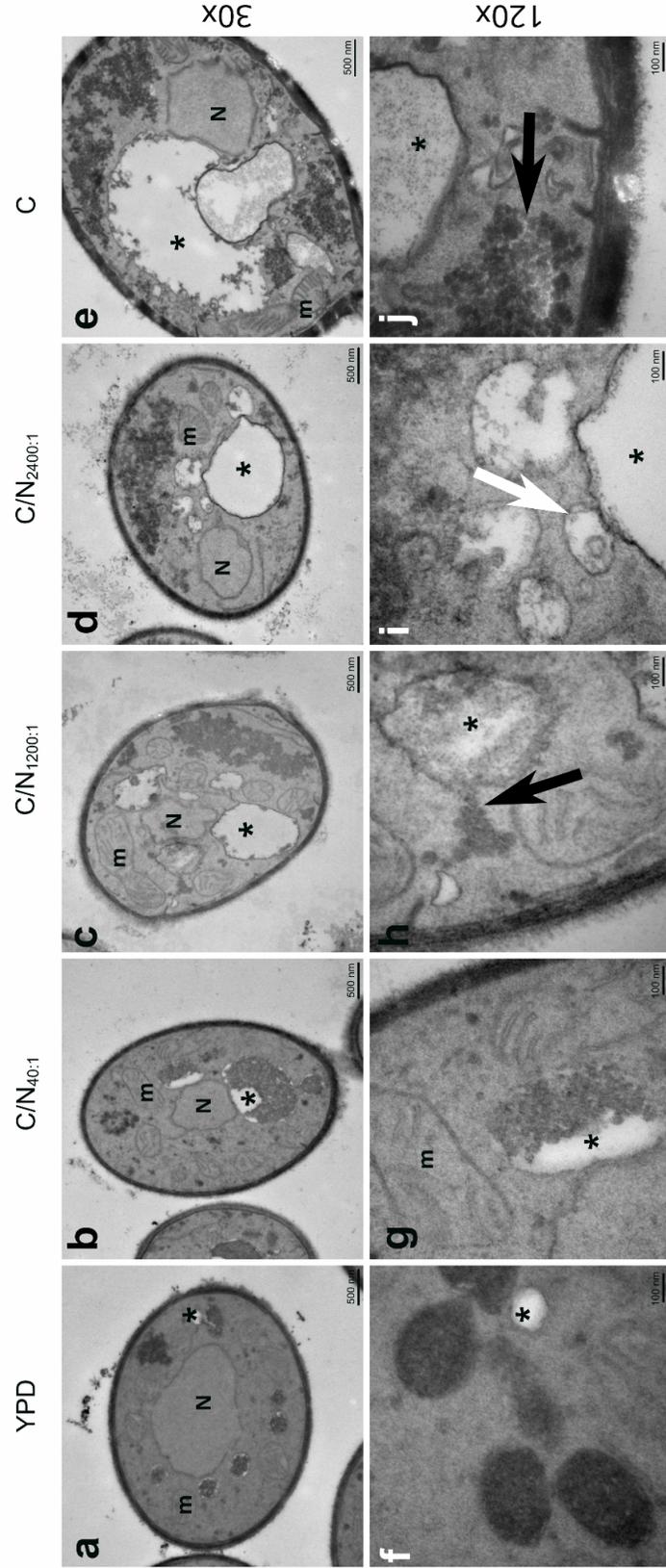


Figura 5: Observación de cambios ultraestructurales en *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno mediante TEM tras 18 h de cultivo. Micrografías de células expuestas a condiciones de medio rico YPD (a, f), estándar C/N_{40:1} (b, g), limitación de nitrógeno C/N_{1200:1} (c, h) y C/N_{2400:1} (d, i) e inanición de nitrógeno C (e, j). Barra de 500 nm en 30X, barra de 100 nm en 120X. N: núcleos, m: mitocondrias; *: LDs. Las flechas indican zonas granulares electrodensas, las flechas blancas indican la membrana monocapa.

[N]

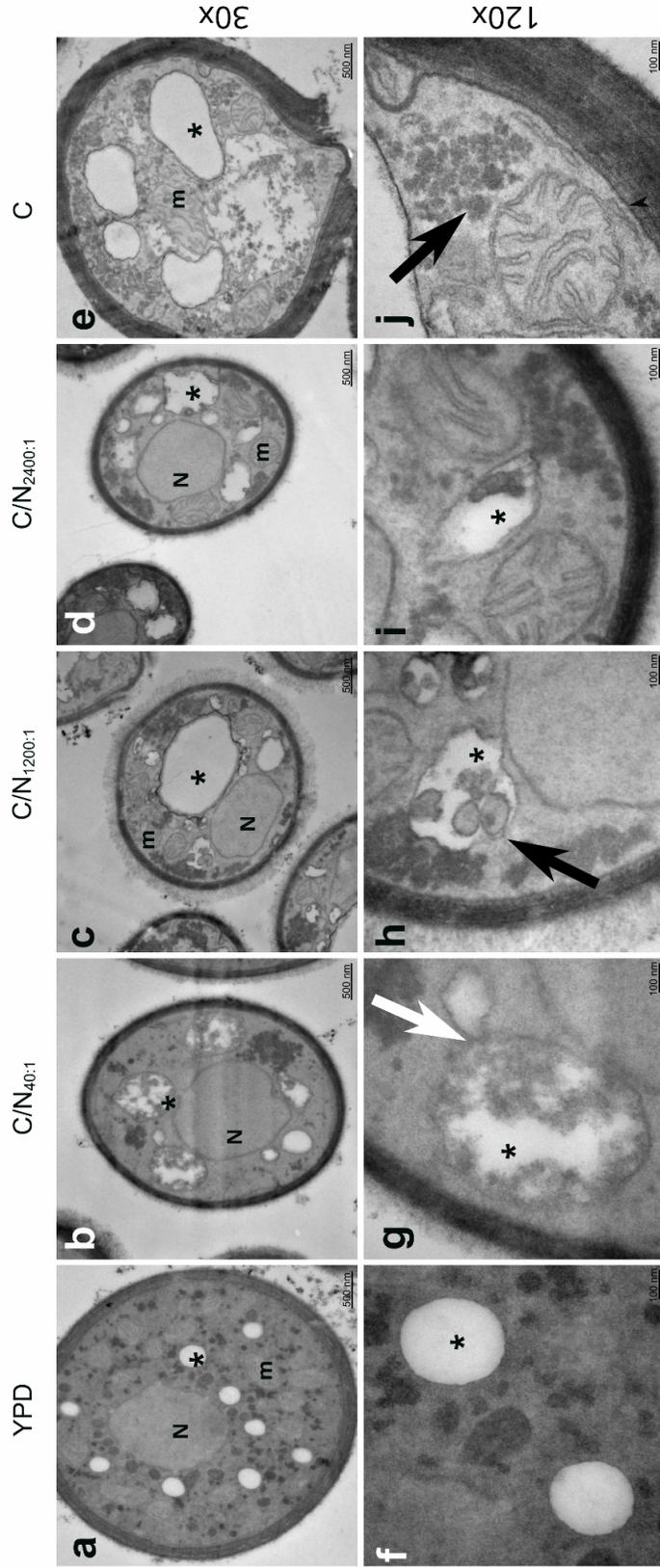


Figura 6: Observación de cambios ultraestructurales en *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno mediante TEM tras 48 h de cultivo. Micrografías de células expuestas a condiciones de medio rico YPD (a, f), estándar C/N_{40:1} (b, g), limitación de nitrógeno C/N_{1200:1} (c, h) y C/N_{2400:1} (d, i) e inanición de nitrógeno C (e, j). Barra de 500 nm en 30X, barra de 100 nm en 120X. N: núcleos, m: mitocondrias; *: LDs. Las flechas negras indican zonas granulares electrodensas, las flechas blancas indican membrana monocapa.

6.2.2. La acumulación de TAGs correlaciona con la disminución de nitrógeno

Las LDs constituyen los compartimientos intracelulares de reserva lipídica de los organismos, los cuales contienen TAGs. Con la finalidad de cuantificar la acumulación de TAGs en las condiciones lipogénicas descritas (cultivos de 24 h en medio C/N_{40:1}, C/N_{2400:1} y C), se realizaron mediciones mediante un ensayo colorimétrico usando el kit Triglycerides-LQ de Spinreact como se describe en Materiales y Métodos. El contenido de TAGs se expresó en peso seco de TAGs por peso seco de biomasa de un litro de cultivo (TAGs ng/ μ g).

En la **figura 7** se puede observar la acumulación de TAGs en las tres condiciones lipogénicas. La mayor acumulación de TAGs ocurre en la condición de inanición de nitrógeno (C), con una acumulación promedio marginalmente superior a 2 ng por μ g de peso seco, en comparación con los cultivos en condiciones de distinto C/N (**Figura 7**).

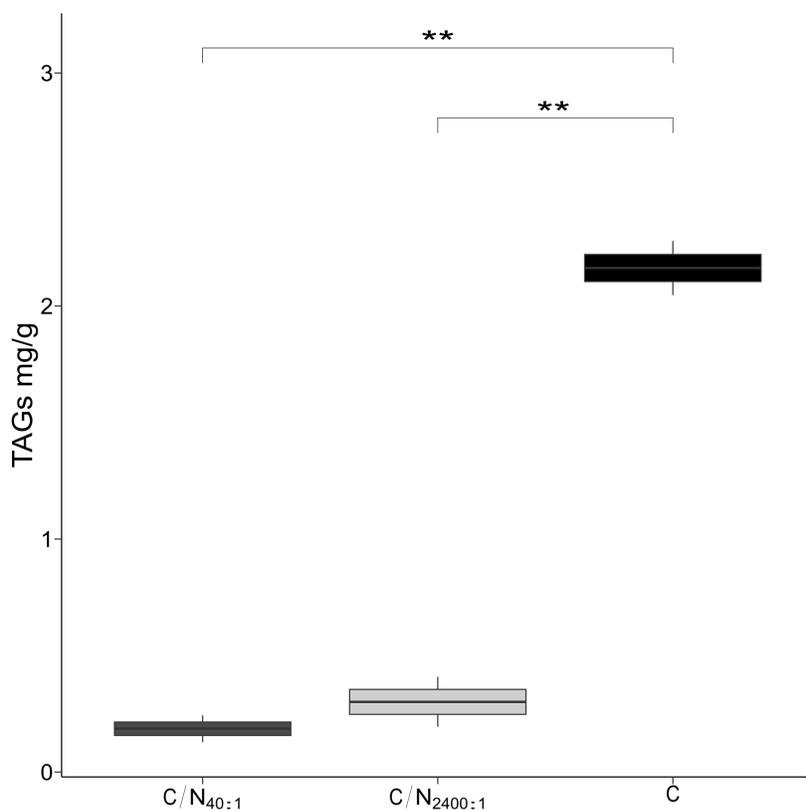


Figura 7: Cuantificación de TAGS de *R. mucilaginosa* en distintas condiciones de C/N y C. La cuantificación de TAGs de *R. mucilaginosa* se realizó en los medios descritos y se normalizó con respecto al peso seco obtenido (ng de TAGs/ μ g de pesos seco). **: diferencias significativas, *p-value* <0.001.

Dado que el contenido lipídico total de las levaduras oleaginosas como *Y. lipolytica* es 95 % TAGs y 5 % esterol ésteres (Zeng y col., 2018), estos resultados muestran un contenido máximo de TAGs en *R. mucilaginosa* aparentemente bajo en relación con el peso seco. En *R. mucilaginosa* se ha observado un contenido de lípidos totales de hasta 69.5 % de peso seco (Karatay & Dönmez, 2010). Sin embargo, este resultado depende en gran medida de otros factores, independientemente de las condiciones nutrimentales, tales como la cepa, la temperatura o el pH. Así mismo, una limitante importante en estos resultados es la capacidad de obtener cantidades suficientes de biomasa de *R. mucilaginosa* para llevar a cabo el análisis, puesto que la condición C no permite la acumulación de biomasa por la falta de nitrógeno en el medio, lo cual puede dificultar el desarrollo experimental.

