



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Modificación genómica dirigida de citocromo c oxidasa de
Xanthophyllomyces dendrorhous, mediante CRISPR-Cas9”**

T E S I S

Que presenta

IBT Itzel Miriam Juárez Ramos

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera**

Ciudad de México

Agosto, 2018

i. Agradecimientos

Se agradece el apoyo otorgado por la Dirección de Planeación y Operación de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por la beca nacional otorgada durante los estudios de maestría, con número de registro: **593256**.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, por todo su apoyo y acertadas observaciones durante toda mi estancia en el laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos, quién ha sido una valiosa guía en el camino de la ciencia. Así como, a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Roberto Ruíz Medrano y el Dr. Rodolfo Marsch Moreno, por sus observaciones a lo largo del proyecto que ayudaron a enriquecer mi formación durante mi posgrado. También les agradezco a los auxiliares: Q. Fernando Maldonado García, Dra. Zoila Rosa Flores-Bustamante, M.C. Joel Alba Flores, M.C. Brenda Yazmín Vargas Hernández, M.C. Leandro Alberto Nuñez Muñoz, por su asesoría científica y apoyo técnico durante la realización de la presente tesis. Así como a los técnicos: Humberto Morales Romero y David Flores Rojas. Dr. Miguel Jácome, gracias por su asesoramiento para la medición respirométrica. Dr. Cipriano Chávez, gracias por su apoyo durante las amplificaciones del gen *SCO1*.

A la luz de mis ojos, la persona más hermosa y más linda que te tenido el placer de conocer. Mami, eres lo mejor que me pudo pasar en la vida. Gracias a ti, todo por ti. Quiero algún día hacerte sentir tan orgullosa como yo lo estoy de ti.

A mi familia, los amo: Deni, Ulises, Cande, Pedro, Arturo, Fernando, Eduardo, Lety, Lulú, Ricardo, Óscar E., Esteban, Ángel, Luis, Clara, Óscar.

A todas las personas que hicieron que el estrés del posgrado disminuyera y fuera la etapa más divertida de mi vida, a los que me apoyaron sin importar nada, muchas gracias por todo:

Maribel, Lesly, Mayra, Naye, Anyelo, Daniel, Lupita, Mariana, Cecilia, Nico, Brenda, Toño, Karina, Gabriel, Fer, Pedro, Marlen, Mariela, Perla. Amigos de toda la vida, sin ustedes esto no hubiera sido posible, son lo mejor de mi vida. Su apoyo fue imprescindible para seguir adelante.

A las personas que hicieron del laboratorio 48 una familia: Anahí, José Manuel, Iris, Cipriano, Humberto, Lory; estar encerrada en el laboratorio no pesó, gracias a ustedes, no saben cuánto los quiero, team *Phaffia*. Por supuesto, “al ternurito”, Sr. Fer no sé cómo agradecerle todo lo que ha hecho por mí, como le dije, usted fue una de las razones por la que decidí quedarme en el laboratorio, ja, ja, ja, ja. Lo quiero demasiado, me encanta poderlo llamar amigo, es una persona increíble, tiene mucho ángel, ¡MIL GRACIAS!

Mis compañeros de maestría y amigos: Leandro, Jimena, Emmanuel, Lory, Magaly. Fue muy divertido pasar por esta etapa a su lado, los quiero.

Lalito, Jesús, Mariana: Son personas excepcionales y me encantó haberlos conocido. Gracias por su amistad y todos los lindos momentos a su lado.

A todos esos amigos que me topé en este bello lugar llamado CINVESTAV: Gabo, eres la onda, gracias por todo. Yolis, eres un amor, eres muy linda y tierna. Kevin, me pongo más hiperactiva con el café y me da arritmia, pero todo sea por echar chisme contigo y que me expliques cosas de físicos. Johan, gracias por todos los consejos. Abdi, siempre lleno de consejos y mucha risa. Lety, siempre con una sonrisa y con un muy buen consejo. Mike, gracias por ser mi Sensei. Chicos, sé que van a llegar lejos.

A mis pequeños amiguitos: Fernando, Laura, Ruth, Romi, Gabriel, Alaín, Daniela, Óscar, Mayra, Liz, Eduardo, Karen; sin ustedes todo hubiera sido muy aburrido, me encantó que formaran parte de mi vida. Son los mejores. Tantos momentos inolvidables a su lado.

Tengo la fortuna de que siempre encuentro a las personas indicadas en el momento justo, DEISA es lo mejor simplemente por ustedes, tal vez sea poco el tiempo, pero no saben cuánto los quiero y aprecio. Trabajar es tan divertido a su lado: Arelhy, Dianita, Iván, Ismael, Jimmy, Fanny, Anita, Briz, Ximena, Danny, PauPau, Graciela. ¡Los quiero muchísimo, gracias por todo!

No quiero olvidar a nadie. Brunito, siempre vas a ser esa persona que vino en la madrugada a salvar mis células competentes en fin de semana, te quiero. Emmanuel, gracias por alegrar mis jueves, team tomachi. Irwing, sin tu apoyo me hubiera hundido en la tristeza, gracias por ser tan buena persona.

ii. Dedicatoria

*A mi ángel guardián más hermoso, me faltaron días para decirte lo
mucho que te quiero. Siempre en mi mente y en mi corazón.*

Angelita.

A mis futuros hijos.

iii. Contenido

i. Agradecimientos	2
ii. Dedicatoria.....	4
iii. Contenido	5
iv. Tablas	8
v. Figuras.....	9
vi. Abreviaciones	10
vii. Parámetros cinéticos	12
viii. Abstract.....	13
ix. Resumen	15
1. Introducción.....	17
1.1 Carotenoides	17
1.2 Astaxantina	18
1.4 Inhibición de la cadena respiratoria	21
1.5 Citocromo c oxidasa	22
1.6 Proteína <i>SCO1</i>	24
1.7 CRISPR-Cas9.....	24
1.8 Respirometría	26
2. Justificación.....	27

3. Hipótesis del trabajo.....	28
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.2 Objetivos particulares	29
5. Estrategia experimental	30
6. Metodología	31
6.1 Materiales y métodos	31
6.1.1 Cepas y medios de cultivo	31
6.1.2 Plásmidos codificantes para Cas9	31
6.1.3 Extracción de DNA genómico	32
6.1.4 Generación de protoplastos.....	32
6.1.5 Electroporación de Xanthophyllomyces dendrorhous	33
6.1.6 Citometría de flujo para selección de células transformadas.....	34
6.1.7 Microscopía de fluorescencia.....	35
6.1.8 Extracción de carotenoides totales	35
6.1.9 Determinación de biomasa	36
6.1.10 Determinación de azúcares	36
6.1.11 Microrrespirometría de pulsos.....	37
7. Resultados y Discusión	40
7.1 Revisión bibliográfica	40

7.2 Plásmido pSpCas9 BB-2A-GFP PX 458.....	44
7.3 Generación de protoplastos.....	45
7.4 Selección de cepas transformadas con pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458).....	46
7.5 Confirmación de transformación de células de <i>X. dendrorhous</i> mediante microscopía de fluorescencia.	46
7.6 Fenotipos de células modificadas.....	48
7.7 Cinéticas de crecimiento de cepa WT y JR2-1 de <i>X. dendrorhous</i>	50
7.8 Producción de carotenoides de cepa WT y JR2-1 de <i>X. dendrorhous</i>	51
7.9 Estudios de microrrespirometría de pulsos en Microbiorreactores (MBRs).	54
7.10 Amplificación del gen <i>Sco1</i>	63
8. Conclusiones.....	66
9. Referencias.....	67