6.3. Búsqueda de secuencias de algunos genes de la vía de la lipogénesis en *R. mucilaginosa*

6.3.1. Búsqueda de secuencias en una base local

Dado que los genes y las proteínas que están involucradas en la biosíntesis de lípidos en *R. mucilaginosa* no se encuentran anotados en el genoma de la base de datos del GenBank, se realizó una búsqueda *in silico* de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de algunos de los genes putativos principales que participan en la vía de síntesis de FAs y TAGs con las secuencias de otras levaduras (*ACLY*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*, *DGA1* y *PAH1*) como se describió en Materiales y Métodos.

Para identificar las secuencias de nucleótidos correspondientes a posibles ORFs dentro del genoma de *R. mucilaginosa*, se construyó una base de datos local con los genomas completos de distintas levaduras oleaginosas (**Tabla 4**), la cual se utilizó para llevar a cabo una búsqueda mediante BLAST. Asimismo, se corroboraron los resultados de este análisis utilizando las secuencias de aminoácidos de las proteínas de interés identificadas en otros estudios (Fakas, 2017; Zhu y col., 2012), así como secuencias de consulta para un análisis de tBLASTn contra la base de datos del genoma de *R. mucilaginosa* en la plataforma *Mycocosm* como se indica en Materiales y Métodos.

El análisis en la base local permitió identificar secuencias de nucleótidos con alta identidad en el genoma de *R. mucilaginosa* con respecto al genoma de otras levaduras (**Tabla 6**). Para cada caso, las secuencias variaron en el porcentaje de identidad y la cobertura (**Tabla 6**). Este

análisis permitió identificar los dos genes que codifican para la ATP citrato liasa (*ACLY*) en *Y. lipolytica*, encontrados en dos regiones con secuencias que se localizan en un *locus* del genoma de *R. mucilaginosa*. La región correspondiente a la subunidad 1 tiene una identidad de 75 % y una cobertura de 80 %, con un *E-value* de $7,195\,73 \times 10^{-24}$, mientras que la región correspondiente a la subunidad 2 tuvo una identidad de 68 % y una cobertura de 48 %, con un *E-value* de $7,587\,94 \times 10^{-92}$. Para el caso del gen que codifica la acetil coenzima A carboxilasa 1 (*ACC1*) en *R. toruloides*, se identificó una región en el genoma de *R. mucilaginosa* con una identidad de 84 % y cobertura de 91 %. En este mismo análisis, se comparó la secuencia putativa de *RmACC1*, identificada contra la secuencia correspondiente a la de *S. cerevisiae*, y se obtuvo un resultado de identidad de 22 % y cobertura de 27 %, con un *E-value* de 3×10^{-53} . En cambio, con las secuencias de *Y. lipolytica* y *Moesziomyces antarcticus* se obtuvo una identidad de 68 % y 76 %, y una cobertura de 49 % y 47 %, así como *E-value* de 8×10^{-125} y 0 respectivamente. Los alineamientos con las secuencias de los genes de las ácido graso sintasa 1 y 2 (*FAS1* y *FAS2*) se identificaron en dos regiones distintas dentro del *scaffold* 1 del genoma de *R. mucilaginosa*. Las identidades corresponden a 85 % y 89 %, y coberturas de 99 % con las de la levadura *R. toruloides* con un *E-value* de $5,2 \times 10^{-44}$.

La secuencia del gen de Dga1 (*DGA1*) es un caso particular, puesto que se encuentra reportada la secuencia de aminoácidos en la cepa KR de *R. mucilaginosa* (número de acceso KAG0656445), se realizó un nuevo análisis de tBLASTn de esta secuencia de aminoácidos con la base de datos local. El resultado de este alineamiento fue una identidad de 62 % y una cobertura de 91 % dentro del *scaffold* 6; sin embargo, al realizar el análisis utilizando las secuencias de consulta donde se incluía la secuencia de nucleótidos de *DGA1* de *R. toruloides*, el resultado arrojó una identidad distinta con otra región dentro del mismo *scaffold*, esta vez con una identidad de 67 % y una cobertura de 74 %, así como un *E-value* de $8,671\,66 \times 10^{-59}$.

Por último, se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos del gen *PAH1* de *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* y *R. toruloides*. Se identificó una región en el genoma de *R. mucilaginosa* con un porcentaje de identidad de 77 %; pero con una cobertura de tan sólo 8 %, por lo tanto, se realizó un análisis de tBLASTn con la secuencia de aminoácidos de la proteína Pah1 de *R. toruloides*. Este análisis identificó una región dentro del *scaffold* 12 con una identidad de 80 % y cobertura de 55 %.

A pesar de que las regiones encontradas dentro del genoma de *R. mucilaginosa* mostraron

alta identidad en cada búsqueda en los genomas de las levaduras *R. toruloides* y *Y. lipolytica*, estos análisis son poco concluyentes debido a que las secuencias de nucleótidos indicadas por los alineamientos se encontraron en algunos casos trunca, sin codones de inicio o de paro, por lo que no es fácil indicar el inicio y el término de cada ORF en el genoma de *R. mucilaginosa*.

Tabla 6: Especies de levaduras, cepas, genes y ORFs utilizados en el análisis de BLAST contra la base de datos local.

Gen	% de identidad de la secuencia alineada	% de cobertura del alineamiento	Especie
<i>RmACLY</i>	75	80	<i>Y. lipolytica</i>
<i>RmACC1</i>	84	91	<i>R. toruloides</i>
<i>RmFAS1</i>	84	99	<i>R. toruloides</i>
<i>RmFAS2</i>	82	100	<i>R. toruloides</i>
<i>RmPAH1</i>	45	94	<i>R. toruloides</i>
<i>RmDGA1</i>	80	55	<i>R. toruloides</i>

6.3.2. Análisis de secuencias utilizando la plataforma Mycocosm

Los resultados del análisis por BLAST en la plataforma local utilizando distintos genomas de levaduras permitió localizar secuencias de los genes *ACLY*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2*, *PAH1* y *DGA1* en el genoma de *R. mucilaginosa* (**Tabla 6**); pero no se pudo obtener el inicio y término de la secuencia de cada ORF. Por lo tanto, se realizó un nuevo análisis utilizando la base de datos de la plataforma *Mycocosm* como se describe en Materiales y Métodos. El análisis con las secuencias de aminoácidos mostró una identidad alta. La secuencia del gen *PAH1* tiene la identidad más baja con respecto al resto de las secuencias de los otros genes, pero tuvo un porcentaje mayor con respecto al análisis anterior (64%). Por otra parte, la secuencia de la enzima Fas1 es la más alta con respecto a todas las secuencias encontradas (90%) (**Tabla 7**).

La secuencia de la enzima de Acly de *R. toruloides* tiene una longitud reportada de 1157 aminoácidos (Zhu y col., 2012), mientras que la predicha para *R. mucilaginosa* tiene una longitud de 1035 aminoácidos. No está claro si el fragmento de diferencia entre la Acly de *R. toruloides* y *R. mucilaginosa* tiene alguna importancia en las características de esta enzima. El análisis de *Mycocosm* mostró que la secuencia de nucleótidos codificante para esta enzima tiene un tamaño de 4538 pb, que

incluye 6 intrones y 7 exones. La identidad de ambas secuencias tras el análisis de tBLASTn es de 88 % (**Tabla 7**). En *Y. lipolytica*, la Acl1 está conformada por dos subunidades (Acl1 y Acl2) (Fakas, 2017). Se ha reportado que la subunidad Acl1 tiene una longitud de 650 aminoácidos, mientras que Acl2 tiene una longitud de 497 aminoácidos, por lo que para cada subunidad se realizó el alineamiento por separado contra la secuencia entera predicha para *R. mucilaginosa*. Se encontraron identidades de 77 % y 57 %, respectivamente. Notablemente, Acl1 corresponde a la región C-terminal del péptido de *R. toruloides* y *R. mucilaginosa*, mientras que Acl2 corresponde a la porción N-terminal. Para el caso de la enzima Acc1, la secuencia de aminoácidos predicha por *Mycocosm* tiene una longitud de 2254 aminoácidos y la misma enzima en *R. toruloides* tiene una longitud de 2233 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos correspondiente a esta enzima tiene una longitud de 7974 pb, que incluye 6 intrones y 7 exones. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Acc1 de *R. mucilaginosa* vs. *R. toruloides* arrojó como resultado una identidad de 87 % (**Tabla 7**). Similar a este resultado, tras el alineamiento utilizando las secuencias de aminoácidos correspondientes a Acc1 de *R. diobovata*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* se obtuvieron identidades de 85 %, 57 % y 55 %, respectivamente.

Por otro lado, se ha reportado en levaduras que las proteínas Fas1 y Fas2 forman un complejo multimérico de 12 monómeros: 6 monómeros de la subunidad α y 6 monómeros de la subunidad β , componiendo una estructura supramolecular de 2.6 MDa, que es capaz de llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas que permiten la síntesis de ácidos grasos (K. Singh y col., 2020). En *S. cerevisiae*, la secuencia de aminoácidos de Fas1 tiene una longitud de 2051 aminoácidos, mientras que en *Y. lipolytica*, la enzima homóloga tiene una longitud de 1850 aminoácidos. En *R. toruloides*, Fas1 tiene una longitud de 2928 aminoácidos (Zhu y col., 2012). En comparación con esto, la secuencia predicha por *Mycocosm* para Fas1 de *R. mucilaginosa* tiene una longitud de 1540 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos codificante para este polipéptido tiene una longitud de 5286 pb e incluye 6 intrones y 7 exones. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *S. cerevisiae* mostró una identidad de 11 %, mientras que las secuencias de *R. toruloides* y *Y. lipolytica* tuvieron identidades de 90 y 52 %, respectivamente (**Tabla 7**). Algo que resulta interesante es el hecho de que la secuencia de Fas1 de *R. toruloides* tiene una longitud de casi el doble de la secuencia putativa de Fas1 de *R. mucilaginosa*, por lo que al realizar el alineamiento se observó

que la secuencia de aminoácidos de *R. mucilaginosa* muestra identidad solamente con la porción C-terminal de Fas1 en *R. toruloides*.

La secuencia de Fas2 de *R. toruloides* tiene una longitud de 1266 aminoácidos (Zhu y col., 2012), mientras que la secuencia predicha para *R. mucilaginosa* tiene un tamaño mayor, con 1874 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos correspondiente a éste polipéptido en *R. mucilaginosa* tiene un tamaño de 4175 pb, que incluye 3 intrones y 4 exones. El alineamiento de esta secuencia de *R. toruloides*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* permitió obtener porcentajes de identidad de 86 % y 10 % (**Tabla 7**). Las identidades correspondientes a *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* son notablemente bajas; sin embargo, entre sí, las secuencias de Fas2 de ambas levaduras tienen un porcentaje de identidad de 62 %. En *R. mucilaginosa*, Pah1 tiene una longitud de 1072 aminoácidos de acuerdo con la secuencia predicha por *Mycocosm*. En *R. mucilaginosa*, la secuencia de nucleótidos codificante para éste polipéptido tiene una longitud de 4748 pb, que incluye 8 intrones y 9 exones. En *R. toruloides*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*, esta proteína tiene longitudes de 1133, 723 y 862 aminoácidos, respectivamente. El alineamiento de éstas secuencias de aminoácidos dio como resultado identidades de 64 %, 60 % y 55 %, respectivamente (**Tabla 7**).

Finalmente, en el caso de la secuencia de Dga1, esta enzima tiene una longitud de aminoácidos de 418 (*S. cerevisiae*), 514 (*Y. lipolytica*) y 348 (*R. toruloides*). Mientras que en *R. mucilaginosa*, la secuencia de aminoácidos predicha por *Mycocosm* tiene una longitud de 666 aminoácidos, y la secuencia de nucleótidos es 2620 pb, que incluye 9 intrones y 10 exones. Los alineamientos de Dga1 de *R. toruloides*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae* contra la secuencia de *R. mucilaginosa*, resultó en identidades de 84 %, 51 % y 40 %, respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7: Especies de levaduras, cepas, genes y ORFs utilizados en el análisis de BLAST contra la base de datos local.

Proteína	<i>R. toruloides</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Acly	88	*77/57	-
Acc1	87	57	55
Fas1	90	52	11
Fas2	86	10	10
Acc1	64	60	55
Acc1	84	51	40

6.3.3. Modelado de secuencias con SWISS-Model

Con el fin de tener más información que apoyara los resultados obtenidos con los alineamientos de secuencias para las proteínas de interés, se realizó un *modelado de homología* utilizando la plataforma de SWISS-Model con las secuencias de aminoácidos obtenidas de cada enzima. El modelado permitió identificar las estructuras conservadas a partir de modelos tridimensionales con los cristales de las proteínas reportados en otros estudios y registrados en Protein Data Bank (PDB).

De las 6 proteínas descritas, en la plataforma de SWISS-Model se lograron encontrar cristales de 5 proteínas correspondientes a Acly, Acc1, Fas1, Fas2 y Pah1. Para el caso de la secuencia de Dga1, su estructura es similar a la de la porción C-terminal de la proteína NAA60 (acil-Coa N-aciltransferasa) de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, el análisis de BLAST con *Mycocosm* sugiere que NAA60 se encuentra en una región distinta del genoma, lo cual podría indicar que esta región de la secuencia de aminoácidos de Dga1 tiene identidad con la de NAA60, debido al dominio de transferasa que comparten. Los modelos obtenidos para las otras cinco casos proteínas en estudio se ajustaron mejor a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *Homo sapiens* (Acly) y *S. cerevisiae* (Acc1, Fas1 y Fas2) y *Tetrahymena thermophila* (Pah1) (**Tabla 8**).

Tabla 8: Estructuras cristalográficas de las proteínas utilizadas para el modelado por homología en SWISS-Model. RMSD= Raíz de la desviación estándar cuadrática media.

Proteínas modeladas	Organismo	ID en PDB	RMSD (Å)
Acly	<i>H. sapiens</i>	6POF	0.352
Acc1	<i>S. cerevisiae</i>	5CSL	0.352
Fas1	<i>S. cerevisiae</i>	6QL9	0.352
Fas2	<i>S. cerevisiae</i>	6QL9	0.352
Pah1	<i>T. thermophila</i>	6TZZ	0.352

Modelado de Acly (ATP Citrato Liasa)

Para el caso de la Acly se realizó un nuevo alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de *R. mucilaginosa* y *H. sapiens*. La identidad entre ambas enzimas es de 55% y el análisis de modelado de homología entre la estructura tridimensional de Acly de *R. mucilaginosa* contra la estructu-

ra cristalográfica de la enzima de *H. sapiens* (6POF en PDB) resultó en un RMSD (Raíz de la desviación estándar cuadrática media, medida de la cercanía entre los átomos del modelo y la proteína cristalizada) de 0,352 Å, así como en una similitud de 47% con cobertura de 95%. Esto demuestra no solamente la correspondencia estructural entre el modelo tridimensional de Acly de *R. mucilaginosa* con la proteína cristalizada de *H. sapiens*, sino también soporta la identidad de la secuencia de aminoácidos predicha como resultado del análisis de tBLASTn utilizando la plataforma de *Mycocosm*.

Se ha descrito que Acly es una proteína de aproximadamente 120 kDa al formar un homotetrámero donde cada monómero tiene un dominio N-terminal de acil-CoA sintasa (ASH) y un dominio C-terminal de citrato sintasa (CSH) (Chávez Cabrera y col., 2015; X. Wei y col., 2020). En la **Figura 8B** se puede observar el empalme entre las estructuras del monómero de la proteína cristalizada (modelo en color rosa) y el modelo de la Acly de *R. mucilaginosa*. En el modelo de Acly (**Figura 8A**), la región en color amarillo corresponde al superdominio ASH N-terminal, mientras que la región en color verde corresponde al superdominio CSH C-terminal. En rojo se señala la región conocida como “tallo” que une ambos superdominios de la proteína (Verschuere y col., 2019). Se identificaron residuos reportados como de importancia catalítica en la Acly de *H. sapiens*, principalmente S574, R576, E599 y K964 (X. Wei y col., 2020), que corresponden a los residuos S624, R626, S627, E649 y K1015 en la secuencia de aminoácidos de *R. mucilaginosa* (**Figura Anexa 1**).

Estos resultados indican que es muy posible que el polipéptido codificado en el ORF encontrado como resultado de los análisis de BLAST que corresponden al gen *ACLY* en *R. mucilaginosa*. Sin embargo, en la región C-terminal, correspondiente al superdominio CSH, Acly de *R. mucilaginosa* parece carecer de una porción significativa de la proteína en comparación a *H. sapiens*, *Y. lipolytica* o incluso *R. toruloides* (**Figura Anexa 1**). Sin embargo, como se observó anteriormente, *R. mucilaginosa* mantiene la producción de TAGs, lo cual se encuentra directamente relacionado con la funcionalidad de Acly que produce el citrato. Dilucidar el significado e importancia de esta diferencia requiere de análisis futuros que comparen la estructura y las características bioquímicas y funcionales de la proteína.

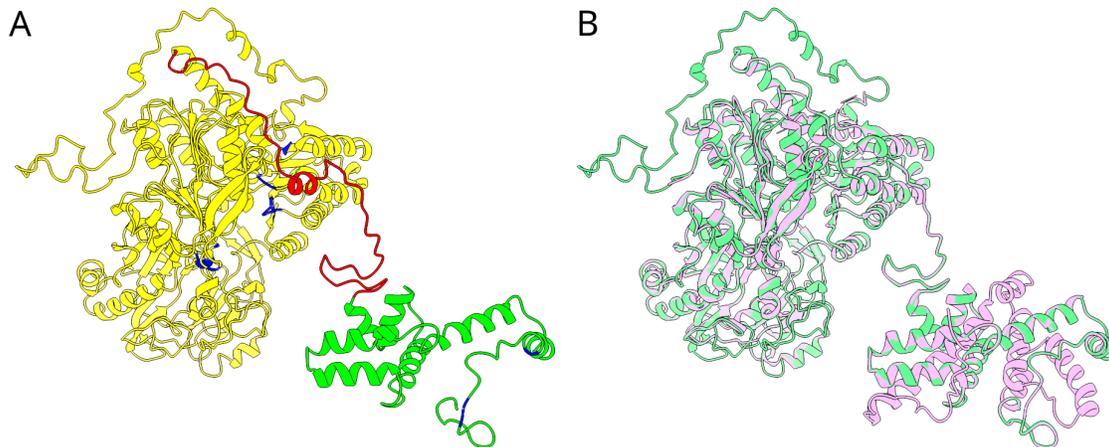


Figura 8: Comparación entre el modelo 3D de Acly predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Acly de *H. sapiens*. **(A)** Modelo 3D de Acly de *R. mucilaginosa* predicho por SWISS-Model. En amarillo, la región correspondiente al extremo N-terminal, el superdominio ASH. En verde, la región correspondiente al extremo C-terminal, el superdominio CSH. En rojo, la región conocida como “tallo” que une ambos superdominios. En azul, los sitios de importancia catalítica. **(B)** Ambos modelos 3D se encuentran empalmados en las zonas de mayor correspondencia estructural. En color verde el modelo de Acly predicho con SWISS-Model, en rosa la estructura del cristal 6pof de PDB correspondiente a Acly de *H. sapiens*. RMSD = 0.352.

Modelado de Acc1 (Acetil-CoA Carboxilasa)

Se realizó un modelado de homología para la Acc1 usando la secuencia de aminoácidos predicha por *Mycocosm* y el cristal 5CSL de la proteína de *S. cerevisiae* en PDB (**Tabla 8**), ya que ésta resultó ser la estructura con mejor ajuste al modelo (RMSD de 0,328 Å, similitud de 55 % y cobertura de 95 %), a pesar de que, como se observó en el análisis de tBLASTn, la identidad entre ambos polipéptidos es mínima. Sin embargo, el modelado de homología y el porcentaje de similitud muestran la estructura correspondiente entre ambas proteínas.

La Acc1 es un homodímero multidominio de 250 kDa. Dentro de la proteína, el dominio AC1 presenta una estructura de horquilla α -helicoidal, lo cual permite el anclaje de los monómeros y por tanto la formación de la holoenzima, cuya presencia es imprescindible para la actividad catalítica (J. Wei & Tong, 2015). En la **figura 9** se aprecian las estructuras tridimensionales del modelo del monómero de la Acc1 para *R. mucilaginosa* (verde) y el de la proteína cristalizada de *S. cerevisiae* (rosa). En color rojo se puede distinguir la estructura del dominio horquilla, el cual en *S. cerevisiae* está demarcado por los residuos 940 a 972, correspondientes a la región de los residuos 963 a 992 en *R. mucilaginosa*. Los residuos K73E, R76E y W487A en el dominio BC del extremo N-terminal también han sido reportados como de importancia catalítica (J. Wei & Tong, 2015), y corresponden

en *R. mucilaginosa* a los residuos K97, R100 y W510. Debido tanto a la correspondencia estructural como a la presencia del sitio de mayor importancia catalítica, éste análisis nos indica que el gen *RhACC1* muy posiblemente codifica la proteína Acc1 en *R. mucilaginosa*.

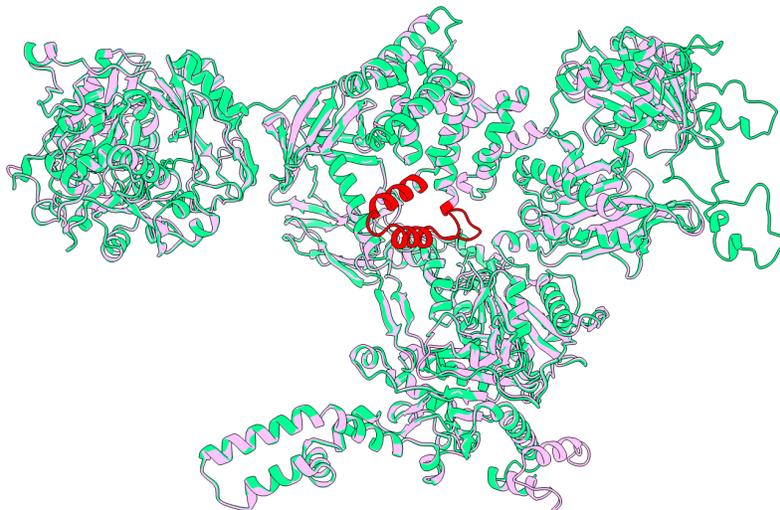


Figura 9: Comparación entre el modelo 3D de Acc1 predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Acc1 de *S. cerevisiae*. Ambos modelos 3D se encuentran empalmados en las zonas de mayor correspondencia estructural. En color verde el modelo de Acc1 predicho con SWISS-Model, en rosa la estructura del cristal 5csl de PDB correspondiente a Acc1 de *S. cerevisiae*. En rojo se indican los residuos de mayor importancia catalítica. RMSD = 0.328.

Modelado de Fas1 y Fas2 (Ácido graso sintasa 1 y Ácido graso sintasa 2)

Fas1 y Fas2 forman un complejo multimérico de 6 monómeros de cada subunidad. En *S. cerevisiae* ambas subunidades son proteínas multidominio con actividades catalíticas específicas. La subunidad Fas1 o β contiene los dominios ACP (*Acyl carrier protein*), KR (cetoreductasa), KS (cetosintasa) y PPT (panteteína transferasa), mientras que la subunidad Fas2 o α , contiene los dominios AT (acil transferasa), ER (enoíl reductasa), DH (deshidrogenasa) y MPT (malonil/palmitoil transferasa) (K. Singh y col., 2020).

En *R. toruloides*, tanto la organización de los dominios de ambas, proteínas como la nomenclatura que identifica a Fas1 y Fas2 difiere. Fas1 solamente contiene los dominios ER y AT, mientras que los dominios PPT, KS y KR se encuentran en Fas2 (Zhu y col., 2012). Asimismo Fas1 en *R. toruloides* corresponde parcialmente a la subunidad α que en *S. cerevisiae* es conocida como Fas2, y viceversa, con la subunidad Fas1, que corresponde con la subunidad β en *S. cerevisiae*. Se realizaron los modelados con SWISS-Model de Fas1 y Fas2, utilizando las secuencias obtenidas por los

análisis de BLAST con *Mycocosm* y las estructuras cristalográficas (**Tabla 8**) de ambas proteínas de *S. cerevisiae* depositadas en el PDB.