iv. Tablas

Tabla 1	32
<i>Iniciadores utilizados en este estudio</i>	
Tabla 2	41
<i>Polipéptidos que al sufrir alguna modificación, alteran el correcto funcionamiento de la COX.</i>	
Tabla 3	44
<i>gRNA's para la inactivación de SCO1 en X. dendrorhous</i>	
Tabla 4	59
<i>Parámetros cinéticos determinados mediante los datos arrojados por microrrespirometría por pulsos crecientes de la cepa WT y JR2-1, a pH 4 y 6.</i>	
Tabla 5	63
<i>Pares de iniciadores utilizados en el proyecto para corroborar la modificación del gen SCO1.</i>	

v. Figuras

Figura 1: Isopentenil pirofosfato (IPP).....	17
Figura 2: Molécula de astaxantina.	18
Figura 3: Estrategia experimental utilizada para el presente proyecto.....	30
Figura 4: Plásmido con la secuencia codificante para Cas9 y para el gRNA.....	45
Figura 5: Protoplastos de <i>X. dendrorhous</i>	45
Figura 6 Datos arrojados por el Citómetro de flujo	46
Figura 7: Emisión de fluorescencia.	47
Figura 8: "Papilas" presentes en las placas	48
Figura 9. Cultivos con medio 2YM de <i>X. dendrorhous</i>	49
Figura 10: Cinética de crecimiento de la cepa WT y JR2-1	50
Figura 11: Consumo de sustrato de la cepa WT y JR2-1.....	51
Figura 12: Cultivo de comparación cualitativa entre WT y JR2-1	52
Figura 13: Carotenoides totales ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	53
Figura 14: Carotenoides específicos ($\mu\text{g}/\text{g}$ de célula)	54
Figura 15: Respirograma de la cepa JR2-1 a pH 4	55
Figura 16: Ejemplo de determinación de K_{La}	56
Figura 17: Gráficos de Hanes-Woolf para las cepas WT y JR2-1	58
Figura 18: Promedio de $OUR_{\text{máx}}$ contra la concentración de sustrato	60
Figura 19: $OUR_{\text{máx}}$ vs tiempo	61
Figura 20: Gen SCO1 de <i>X. dendrorhous</i> (LN, GenBank)	64
Figura 21: Gel de agarosa al 1.5%.....	65

vi. Abreviaciones

<i>AOX</i>	Oxidasa alterna
<i>ATP</i>	Adenosín trifosfato
<i>Cas9</i>	<i>CRISPR associated</i>
<i>COX</i>	Citocromo c oxidasa
<i>CRISPR</i>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<i>DQO</i>	Demanda química de oxígeno
<i>DSB</i>	<i>Double strand break</i>
<i>F1</i>	Forward 1
<i>F2</i>	Forward 2
<i>Fi</i>	Forward inicio
<i>IPP</i>	Isopentenil pirofosfato
<i>MBRs</i>	Microbiorreactores
<i>MIM</i>	Membrana interna mitocondrial
<i>MR</i>	Microrrespirometría
<i>mtDNA</i>	DNA mitocondrial
<i>nDNA</i>	DNA nuclear
<i>NHEJ</i>	<i>Non homologous end joining</i>
<i>OD</i>	Oxígeno disuelto
<i>R1,2</i>	Reverse 1,2
<i>RA</i>	Respiración alternativa
<i>Ri</i>	Reverse inicio
<i>Sco1</i>	<i>Synthesis of cytochrome c oxidase</i> , proteína
<i>SCO1</i>	Gen de <i>Sco1</i>
<i>sgRNA</i>	<i>single-guide RNA</i>
<i>TALEN</i>	Nucleasas tipo activadores de transcripción