A pesar de que la identidad entre las secuencias de aminoácidos de Fas1 y Fas2 es mínima entre ambas especies de levaduras, se observó una correspondencia estructural clara. Aunque la discrepancia en la identidad entre las secuencias de aminoácidos de *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae*, y la organización de los dominios de ambas subunidades es distinta, la correspondencia estructural se mantiene. Sin embargo, esta discrepancia provoca que la estructura del cristal de Fas1 y Fas2 de *S. cerevisiae* contenga regiones que no corresponden al modelo de *R. mucilaginosa*, provocando que la comparación entre el modelo y el cristal en ambas proteínas resulte en un RMSD de 3,192 Å y 2,884 Å para Fas1 y Fas2, respectivamente. No obstante, al eliminar estas regiones de la comparación del modelo y el cristal de cada proteína, se obtienen RMSD de 0,250 Å y 1,019 Å, para ambas proteínas, respectivamente, y los porcentajes de similitudes y coberturas aumentan (45 % de similitud y 99 % de cobertura para Fas1, y 41 % de similitud y 92 % de cobertura para Fas2) en los modelos con relación a la proteína cristalizada. Esto esclarece la discrepancia entre el ajuste de los modelos a los cristales de ambas proteínas y la observación directa del empalme de estos (**Figura 10A y B**).

Precisamente la mayor diferencia entre las proteínas de ambas levaduras (*R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae*) se observa debido a la organización de las distintas regiones catalíticas que permiten la actividad del complejo Fas1/Fas2. No está claro, sin embargo, la importancia de esta organización. Distintos análisis pueden arrojar luz sobre si este fenómeno tiene o no implicaciones en la regulación o actividad del complejo, así como en la producción de FAs, sobre todo en relación a otras levaduras oleaginosas como *Y. lipolytica*, o no oleaginosas como *S. cerevisiae*.

Modelado de Pah1 (Ácido fosfatídico fosfatasa)

Así como se hizo para las proteínas Acl1, Acc1, Fas1 y Fas2, se realizó el modelado de homología utilizando la secuencia de aminoácidos, obtenida en *Mycocosm* y en la plataforma de SWISS-Model. Sin embargo, a diferencia de las proteínas anteriores, la estructura cristalográfica a la que mejor se ajusta no pertenece a una levadura, sino a *Tetrahymena thermophila*, el cual es un protozoo perteneciente al filo ciliophora.

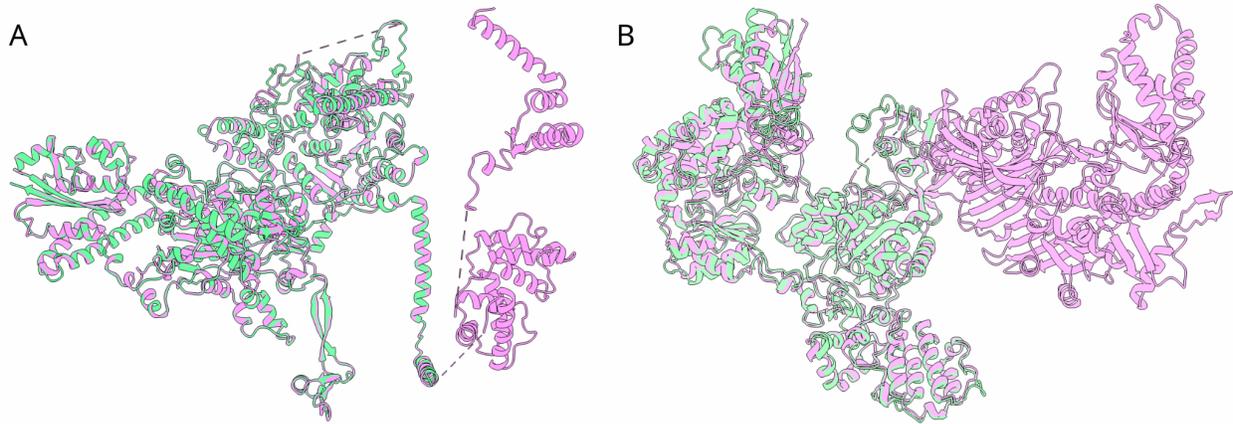


Figura 10: Comparación entre el modelo 3D de Fas1 y Fas2 predichos por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Fas1 y Fas2 de *S. cerevisiae*. Ambos modelos 3D se encuentran empalmados en las zonas de mayor correspondencia estructural. En color verde el modelo de Fas1 predicho con SWISS-Model, en rosa la estructura del cristal de PDB correspondiente de *S. cerevisiae*. **(A)** Modelo de Fas1 de *R. mucilaginosa* y estructura cristalográfica 6ql9 de la proteína de *S. cerevisiae*. **(B)** Modelo de Fas2 de *R. mucilaginosa* y estructura cristalográfica 6ql9 de *S. cerevisiae*. Fas1 RMSD = 0.25. Fas2 RMSD = 1.019.

Se encontró que no hay una correspondencia completa entre el modelo de Pah1 de *R. mucilaginosa* y la proteína cristalizada de Pah1 de *T. thermophila* (similitud de 42%, cobertura 22% y RMSD de 3.523) (**Figura 11**). Sin embargo, al eliminar la región que no cubre el modelo de Pah1 de *R. mucilaginosa*, el RMSD es de 0.17, indicando una correspondencia estructural parcial. Esto puede deberse a que la región que se alineó entre las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas está conservada. Por lo tanto, para esclarecer esta discrepancia fue necesario identificar los residuos de aminoácidos con importancia catalítica en ambas secuencias de aminoácidos utilizando el alineamiento de *R. mucilaginosa* vs *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* y *R. toruloides*.

Los residuos de importancia catalítica en Pah1 y específicamente la presencia de un *motif* de cinco aminoácidos llamado DxDxT han sido ya reportados (Khayyo y col., 2020). En *S. cerevisiae*, el dominio DxDxT corresponde a los residuos D398, I399, D300, G401 y T402. Después de realizar el alineamiento se pudo identificar este *motif* en la secuencia de aminoácidos de *R. mucilaginosa* en los residuos D695, I696, D697, G698 y T699, así como en las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las otras dos levaduras: *Y. lipolytica* y *R. toruloides*. Otros residuos de importancia catalítica como A444, R445, G529 y N530 en *S. cerevisiae* corresponden a S741, R742, G815 y N816 en *R. mucilaginosa*.

Es notable el cambio de A444 y S446 de *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* por S741 y A743 en *R. mucilaginosa* y *R. toruloides*. Aunque el cambio es por aminoácidos de propiedades fisicoquímicas distintas (de aminoácidos polares a no polares), el contexto es el mismo: donde los dos aminoácidos anteriores a A444 en *S. cerevisiae* y S741 en *R. mucilaginosa* son leucina y treonina, seguidos de una arginina, los sitios S446 en *S. cerevisiae* y A743 en *R. mucilaginosa* y, finalmente un aminoácido no polar que en *S. cerevisiae* es alanina (A447) y en *R. mucilaginosa* es isoleucina (I744) (**Figura Anexa 1**).

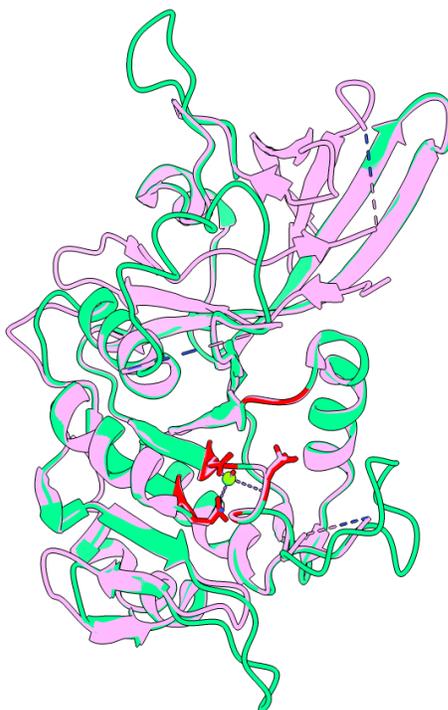


Figura 11: Comparación entre el modelo 3D de Pah1 predicho por SWISS-Model y la estructura cristalográfica de Pah1 de *T. thermophila*. Ambos modelos 3D se encuentran empalmados en las zonas de mayor correspondencia estructural. En color verde el modelo de Pah1 predicho con SWISS-Model, en rosa la estructura del cristal 6tzz de PDB correspondiente a Pah1 de *T. thermophila*. En rojo se indican los residuos de mayor importancia catalítica. RMSD = 0.17.

Modelado de Dga1 (Diacilglicerol-O-aciltransferasa)

Como se mencionó anteriormente, el análisis de homología de Dga1 no permitió establecer un modelo preciso de Dga1 de *R. mucilaginosa* con respecto a la proteína cristalizada de otro organismo. La porción C-terminal de NAA60 de *Arabidopsis thaliana* presenta una similitud de 28% y una identidad de 15.98% con Pah1 de *R. mucilaginosa*. Esto podría ser, dado que NAA60 es una acil

CoA N-aciltransferasa, presente en una gran cantidad de organismos incluyendo a *R. mucilaginosa*. Sin embargo, es notable que la secuencia de Pah1 obtenida en *Mycocosm* tiene una longitud de 666 aminoácidos, una mayor longitud que las secuencias de aminoácidos de Pah1 en otras levaduras como *S. cerevisiae* (418 aminoácidos), *Y. lipolytica* (514 aminoácidos), inclusive en *R. toruloides* (348 aminoácidos). Precisamente, en esta región de la secuencia, mediante SWISS-Model en donde se encuentra la mayor similitud con NAA60. Debido a lo anterior, la secuencia de aminoácidos predicha por *Mycocosm* tuvo que hacerse mediante la identificación de residuos de importancia catalítica o regiones conservadas (**Figura Anexa 1**).

Se identificaron sitios de importancia catalítica, un dominio putativo de unión a lípidos y el *motif* HPHG (Stone y col., 2006). El *motif* HPHG está altamente conservado en una gran cantidad de organismos y en *S. cerevisiae* se encuentra en los residuos 193 a 196, mientras que en la secuencia de aminoácidos de Pah1 de *R. mucilaginosa*, en los residuos 151 a 154. Otro sitio de importancia catalítica es el residuo G201 en *S. cerevisiae*, que corresponde a G159 en *R. mucilaginosa*. El dominio putativo de unión a lípidos se identificó a partir del dominio reportado en *S. cerevisiae* por Stone y col. (2006), el cual contiene una secuencia conservada con los residuos F71, V72 y L73.

Se observó que en *R. mucilaginosa* y *R. toruloides*, este dominio no es idéntico, ya que contiene cambios en L73, P74 e I75 o en L44, P45 e I46, respectivamente. Sin embargo, estos son aminoácidos con características estructurales y fisicoquímicas similares siendo todos aminoácidos neutros no polares.

6.4. La limitación de nitrógeno favorece la expresión de algunos genes de la lipogénesis

Para obtener el perfil de expresión de los ORFs identificados se cuantificó la expresión relativa mediante el análisis de RT-qPCR como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de RNA total se llevó a cabo durante la fase de crecimiento exponencial (18 h) en dos condiciones de cultivo previamente caracterizadas (C/N_{40:1} y C) y medio rico YPD como condición control. La eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5** se verificó por una curva estándar y las regresiones lineales se observan en la **Figura 12**. Los oligonucleótidos que mostraron eficiencias

de amplificación mayores al 90 % ($R^2 \geq 0.9$) se utilizaron para realizar el análisis de qPCR.

Los resultados de RT-qPCR se muestran en la **figura 12**, donde se pueden apreciar las veces de cambio (FC log2) de la expresión relativa de los genes putativos de la vía de síntesis de lípidos (*RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1*, *RmFAS2*, *RmDGA1* y *RmPAH1*) en las condiciones lipogénicas y la condición control. Los datos se normalizaron con la transcripción del gen *RmACT1*, que se ha reportado ampliamente en estudios de expresión génica como gen de referencia para el análisis de RT-qPCR (Landolfo y col., 2018).

Los genes *RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1* y *RmFAS2* presentan niveles similares del transcrito en las condiciones lipogénicas (C/N_{40:1} y C). En ambas condiciones, estos cuatro genes son regulados positivamente. Sin embargo, en la condición C/N_{40:1}, la expresión es mayor que en la condición control de medio rico YPD. En contraste, en la condición C estos mismos genes presentan un incremento menor que la condición C/N_{40:1} con respecto a la condición control. Inclusive, *RmACLY* presenta un nivel de expresión aún menor en la condición C que en la condición control, con un cambio negativo respecto a *RmACT1* (**Figura 13**). Estos cuatro genes son los primeros pasos en la vía de síntesis de lípidos en levaduras oleaginosas, por lo que es posible que este aumento se deba precisamente al estado metabólico de *R. mucilaginosa* durante las primeras horas de cultivo, correspondientes a la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, es notable la discrepancia de la expresión entre las condiciones C/N_{40:1} y C, pues la producción de lípidos alcanza niveles más altos en la segunda condición, como se vió anteriormente.

A las 18 h de cultivo, *R. mucilaginosa* se encuentra al final de la fase de crecimiento exponencial, próxima a la fase estacionaria de crecimiento, lo cual es un punto para el inicio en la acumulación de lípidos y la entrada a otros procesos celulares como la autofagia (Schepers & Behl, 2021). A diferencia de los cuatro genes anteriores, los genes *RmPAH1* y *RmDGA1* muestran una expresión menor, sobre todo en la condición control, pero el fenómeno es similar en las tres condiciones de cultivo.

Está ya establecido que la proteína de unión a elementos reguladores del esterol 1 (SREBP-1) es capaz de regular la transcripción de *ACLY* a partir de la unión a la secuencia promotora en dos *motifs* (Sate y col., 2000). Pero esta regulación transcripcional es independiente de la actividad enzimática de *Acly*. Hay otros mecanismos de regulación post-traduccionales involucrados en la

actividad de *Acly*, como la respuesta a cambios ambientales a través de la fosforilación de distintos residuos de la proteína o la promoción o prevención de la formación del homotetrámero (Bazilevsky y col., 2019; Chypre y col., 2012). Por lo tanto, a pesar de que se observó cómo la condición C es la condición lipogénica que promueve la síntesis de una mayor cantidad de TAGs en *R. mucilaginosa*, encontrar niveles bajos de transcrito es un fenómeno esperado debido a la desconexión de la regulación transcripcional y la regulación post-traducciona. En esta condición, incluso si la expresión de *RmACLY* parece ser baja en comparación con el medio control, la actividad de la enzima se ve regulada por otros factores más allá de la expresión genética.

Así como lo son *ACC1*, *FAS1* y *FAS2*, *PAH1* es uno de los genes controlados mediante el circuito de Henry, el cual emplea el complejo de activación transcripcional de Ino2-Ino4, el represor Opi1 y la proteína Scs2 para la regulación de la producción de fosfolípidos, la regulación transcripcional por este circuito se ve orquestada por la presencia de un elemento de activación sensible a inositol (UAS_{INO}) río arriba de los genes involucrados tanto en la vía de síntesis de fosfolípidos como en la de síntesis de ácidos grasos (Kwiatek y col., 2020; Wimalarathna y col., 2011).

El gen *PAH1* (*RmPAH1* en *R. mucilaginosa*) codifica la enzima Pah1, la cual es una fosfatasa de ácido fosfatídico directamente involucrada en el paso de ácido fosfatídico producto de los ácidos grasos generados por *Fas1*/*Fas2* a diacilgliceroles y en consecuencia es clave en la producción de TAGs. Esta proteína juega un papel importante en el almacenamiento de lípidos y el contenido lipídico de la membrana, lo cual tiene un efecto significativo en la homeostasis celular, y por tanto, su expresión debe ser regulada de forma estricta (Pascual & Carman, 2013).

En la literatura se ha establecido que Pah1 no se encuentra comúnmente en las células en estado de crecimiento exponencial y su expresión aumenta al comenzar la fase estacionaria (Khondker y col., 2022). Esta regulación temporal se conecta con la modulación de la producción de fosfolípidos a través de la expresión de distintos genes que contienen la secuencia UAS_{INO} mediante el circuito de Henry (Henry & Patton-Vogt, 1998), que responde a condiciones nutrimentales que regulan la producción de fosfolípidos, como la disponibilidad de inositol, colina, etanolamina, serina o zinc (Kwiatek y col., 2020). Esto explica los niveles basales de transcrito de *RmPAH1* a las 18 h de cultivo, pues en la fase de crecimiento exponencial las condiciones nutrimentales aún son favorables para la expresión de la vía de síntesis de fosfolípidos. Sin embargo, la presencia de transcrito de

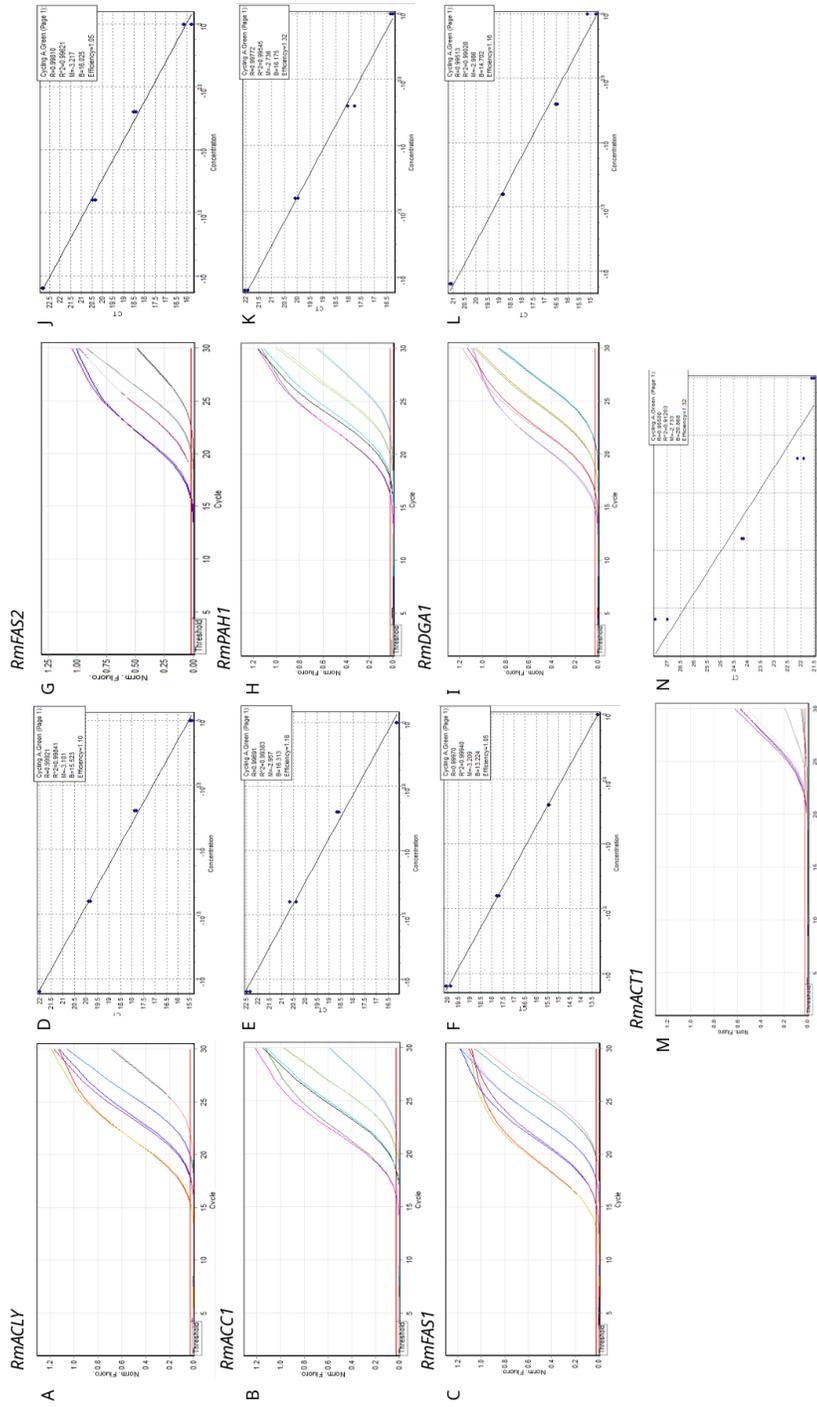


Figura 12: Evaluación de la eficiencia de los oligonucleótidos que se utilizaron para medir la expresión de genes de la vía de síntesis de lípidos mediante curva estándar por PCR cuantitativo utilizando diluciones seriadas de DNA genómico de *R. mucilaginosa*. A, B, C, G, H, I y M muestran las curvas estándar de los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de cada gen. D, E, F, J, K, L y N muestran las regresiones lineales y los valores de R² de cada curva y la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos correspondiente. El gen de referencia utilizado fue *RmACT1* (M).

RmACLY, *RmACC1*, *RmFAS1* y *RmFAS2* indica que la célula puede estar preparando el cambio metabólico en este punto hacia la producción de TAGs, principalmente debido a la presión nutricional que los medios lipogénicos ejercen. En la condición control, la represión de *RmPAH1* es aún más notoria probablemente debido a la abundancia de nutrientes del medio rico YPD, lo que permite mantener la expresión de la vía de síntesis de fosfolípidos en busca del crecimiento y acumulación de biomasa y no en el cambio metabólico de *R. mucilaginosa* hacia la producción de lípidos.

Con respecto a *RmDGA1*, se ha establecido con anterioridad que en *S. cerevisiae* la transcripción de *DGA1* se regula al alza durante la fase estacionaria de crecimiento o durante la fase de cambio de crecimiento diáuxico. Esta regulación muy probablemente se acopla a otros factores como la regulación de genes alternos a la síntesis de TAGs por la vía de Kennedy, como *LRO1* (Oelkers y col., 2002) o incluso probablemente a la de genes dentro de la misma vía de síntesis como *ACC1* (Tai & Stephanopoulos, 2013). Por lo tanto, el comportamiento que muestra el transcrito de *RmDGA1* en las tres condiciones analizadas es congruente con el patrón de regulación de *RmPAH1*. La fase estacionaria es el momento donde estos genes tienen un papel protagónico, redirigiendo el metabolismo de la síntesis de fosfolípidos a la acumulación de TAGs.

En conjunto, estos resultados son parcialmente congruentes con la observación mediante la microscopía de MET, debido a que tras 18 h de cultivo en medios lipogénicos, *R. mucilaginosa* es capaz de acumular lípidos, lo cual es respaldado con la observación del crecimiento de LDs, en comparación al crecimiento en YPD. Es importante recordar que los resultados obtenidos provienen de células cultivadas durante 18 horas, que refleja la última etapa de la fase de crecimiento exponencial (**Figura 4a**).