<i>TIM</i>	Translocón de membrana interna
<i>TOM</i>	Translocón de membrana externa
<i>ZFN</i>	Nucleasas de dedos de zinc

vii. Parámetros cinéticos

$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de crecimiento	d^{-1}
$K_L a$	Coefficiente de transferencia de oxígeno	h^{-1}
K_s	Constante de afinidad para sustrato	$mgDQOL^{-1}$
$OUR_{exm\acute{a}x}$	Velocidad exógena máxima de consumo de oxígeno	$mgO_2L^{-1}h^{-1}$
$OUR_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de consumo de oxígeno	$mgO_2L^{-1}h^{-1}$
$Y_{O_2/s}$	Rendimiento de oxidación del sustrato	gO_2DQOS^{-1}
$Y_{x/s}$	Rendimiento celular	$gDQOX * gDQOS^{-1}$

viii. Abstract

Xanthophyllomyces dendrorhous is a yeast capable of producing astaxanthin (Johnson, 2003), which is a carotenoid of economic importance due to its potent antioxidant capacity, even more than vitamin E (Chávez-Cabrera et al., 2010). Astaxanthin protect against reactive oxygen species (ROS) generated by the metabolism of *X. dendrorhous* (Johnson, 2003). The biosynthesis of this pigment is regulated by environmental, nutritional and gene stimuli (Martinez-Moya et al., 2011). Studies focusing on changes in yeast pigmentation, due to inhibitors of respiration, such as the use of antimycin A, have been shown to increase carotenoid biosynthesis (Johnson, 2003). Also, copper limitation has increased the pigment production. Copper is a cofactor of cytochrome c oxidase (COX), the terminal enzyme of the respiratory chain, suggesting that the effect is the result of a deficiency in electron transport (Flores-Cotera & Sánchez, 2001). Point mutations that cut off the respiratory chain to stimulate the astaxanthin production in *X. dendrorhous* has not been carried out to corroborate this hypothesis, reason why the objective of the present work is the inactivation of COX by the technique of genetic editing, CRISPR-Cas9. Cas9 is an endonuclease capable to generate a double-strand brake at a specific site of the target DNA, this enzyme is guided by a homologous RNA molecule to the target sequence, generating mutations with the capacity of inactivating a gene (Charpentier & Doudna, 2013). In this case the inactivation of COX was proposed.

Transformed *X. dendrorhous* cells with pSpCas9 BB-2A-GFP PX-458 plasmid, which expresses the Cas9 protein, different morphotypes were observed.

The JR2-1 strain, showed a higher production of specific carotenoids of 100 µg/g after 96 h and a variation in oxygen consumption, in contrast with the wild strain.

ix. Resumen

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura capaz de producir astaxantina (Johnson, 2003), un pigmento carotenoide de importancia económica debido a su potente capacidad antioxidante, incluso mayor a la de la vitamina E (Chávez-Cabrera, *et al.*, 2010). La astaxantina protege a las células de *X. dendrorhous* contra especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el metabolismo propio de la levadura o de aquellos que se encuentran en el hábitat de la levadura (Johnson, 2003). La biosíntesis de este pigmento es regulada por estímulos ambientales, nutricionales y génicos (Martínez-Moya, *et al.*, 2011; Martínez Cárdenas, *et al.*, 2018). Estudios sobre los cambios de la pigmentación de la levadura, debido a inhibidores de la respiración, como el uso de antimicina A, han mostrado que los inhibidores favorecen la biosíntesis del carotenoide (Johnson, 2003). Por otra parte, se ha encontrado que la limitación de cobre en el medio de cultivo también incrementa la producción del pigmento. El cobre funciona como cofactor para la citocromo c oxidasa (COX), la enzima terminal de la cadena respiratoria, lo que hace suponer que el efecto es el resultado de una deficiencia en el transporte de electrones (Flores-Cotera & Sánchez, 2001). Mutaciones puntuales que interrumpen la cadena respiratoria y que estimulen la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* no se ha llevado a cabo para corroborar esta hipótesis, por lo que el objetivo del presente trabajo es inactivar COX mediante una mutación dirigida conocida como CRISPR-Cas9. Cas9 es una endonucleasa capaz de cortar las hebras de la cadena doble del DNA en un sitio específico, la enzima es guiada al DNA blanco por una molécula de RNA homóloga a la secuencia de interés, generando mutaciones

capaces de inactivar un gen (Charpentier & Doudna, 2013). En este caso se planteó la inactivación de COX.

Células de *X. dendrorhous* transformadas con el plásmido pSpCas9 BB-2A-GFP PX-458, que expresa la proteína Cas9, presentaron diferentes morfotipos. La cepa JR2-1 mostró una producción mayor de carotenoides específicos de 100 µg/g al cabo de 96 h y una variación en el consumo de oxígeno, en comparación con la cepa silvestre.

1. Introducción

1.1 Carotenoides

Los carotenoides son terpenoides que conforman una familia de 600 diferentes moléculas, los cuales poseen como unidad básica estructural el isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 1) (Alcaíno, *et al.*, 2008). Los más comunes son aquellos que contienen anillos de seis carbonos en uno o en ambos extremos de la cadena poliénica, aunque también pueden poseer anillos de 5 carbonos o en algunos casos, ser acíclicos (Britton, 1996; Schmidt-Dannert, *et al.*, 2000).

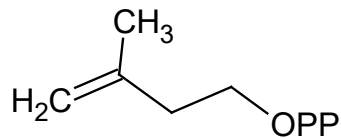


Figura 1: Isopentenil pirofosfato (IPP), unidad básica estructural de los carotenoides.

Pueden ser divididos en: i) *carotenos*, que se componen sólo por carbono e hidrógeno, o en ii) *xantofilas*, que en su estructura además de carbono e hidrógeno también poseen oxígeno. Las xantofilas pueden presentar grupos OH (zeaxantina), grupos alcoxi (cantaxantina) o con una combinación de ambos grupos (astaxantina) (Alcaíno, *et al.*, 2008).

Diversos organismos, incluyendo a bacterias, algas, mohos y levaduras, poseen la maquinaria molecular para producir carotenoides naturalmente, mientras que los animales no tienen la capacidad de sintetizarlo, pero pueden ser suministrados en su dieta. Los carotenoides cumplen diferentes funciones, como moléculas fotosintéticas, antioxidantes, precursores de la vitamina A, pigmentos

involucrados en la atracción visual de polinizadores de flores, entre otras (Frengova & Beshkova, 2009). Gracias a todas las bondades que poseen estas moléculas, su uso se ha extendido a la industria química, alimentaria, farmacéutica y acuicultura (Gil-Hwan, *et al.*, 1989; Schmidt-Dannert, *et al.*, 2000). Evidencia científica sugiere que el desarrollo de enfermedades desencadenadas por la generación de radicales libres, tales como la arteriosclerosis, cataratas, esclerosis múltiple y cáncer puede retrasarse con el consumo de dietas ricas en carotenoides (Baker & Günther, 2004). Además, se investiga su posible capacidad antitumoral (Dufossé, 2006; Brehm-Stecher & Johnson, 2012; Ambati, *et al.*, 2014).

1.2 Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4-4'-diona) es un carotenoide de color rosado-anaranjado, clasificado dentro de las xantofilas (Figura 2).

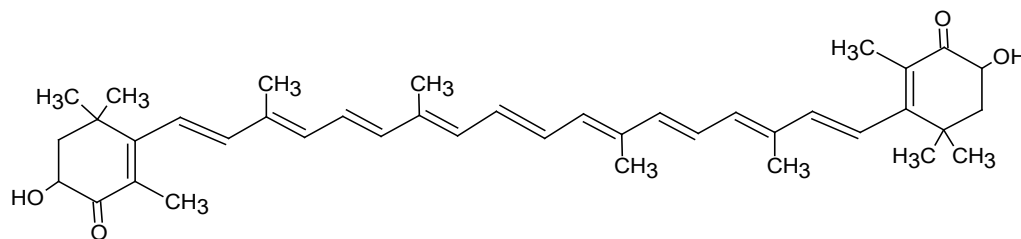


Figura 2: Molécula de astaxantina.