El estado metabólico de la célula puede verse reflejado en su expresión génica, sin embargo, para poder afirmar con certeza lo observado, será necesario replicar el análisis con una n mayor, además de que por sí solos, estos resultados son incapaces de explicar por completo la acumulación de lípidos en medios lipogénicos, debido a que parecen presentar una expresión mayor en el medio C/N_{40:1} que en C, cuando en las imágenes de MET muestran precisamente lo contrario, un mayor tamaño en las gotas lipídicas en el medio sin nitrógeno que con nitrógeno adicionado (**Figura 6b y e**). No obstante, esto puede ser una observación inicial sobre la dinámica de acumulación de TAGs

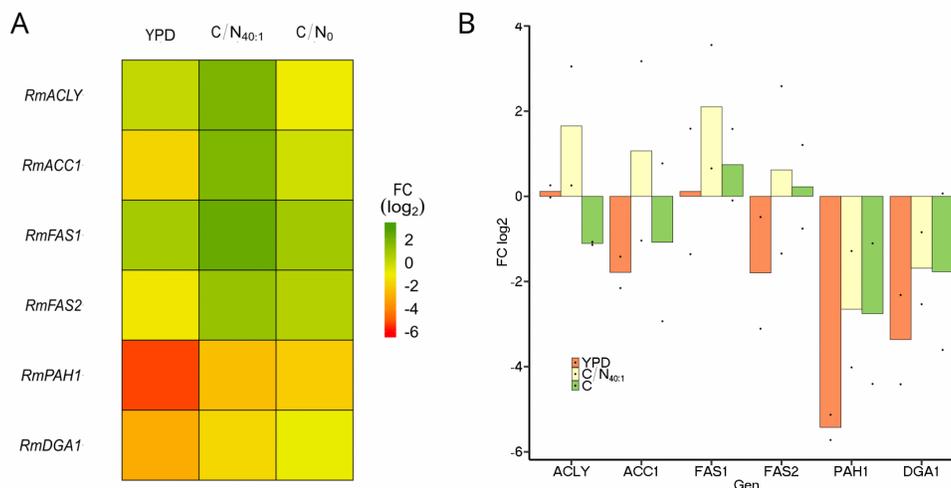


Figura 13: Análisis RT-qPCR de genes relacionados con la lipogénesis de *R. mucilaginosa* en diferentes condiciones en medio rico o limitación de nitrógeno. Se extrajo RNA total de células cultivadas en condiciones de YPD, C/N₄₀ y C/N₀ durante 18 h (columnas). La qPCR se realizó con DNA complementario (cDNA), utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos de los genes de *RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1*, *RmFAS2*, *RmPAH1* y *RmDGA1*. El número de veces de cambio se expresa como FC (\log_2). Los colores señalan el cambio de expresión relativa (rojo, menor abundancia del transcrito; verde, mayor abundancia del transcrito). $n = 2$. **(A)** Mapa de calor con la expresión relativa de los genes normalizados con respecto a *RmACT1*. **(B)** Gráfica de barras de la expresión relativa de los genes normalizados con respecto a *RmACT1*.

en términos de la expresión genética y su relación al posible estado metabólico de *R. mucilaginosa* (**Figura 14**). Es posible, por ejemplo, que la disminución de la expresión de *PAH1* se deba a que se encuentra en el punto de ramificación entre la producción de TAGs o fosfolípidos, por lo que la célula favorece en este punto la producción de fosfolípidos. Por otra parte, la normalización de la expresión relativa con el gen de actina (*RmACT1*) puede estar sesgada debido a la baja eficiencia que se obtuvo en la curva estándar (**Figura 12M**), por lo que se sugiere diseñar otros oligonucleótidos para mejorar la eficiencia de amplificación.

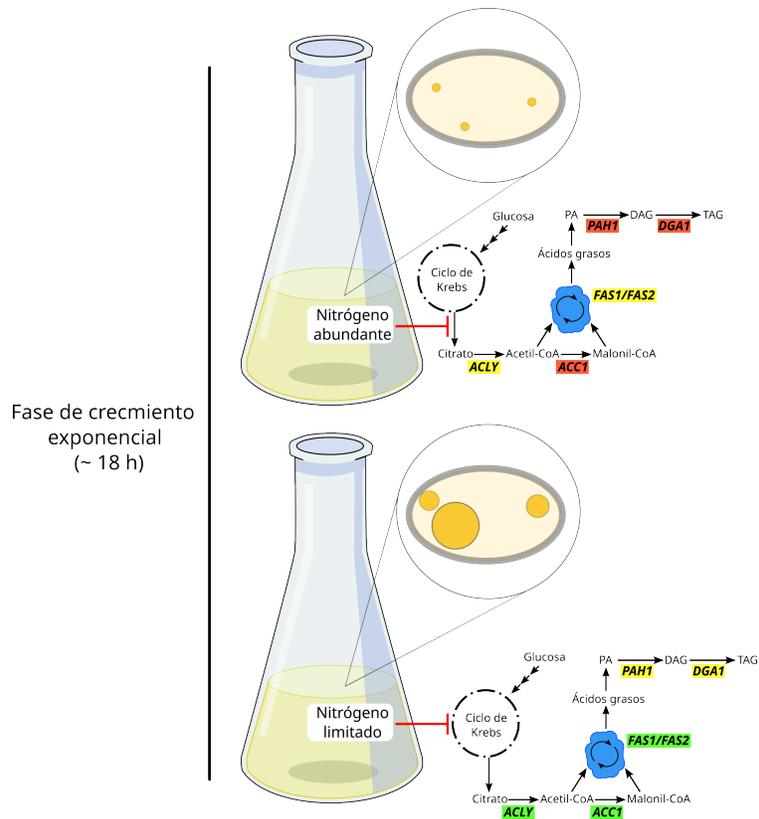


Figura 14: Esquema representativo de la expresión relativa y el estado metabólico hipotético de *R. mucilaginosa* durante 18 h de crecimiento. En cultivos con limitación de nitrógeno (inanición o poca disponibilidad), *R. mucilaginosa* acumula lípidos en LDs, lo cual se refleja en un incremento en la expresión de los genes del inicio de la vía de síntesis de ácidos grasos y una expresión relativamente menor en los genes de síntesis de TAGs. A diferencia, en cultivo con nitrógeno abundante, la acumulación de lípidos se ve disminuida, que se correlaciona con una menor expresión de los seis genes involucrados en la síntesis de FAs y TAGs.

7. Conclusiones

La levadura *R. mucilaginosa* acumula una mayor cantidad de TAGs en medios limitados. Esta acumulación es más evidente conforme la disponibilidad de nitrógeno disminuye, presentando un máximo de acumulación en ausencia total de nitrógeno. La acumulación de gotas lipídicas en las células observadas por MET es congruente con los datos de acumulación de TAGs.

Los análisis de BLAST y alineamientos permitieron identificar los marcos de lectura abiertos de los seis genes involucrados en la síntesis de FAs y TAGs, mientras que a través del análisis de modelado de homología se corroboró la similitud estructural de las enzimas correspondientes a *Acly*, *Acc1*, *Fas1*, *Fas2*, *Dga1* y *Pha1* de *R. mucilaginosa*. Esto nos indicó con certeza la identidad de las secuencias de nucleótidos, y permitió realizar el análisis de expresión de estos genes.

Finalmente, la expresión de *RmACLY*, *RmACC1*, *RmFAS1*, *RmFAS2*, *RmPAH1* y *RmDGA1* a las 18 h de crecimiento en condiciones de medio rico y en condiciones lipogénica indica que en la etapa de crecimiento exponencial *R. mucilaginosa* se encuentra en un estado metabólico que se prepara para comenzar a favorecer la producción de lípidos neutros como TAGs en lugar de lípidos de membrana como fosfolípidos. La regulación de *RmPAH1* parece ser clave en la decisión entre una u otra vía, lo cual se puede observar claramente al encontrarse regulada a la baja en condiciones de crecimiento exponencial. Este fenómeno se aprecia en la abundancia de gotas lipídicas tras 18 o 48 horas de cultivo, con una cantidad y tamaño mayor que en el resto de las condiciones de crecimiento. La reducción en la disponibilidad de nitrógeno induce la lipogénesis en *R. mucilaginosa*.

8. Perspectivas

En este trabajo se logró un primer paso en la caracterización de varios de los elementos involucrados en la síntesis de lípidos en *R. mucilaginosa*. Sin embargo, aún prevalecen varias cuestiones sin respuesta sobre la naturaleza del fenómeno de la acumulación de lípidos. En principio, los resultados aquí mostrados sobre la expresión de los genes involucrados en éste proceso celular requieren ser replicados con una n superior, de forma que el perfil de expresión sea establecido con mayor certeza. Asimismo, es necesario corroborar la acumulación de TAGs, ya que los resultados obtenidos aquí muestran niveles muy bajos en relación al peso seco del cultivo.

Con respecto al modelado de proteínas, es posible conducir análisis de acoplamiento molecular para dilucidar la manera en la que suceden las interacciones entre las enzimas, principalmente *ACLY* y *ACC1*, y las moléculas sobre las cuales llevan a cabo su actividad catalítica. Especialmente en *ACLY*, la falta de información sobre la región faltante de la proteína en comparación a *H. sapiens* o *Y. lipolytica* indica que es un camino por recorrer. Para este fin podría ser posible llevar a cabo análisis de sintenia que permitan conocer la naturaleza de la organización de los genes dentro del genoma de *R. mucilaginosa* y comparar con otras levaduras. Asimismo, análisis sobre la funcionalidad de *Acly* mediante mutaciones en el gen, comparando la presencia y ausencia del fragmento "faltante". Esto podría ser sencillo con los nuevos métodos de edición genética como CRISPR-Cas9. Además, estos métodos de edición genética pueden ser de gran utilidad al implementarlos en *R. mucilaginosa* en contextos de aprovechamiento biotecnológico, permitiendo su manipulación genética para superar los problemas de producción industrial que limita cultivar a las levaduras en medio mínimo limitados, de forma que la producción de lípidos pueda ser a costos menores.

Referencias

- Adrio, J. L. (2017). Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*, 1915-1920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.26337>
- Aksu, Z., & Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, *40*, 2985-2991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011>
- Al-Fageeh, M. B., & Smales, C. M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, *397*, 247-259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/BJ20060166>
- Araújo, K., Mahajan, D., Kerr, R., & Da Silva, M. (2017). Global biofuels at the crossroads: An overview of technical, policy, and investment complexities in the sustainability of biofuel development. *Agriculture*, *7*, 32. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE7040032>
- Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., & Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, *24*, 6314-6322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208773>
- Bazilevsky, G. A., Affronti, H. C., Wei, X., Campbell, S. L., Wellen, K. E., & Marmorstein, R. (2019). ATP-citrate lyase multimerization is required for coenzyme-A substrate binding and catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, *294*, 7259-7268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006685>
- Behr, A., & Seidensticker, T. (2020). The Basics of Oleochemistry - Basic Oleochemicals. *Chemistry of Renewables*, 37-60. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-61430-3_3
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J. L., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, *48*, 375-387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>
- Berna, F., Goldberg, P., Horwitz, L. K., Brink, J., Holt, S., Bamford, M., & Chazan, M. (2012). Microstratigraphic evidence of in situ fire in the Acheulean strata of Wonderwerk Cave, Northern Cape province, South Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 109, E1215-E1220. https://doi.org/https://doi.org/10.1073/PNAS.1117620109/SUPPL_FILE/PNAS.201117620SI.PDF
- Bhatia-Kissova, I., & Camougrand, N. (2021). Mitophagy in yeast: Decades of research. *Cells*, 10, 1-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells10123541>
- Bhutada, G., Kavscek, M., Ledesma-Amaro, R., Thomas, S., Rechberger, G. N., Nicaud, J. M., & Natter, K. (2017). Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 17, 20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOX020>
- Bialkowska, A. M., Szulczewska, K. M., Krysiak, J., Florczak, T., Gromek, E., Kassassir, H., Kur, J., & Turkiewicz, M. (2017). Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. *Polar Biology*, 40, 1787-1803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S00300-017-2102-7/FIGURES/5>
- Bohlouli, A., & Mahdavian, L. (2021). Catalysts used in biodiesel production: a review Catalysts used in biodiesel production: a review. *Biofuels*, 0, 1-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1558836>
- Botham, P. A., & Ratledge, C. (1979). A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 114, 361-375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-114-2-361>
- Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., & Claupein, W. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6581-6588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-013-5005-8>
- Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., & Lee, W. M. (2006). Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase. *Current Topics in Cellular Regulation*, 22, 143-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152822-5.50009-9>
- Carman, G. M., & Han, G. S. (2006). Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 31, 694-699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.10.003>