Los dobles enlaces conjugados pueden actuar como antioxidantes al donar sus electrones en una reacción con los radicales libres del medio, permitiendo convertirlos en productos más estables. Esta reacción protege a los lípidos contra peroxidación y daño oxidativo de LDL-colesterol, membranas celulares, células y tejidos (Hu, *et al.*, 2006).

La principal ventaja de la astaxantina frente a otros carotenoides, es la capacidad que tiene la molécula para atravesar o alojarse en las membranas celulares, lo que mejora su capacidad biológica como antioxidante (Ambati, *et al.*, 2014). La astaxantina ha mostrando una actividad antioxidante aproximadamente diez veces mayor que otros carotenoides, incluso de 100 a 500 veces mayor que los tocoferoles (Vitamina E) (Chávez-Cabrera, *et al.*, 2010).

Otras funciones biológicas importantes que desempeña es la protección contra los efectos de la luz UV, provocando una buena visión y salud ocular, y se ha observado que incrementa la respuesta inmune (Ambati, *et al.*, 2014). Este pigmento puede ser producido por métodos químicos, aunque la principal limitante de este tipo de producción, es la generación de enantiómeros (Hu, *et al.*, 2006). También puede ser sintetizado por algunos organismos como: *Brevibacterium*, *Mycobacterium lacticola*, *Agrobacterium auratim*, *Haematococcus pluvialis*, y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ye, *et al.* 2012).

X. dendrorhous y *Haematococcus pluvialis*, son los organismos con mayor síntesis de astaxantina conocidos (Rodríguez-Sáiz, *et al.*, 2010), pero la levadura posee ventajas para su producción a gran escala, gracias a su rápido crecimiento, fácil manejo (Wu, *et al.*, 2011), y su capacidad de flujo metabólico hacia la ruta de los terpenos (Yamamoto, *et al.*, 2016). La síntesis de este carotenoide en *X. dendrorhous* se lleva cabo por la vía del mevalonato y se ha sugerido que su síntesis es un mecanismo de defensa contra especies reactivas debido a la falta o la muy disminuida actividad de algunas enzimas antioxidantes (An & Johnson, 1990).

1.3 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

La levadura moderadamente psicrófila, *X. dendrorhous* (estado asexual *Phaffia rhodozyma*), es un hongo basidiomiceto, miembro de los Tremellomycetes, del orden de los Cystofilobasidiales. Originalmente fue aislada de exudados de árboles del género *Betula* y de otros árboles de hoja ancha. Este microorganismo tiene la capacidad de sintetizar astaxantina (Sharma, *et al.*, 2015) y como ya se había mencionado, es una de las pocas fuentes naturales de este pigmento (Loto, *et al.*, 2012).

Existen cepas diploides o poliploides de *X. dendrorhous* (Schmidt, *et al.*, 2011), no obstante, experimentos de separación electroforética de cromosomas han encontrado algunas cepas haploides (Wery, *et al.*, 1997), como la cepa ATCC 96594 utilizada en el presente proyecto. Una cepa haploide permite la identificación más fácil de mutaciones con un análisis mutacional clásico, además, una mutación es heredada a la progenie, obteniendo células hijas idénticas con estabilidad genómica (Becker & Lundblad, 2001).

La síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* puede o no estar asociada al crecimiento, pero también puede ser afectada por estímulos ambientales, nutricionales y génicos (Martinez-Moya, *et al.*, 2011).

Flores-Cotera y Sánchez (2001), describen un aumento en la producción de astaxantina por una limitación de cobre en el medio de cultivo, lo que hace suponer que provoca un desbalance en la homeostasis del cobre, afectando diferentes

enzimas, entre ellas la oxidasa terminal de la cadena respiratoria, citocromo c oxidasa (COX), que posee un centro activo dependiente de cobre. Estos resultados son sustentados por Martínez-Cárdenas, *et al.*, en 2018, en dónde la limitación de cobre afecta positivamente el contenido y concentración final de carotenoides en las células de *Phaffia rhodozyma*.

1.4 Inhibición de la cadena respiratoria

Varios estudios han encontrado que en cultivos de *X. dendrorhous* suplementados con inhibidores de la respiración (cianuro, antimicina, tunicamicina, azida, etc.) la síntesis de astaxantina puede ser estimulada (An & Johnson, 1990; Schroeder & Johnson, 1993; Johnson, 2003).

Cuando la parte terminal de la cadena respiratoria es inhibida por la presencia de antimicina A, cianuro o azida, se ha observado también, la activación de una respiración alternativa mediada por una oxidasa alterna (AOX) que es insensible a dichos inhibidores (Rogov & Zvyagilskaya, 2015). La AOX provee una ruta alternativa para el desfogue de electrones, catalizando la oxidación intramitocondrial de ubiquinol, acoplado con la reducción de oxígeno molecular a agua (Bakker, *et al.*, 2001). Esta vía permite oxidar el excedente de NADH, causado por el catabolismo de azúcares cuando la cadena respiratoria principal se encuentra inhibida, aunque la oxidación ocurre lentamente (Chávez-Cabrera, *et al.*, 2010).

El incremento de la actividad de la AOX también se ha relacionado con la limitación de iones de cobre y hierro, o con mutaciones en el genoma nuclear y/o mitocondrial (Rogov & Zvyagilskaya, 2015; Martínez Cárdenas, *et al.*, 2018).

El cobre es un metal esencial que cumple la función de cofactor en diferentes enzimas, relacionadas con la respiración mitocondrial y síntesis de DNA, entre otros (Jaksch, *et al.*, 2001; Salviati, *et al.*, 2002; Kommuguri, *et al.*, 2013). En particular, la citocromo c oxidasa (COX) se ve afectada cuando hay una limitación de cobre, disminuyendo la velocidad de respiración en las células, debido a que el contenido de COX en la mitocondria disminuye.

1.5 Citocromo c oxidasa

COX o complejo IV (número EC 1.9.3.1), es la oxidasa terminal de la cadena respiratoria mitocondrial. La enzima transfiere electrones provenientes del citocromo c al oxígeno molecular, al mismo tiempo genera un gradiente de protones (al translocar protones) que puede ser usado para generar energía en forma de ATP por medio de la ATP sintasa. Esta reacción es llevada a cabo gracias a la presencia de un centro activo hemo bimetálico hierro-cobre en la enzima (Mick, *et al.*, 2011).

COX es un complejo oligomérico, conformado por varias subunidades. Hasta el momento no se encuentran registros en la literatura sobre la estructura o el número exacto de las subunidades que conforman la COX de *X. dendrorhous*, sin embargo, existen diversos reportes enfocados al estudio de este complejo en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, reportando 11 subunidades (Banting & Glerum, 2006).

El correcto ensamblaje de las subunidades que conforman la COX debe ser coordinado, debido a que los polipéptidos que conforman el sitio activo (Cox I, Cox II y Cox III) son codificados por el DNA mitocondrial (mtDNA), representando el 60%

de la masa total del complejo; mientras que los sintetizados por el genoma nuclear (nDNA) son los encargados del ensamblaje de la proteína y transferencia de electrones al oxígeno, además del bombeo de protones (Pierron, *et al.*, 2012), las subunidades codificadas en el núcleo generalmente son hélices transmembranales acopladas al centro activo, de bajo peso molecular (Soto, *et al.*, 2012).

Todas las subunidades deben ser transportadas a los sitios de ensamblaje, lo cual se vuelve un proceso complejo debido a la estructura que posee la mitocondria. Los polipéptidos codificados por el nDNA deben ser transportados a través del citosol y traspasar la doble membrana mitocondrial. Este proceso es llevado a cabo por los complejos TOM (translocón de membrana externa) y TIM (translocón de membrana interna) a través de los cuales los péptidos llegan a su destino de ensamblaje (Mick, *et al.*, 2011).