- Carrasco, M. A., Tan, J. C., & Duman, J. G. (2011). A cross-species compendium of proteins/gene products related to cold stress identified by bioinformatic approaches. *Journal Insect Physiology*, *57*, 1127-1135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2011.04.021>
- Chaturvedi, S., Gupta, A. K., Bhattacharya, A., Dutta, T., Nain, L., & Khare, S. K. (2021). Overexpression and repression of key rate-limiting enzymes (acetyl CoA carboxylase and HMG reductase) to enhance fatty acid production from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, *61*, 4-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/JOBM.202000407>
- Chávez Cabrera, C., Marsch, R., Bartolo-Aguilar, Y., Flores-Bustamante, Z. R., Hidalgo-Lara, M. E., Martínez-Cárdenas, A., Cancino-Díaz, J. C., Sánchez, S., & Flores-Cotera, L. B. (2015). Molecular cloning and characterization of the ATP citrate lyase from carotenogenic yeast *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Yeast Research*, *15*, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/femsyr/fov054>
- Chypre, M., Zaidi, N., & Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: A mini-review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *422*, 1-4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.144>
- Dahman, Y., Dignan, C., Fiayaz, A., & Chaudhry, A. (2019). An introduction to biofuels, foods, livestock, and the environment. En *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications* (pp. 241-276). Elsevier Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00013-8>
- Dahman, Y., Syed, K., Begum, S., Roy, P., & Mohtasebi, B. (2019). Biofuels: Their characteristics and analysis. En *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications* (pp. 277-325). Elsevier Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00014-X>
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, *15*, 508-517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/embr.201338170>
- Deligios, M., Fraumene, C., Abbondio, M., Mannazzu, I., Tanca, A., Addis, M. F., & Uzzau, S. (2015). Draft genome sequence of *Rhodotorula mucilaginosa*, an emergent opportunistic

- pathogen. *Genome Announcements*, 3, 201-216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00201-15>
- Donzella, S., Cucchetti, D., Capusoni, C., Rizzi, A., Galafassi, S., Chiara, G., & Compagno, C. (2019). Engineering cytoplasmic acetyl-CoA synthesis decouples lipid production from nitrogen starvation in the oleaginous yeast *Rhodospiridium azoricum*. *Microbial Cell Factories*, 18, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/S12934-019-1250-6/FIGURES/5>
- Evans, C. T., Scragg, A. H., & Ratledge, C. (1983). Regulation of citrate efflux from mitochondria oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides. *European Journal of Biochemistry*, 132, 609-615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1983.TB07407.X>
- 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*, 17, 292-302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.201600040>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biochemical Chemistry*, 226(1), 497-509.
- François, J., & Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 125-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2001.TB00574.X>
- Fukuda, T., & Kanki, T. (2018). Mechanisms and physiological roles of mitophagy in yeast. *Molecules and Cells*, 41, 35-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2214>
- Gan, H. M., Thomas, B. N., Cavanaugh, N. T., Morales, G. H., Mayers, A. N., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2017). Whole genome sequencing of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the chewing stick (*Distemonanthus benthamianus*): Insights into *Rhodotorula* phylogeny, mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis. *PeerJ*, 2017, e4030. <https://doi.org/https://doi.org/10.7717/PEERJ.4030/SUPP-2>

- Gawryluk, R. M. R., Eme, L., & Roger, A. J. (2015). Gene fusion, fission, lateral transfer, and loss: Not-so-rare events in the evolution of eukaryotic ATP citrate lyase. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *91*, 12-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2015.05.010>
- Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science*, *27*, 14-25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/PRO.3235>
- Gohain, M., Bardhan, P., Laskar, K., Sarmah, S., Mandal, M., Bora, U., Kalita, M. C., Goud, V. V., & Deka, D. (2020). *Rhodotorula mucilaginosa*: A source of heterogeneous catalyst for biodiesel production from yeast single cell oil and waste cooking oil. *Renewable Energy*, *160*, 220-230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2020.06.063>
- Granger, L. M., Perlot, P., Goma, G., & Pareilleux, A. (1992). Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *37*, 13-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00174195>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., & Buzzini, P. (2014). Changes in lipids composition and fluidity of yeast plasma membrane as response to cold. *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, 225-242. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_10/TABLES/2
- Han, M., y. Xu, Z., Du, C., Qian, H., & Zhang, W. G. (2016). Effects of nitrogen on the lipid and carotenoid accumulation of oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *39*, 1425-1433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00449-016-1620-y>
- Hasslacher, M., Ivessa, A. S., Paltauf, F., & Kohlwein, S. D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *268*, 10946-10952. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)82077-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)82077-4)
- Henry, S. A., & Patton-Vogt, J. L. (1998). Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, *61*, 133-179. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60826-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60826-0)

- Hiesinger, M., Wagner, C., & Schüller, H. J. (1997). The acetyl-CoA synthetase gene ACS2 of the yeast: *Saccharomyces cerevisiae* is coregulated with structural genes of fatty acid biosynthesis by the transcriptional activators Ino2p and Ino4p. *FEBS Letters*, *415*, 16-20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01085-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01085-5)
- Hunkeler, M., Stuttfeld, E., Hagmann, A., Imseng, S., & Maier, T. (2016). The dynamic organization of fungal acetyl-CoA carboxylase. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ncomms11196>
- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., & Schneiter, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, *124*, 2424-2437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1242/jcs.076836>
- Jarc, E., & Petan, T. (2019). Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *92*, 435-452.
- Kamisaka, Y., Tomita, N., Kimura, K., Kainou, K., & Uemura, H. (2007). DGA1 (diacylglycerol acyltransferase gene) overexpression and leucine biosynthesis significantly increase lipid accumulation in the Δ snf2 disruptant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, *408*(1), 61-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/BJ20070449>
- Karatay, S. E., & Dönmez, G. (2010). Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*, *101*, 7988-7990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.05.054>
- Kerkhoven, E. J., Kim, Y. M., Wei, S., Nicora, C. D., Fillmore, T. L., Purvine, S. O., Webb-Robertson, B. J., Smith, R. D., Baker, S. E., Metz, T. O., & Nielsena, J. (2017). Leucine biosynthesis is involved in regulating high lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *mBio*, *8*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MBIO.00857-17/ASSET/680AA0F0-F2D4-400A-884E-CAF6D8826873/ASSETS/GRAPHIC/MBO0031733570005.JPEG>
- Khayyo, V. I., Hoffmann, R. M., Wang, H., Bell, J. A., Burke, J. E., Reue, K., & Airola, M. V. V. (2020). Crystal structure of a lipin/Pah phosphatidic acid phosphatase. *Nature Communications*, *11*, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-020-15124-z>
- Khondker, S., Kwiatek, J. M., Han, G. S., & Carman, G. M. (2022). Glycogen synthase kinase homolog Rim11 regulates lipid synthesis through the phosphorylation of Pah1 phosphatidate

- phosphatase in yeast. *journaltitle of Biological Chemistry*, 298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102221/ATTACHMENT/9234AB45-E73A-48A0-A0B1-2B34AF735255/MMC2.XLSX>
- Knothe, G. (2010). History of vegetable oil-based diesel fuels. *The Biodiesel Handbook: Second Edition*, 5-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-62-2.50007-3>
- Kondo, K., Kowalski, L. R. Z., & Inouye, M. (1992). Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *journaltitle of Biological Chemistry*, 267, 16259-16265. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)41994-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)41994-1)
- Kot, A. M., Blazejak, S., Kieliszek, M., Gientka, I., & Brys, J. (2019). Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189, 589-607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-019-03023-z>
- Kot, A. M., Blazejak, S., Kurcz, A., Gientka, I., & Kieliszek, M. (2016). *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 6103-6117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>
- Köttig, H., Rottner, G., Beck, K. F., Schweizer, M., & Schweizer, E. (1991). The pentafunctional FAS1 genes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* are co-linear and considerably longer than previously estimated. *MGG Molecular & General Genetics*, 226, 310-314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00273618>
- Kuerschner, L., Moessinger, C., & Thiele, C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: How a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9, 338-352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00689.x>
- Kwiatek, J. M., Han, G. S., & Carman, G. M. (2020). Phosphatidate-mediated regulation of lipid synthesis at the nuclear/endoplasmic reticulum membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(1), 158434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.03.006>
- Landolfo, S., Ianiri, G., Camiolo, S., Porceddu, A., Mulas, G., Chessa, R., Zara, G., & Mannazzu, I. (2018). CAR gene cluster and transcript levels of carotenogenic genes in *Rhodotorula*

- mucilaginoso. Microbiology (United Kingdom), 164*, 78-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.000588>
- Lillie, S. H., & Pringle, J. R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology, 143*, 1384-1394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jb.143.3.1384-1394.1980>
- Lomako, J., Lomako, W. M., & Whelan, W. J. (2004). Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1673*, 45-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2004.03.017>
- Mamaev, D. V., & Zvyagilskaya, R. A. (2019). Mitophagy in Yeast. *Biochemistry (Moscow), 84*, 225-232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1134/S000629791914013X>
- Metzger, J. O., & Bornscheuer, U. (2006). Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Applied Microbiology and Biotechnology, 71*, 13-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S00253-006-0335-4/FIGURES/11>
- Mishra, V. K., & Goswami, R. (2017). A review of production, properties and advantages of bio-diesel. *Biofuels, 0*, 1-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1336350>
- Morgunov, I. G., Solodovnikova, N. Y., Sharyshev, A. A., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2004). Regulation of NAD⁺-Dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow), 69*, 1391-1398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S10541-005-0086-3/METRICS>
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J. T., & Sturley, S. L. (2002). The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *Journal of Biological Chemistry, 277*, 8877-8881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M111646200>
- Parrou, J. L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., & François, J. (1999). Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast, 15*(3), 191-203. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199902\)15:3<191::AID-YEA358>3.0.CO;2-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199902)15:3<191::AID-YEA358>3.0.CO;2-O)
- Pascual, F., & Carman, G. M. (2013). Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1831*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.006>

- Pasham, S., & Fakas, S. (2022). Citric acid cycle metabolites regulate phosphatidate phosphatase activity from the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *The FASEB Journal*, *36*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.s1.r4067>
- Pham, K. D., Shida, Y., Miyata, A., Takamizawa, T., Suzuki, Y., Ara, S., Yamazaki, H., Masaki, K., Mori, K., Aburatani, S., Hirakawa, H., Tashiro, K., Kuhara, S., Takaku, H., & Ogasawara, W. (2020). Effect of light on carotenoid and lipid production in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *84*, 1501-1512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1740581>
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism*, *21*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.014>
- Qiao, K., Abidi, S. H. I., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N., Ajikumar, P. K., & Stephanopoulos, G. (2015). Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, *29*, 56-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.005>
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A. P., & Wei, D. (2017). From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, *245*, 1507-1519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions*, *30*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/bst030a101>
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, *86*, 807-815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>
- Reue, K., & Wang, H. (2019). Mammalian lipin phosphatidic acid phosphatases in lipid synthesis and beyond: Metabolic and inflammatory disorders. *Journal of Lipid Research*, *60*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.S091769>
- Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02000-07>
- Romero-Aguilar, L., Guerra-Sánchez, G., Tenorio, E. P., Tapia-Rodríguez, M., Matus-Ortega, G., Flores-Herrera, O., González, J., & Pardo, J. P. (2020). Rapamycin induces morphological

- and physiological changes without increase in lipid content in *Ustilago maydis*. *Archives of Microbiology*, 202, 1211-1221.
- Rouhany, M., & Montgomery, H. (2019). Biodiesel. En *Biofuel and Biorefinery Technologies*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-00985-4_1
- Sate, R., Okamoto, A., I., J., Miyamoto, W., Sakai, Y., Emoto, N., Shimano, H., & Maeda, M. (2000). Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12497>
- Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K. D., & Thomas, D. Y. (2004). Cold Adaptation in Budding Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 5318-5328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Schepers, J., & Behl, C. (2021). Lipid droplets and autophagy – links and regulations from yeast to humans. *Journal of Cellular Biochemistry*, 602-611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.29889>
- Segal-Kischinevzky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L. D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G., & González, J. (2022). Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>
- Singh, K., Graf, B., Linden, A., Sautner, V., Urlaub, H., Tittmann, K., Stark, H., & Chari, A. (2020). Discovery of a regulatory subunit of the yeast fatty acid synthase. *Cell*, 180, 1130-1143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.034>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., & Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32, 1336-1360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>

- Siwina, S., & Leasing, R. (2021). Bioconversion of durian (*Durio zibethinus* Murr.) peel hydrolysate into biodiesel by newly isolated oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* KKUSY14. *Renewable Energy*, *163*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.138>
- Spagnuolo, M., Yaguchi, A., & Blenner, M. (2019). Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production. *Current Opinion in Biotechnology*, *57*, 73-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.011>
- Stone, S. J., Levin, M. C., & Farese, R. V. (2006). Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 40273-40282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M607986200>
- Tai, M., & Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, *15*, 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.007>
- Takahashi, H., McCaffery, J. M., Irizarry, R. A., & Boeke, J. D. (2006). Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Molecular Cell*, *23*, 207-217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.040>
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., & Kohlwein, S. D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*, 255-270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>
- Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco, M., Villarreal, P., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2017). Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, *40*, 649-658. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9>
- Verschueren, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S. N., & Verstraete, K. (2019). Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature*, *568*, 571-575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41586-019-1095-5>
- Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S., & Laoteng, K. (2012). Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: Involvement

- in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology*, *158*, 217-228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.051946-0>
- Wei, J., & Tong, L. (2015). Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature*, *526*, 723-727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature15375>
- Wei, X., Schultz, K., Bazilevsky, G. A., Vogt, A., & Marmorstein, R. (2020). Molecular basis for acetyl-CoA production by ATP-citrate lyase. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*, 33-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41594-019-0351-6>
- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, *324*, 1076-1080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1164097>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M., & Pozueta-Romero, J. (2010). Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*, 952-985. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x>
- Wimalarathna, R., Tsai, C. H., & Shen, C. H. (2011). Transcriptional control of genes involved in yeast phospholipid biosynthesis. *The Journal of Microbiology*, *49*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12275-011-1130-1>
- Xu, P., Qiao, K., & Stephanopoulos, G. (2017). Engineering oxidative stress defense pathways to build a robust lipid production platform in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, *114*, 1521-1530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.26285>
- Xue, S. J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y. F., Liu, G. L., & Jiang, H. (2018). Critical reviews in biotechnology fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*, 1049-1060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>
- Yang, S. T. (2006). Bioprocessing - from Biotechnology to Biorefinery. En *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50002-5>

- Zeng, S. Y., Liu, H. H., Shi, T. Q., Song, P., Ren, L. J., Huang, H., & Ji, X. J. (2018). Recent advances in metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for lipid overproduction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(3), 1700352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejlt.201700352>
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H., & Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodosporidium toruloides*. *Nature Communications*, 3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ncomms2112>

Anexos



Figura Anexa 1: Mapa de *RmACLY*, amplicones y alineamiento de secuencias de aminoácidos. (A) Mapa de la secuencia de nucleótidos. En azul regiones no codificantes (UTR), en rojo exones y en líneas grises intrones. Flechas púrpura indican la región de identidad de oligonucleótidos. **(B)** Secuencia de los amplicones correspondientes a las flechas en A. **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *ACLY* de *R. toruloides*, *Y. lipolytica*, *R. mucilaginosa* y *H. sapiens*. En amarillo se resalta la estructura de β -hairpin común entre las 4 secuencias de aminoácidos. En rojo se señala el dominio “tallo” entre los superdominios de Acly. En verde se señala la secuencia conservada entre las cuatro proteínas en el dominio ACS.



Figura Anexa 1: Mapa de *RmACC1*, amplicones y alineamiento de secuencias de aminoácidos. (A) Mapa de la secuencia de nucleótidos. En azul regiones no codificantes (UTR), en rojo exones y en líneas grises intrones. Flechas púrpura indican la región de identidad de oligonucleótidos. **(B)** Secuencia de los amplicones correspondientes a las flechas en **A**. **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *ACC1* de *R. toruloides*, *R. mucilaginoso*, *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* y *R. diobovata*. En rojo se resalta la región del dominio “horquilla” conservado en las secuencias de aminoácidos de las cinco levaduras. Las flechas negras indican sitios de importancia catalítica.



Figura Anexa 1: Mapa de *RmFAS1*, amplicones y alineamiento de secuencias de aminoácidos. (A) Mapa de la secuencia de nucleótidos. En azul regiones no codificantes (UTR), en rojo exones y en líneas grises intrones. Flechas púrpura indican la región de identidad de oligonucleótidos. **(B)** Secuencia de los amplicones correspondientes a las flechas en A. **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *FAS1* de *R. toruloides*, *Y. lipolytica* y *R. mucilaginosa*.

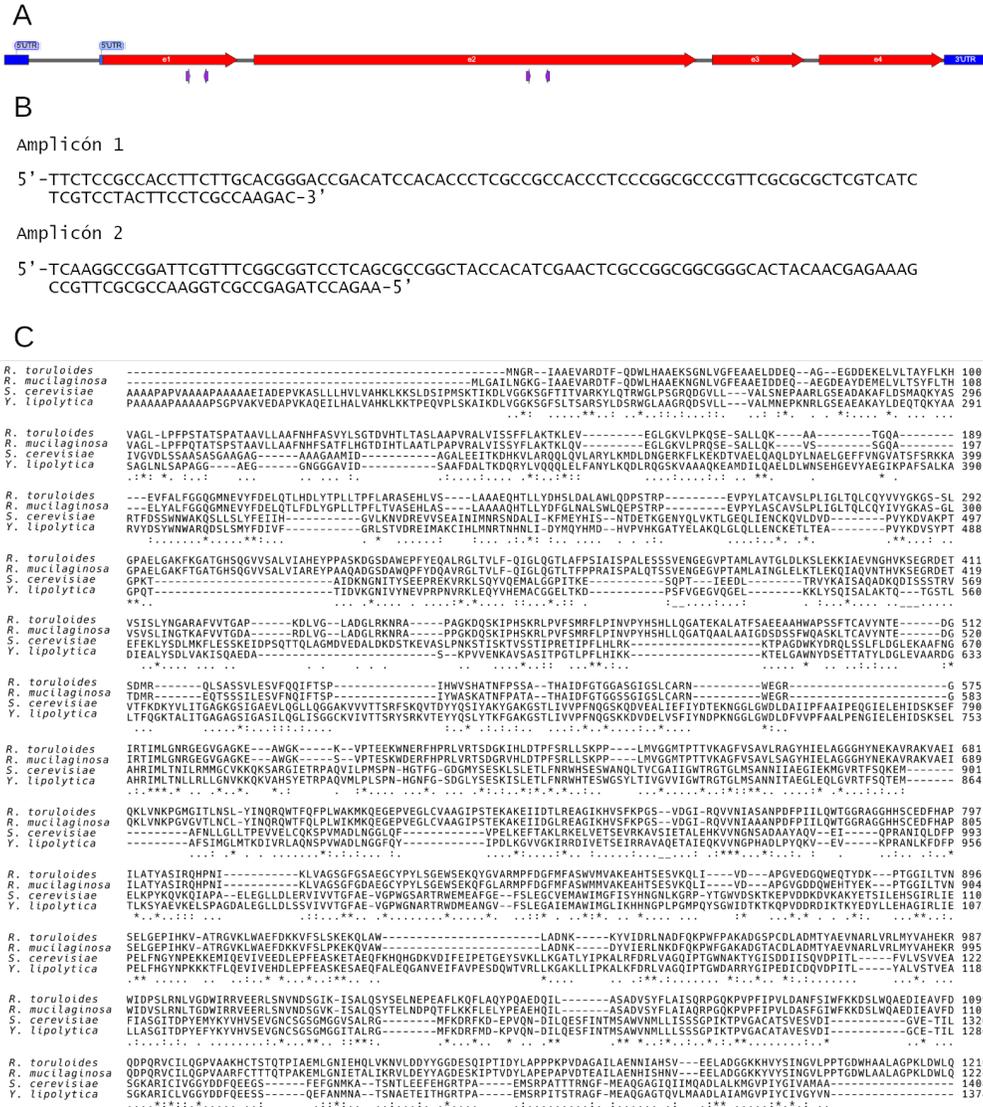


Figura Anexa 1: Mapa de *RmFAS2*, amplicones y alineamiento de secuencias de aminoácidos. (A) Mapa de la secuencia de nucleótidos. En azul regiones no codificantes (UTR), en rojo exones y en líneas grises intrones. Flechas púrpura indican la región de identidad de oligonucleótidos. **(B)** Secuencia de los amplicones correspondientes a las flechas en A. **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *FAS1* de *R. toruloides*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*.

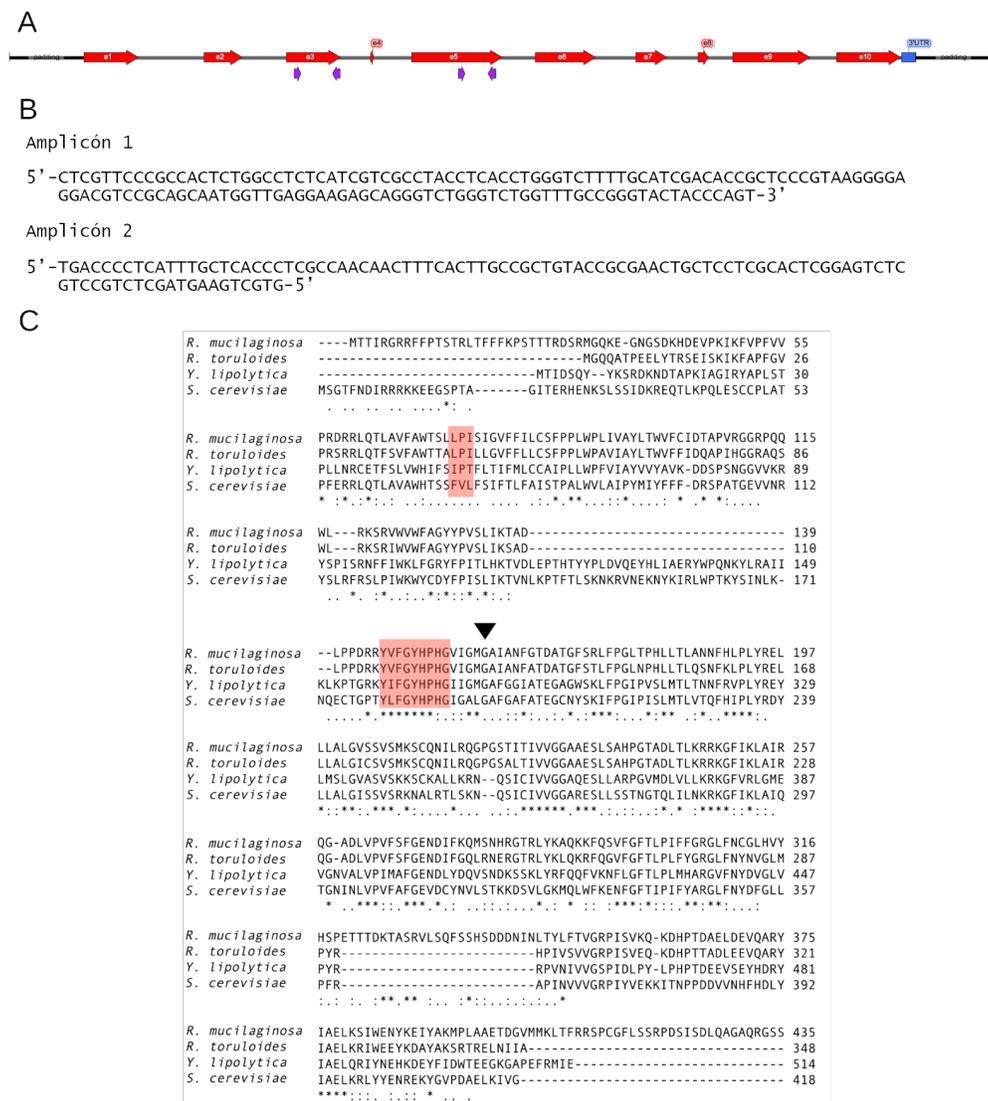


Figura Anexa 1: Mapa de *RmDGA1*, amplificones y alineamiento de secuencias de aminoácidos. (A) Mapa de la secuencia de nucleótidos. En azul regiones no codificantes (UTR), en rojo exones y en líneas grises intrones. Flechas púrpura indican la región de identidad de oligonucleótidos. **(B)** Secuencia de los amplificones correspondientes a las flechas en **A**. **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de *DGA1* de *R. mucilaginosa*, *R. torulooides*, *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*. En rojo se señalan las regiones conservadas de importancia catalítica. La flecha negra señala un residuo de aminoácido de importancia catalítica altamente conservado.