El correcto funcionamiento de la COX necesita del ensamblaje de dos restos hemo, tres iones de cobre y iones de zinc, magnesio y sodio, que actúan como cofactores. Cox1 contiene dos cofactores hemo, uno está implicado en la transferencia de electrones y el otro interactúa con un sitio de cobre mononuclear, que forma el sitio activo bimetálico (Valnot, *et al.*, 2000; Gamberi, *et al.*, 2009).

Cox11, Cox17 y SCO1 son las subunidades codificadas por el nDNA encargadas de entregar el cobre a la COX (Carr & Winge, 2003). La transferencia del cobre se lleva a cabo de la subunidad Cox17 a SCO1, una vez entregados el cobre a SCO1, ocurre una interacción física entre este polipéptido y el centro activo de la enzima (Cox2) (Gamberi, *et al.*, 2012).

1.6 Proteína SCO1

SCO1 (*synthesis of cytochrome c oxidase*) es una proteína esencial ampliamente conservada en los organismos aerobios, implicada en el suministro de cobre a la COX. *SCO1* posee un dominio C-terminal, que se une a Cu(I) mediante tres ligandos, debido a la presencia de dos cisteínas con un motivo conservado CXXXC. Una histidina conservada también está implicada en la ligadura de Cu(I) (Nittis, *et al.*, 2001). Una mutación que afecte alguno de los residuos conservados en *SCO1*, provoca una COX no funcional (Gamberi, *et al.*, 2012).

SCO1 se encuentra anclada en la membrana interna mitocondrial y contiene un sitio de unión a cobre que sobresale en el espacio intermembranal de la mitocondria, en donde Cox17 le transfiere el ion cobre. Posteriormente, *SCO1* pasa el cobre a la subunidad II de COX, localizada en la membrana mitocondrial interna (Stumpferl, *et al.*, 2004).

Los centros activos Cox1 y Cox2 son inestables y son degradados cuando *SCO1* no es sintetizada. *SCO1* es una proteína conservada en humanos y la ausencia de ella desencadena una deficiencia en la COX, provocando la muerte en infantes recién nacidos (Nittis, *et al.*, 2001). En *S. cerevisiae* la ausencia de *SCO1* provoca daños irreversibles en la mitocondria (Gamberi, *et al.*, 2012).

1.7 CRISPR-Cas9

En *X. dendrorhous* el gen que codifica para *Sco1*, *i.e.*, *SCO1*, se encuentra anotado con el número de acceso del GenBank LN483345.1: 696751-698286. Una mutación en dicho gen, que provocara un defecto en *Sco1* y una disfunción en COX,

no ha sido reportada hasta el momento; por lo que el uso de técnicas de biología molecular que permitieran una mutación en el polipéptido ayudaría a dilucidar el efecto de la deficiencia de transporte de cobre en la respiración, generación de radicales libres y la producción de astaxantina en la levadura.

Modificaciones de este tipo pueden ser logradas mediante técnicas que involucran el uso de nucleasas, como los dedos de zinc (ZFN), nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN) o CRISPR-Cas9; siendo la última, una técnica que en comparación con las demás, es más rápida, con eficiencias más altas de mutación, con secuencias dianas no tan limitadas, entre otras ventajas (Farzadfard, *et al.*, 2013).

El sistema de edición génica conocida como CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y su proteína asociada Cas (*CRISPR associated*), por sus siglas en inglés (Amitai & Sorek, 2016) ha sido ampliamente estudiada en los últimos 6 años.

Cas9 es una nucleasa, que con ayuda de un sgRNA (*single-guide RNA*), se une a una cadena doble de DNA y genera un corte como en ambas hebras del DNA (*DSB* o *double strand break*) (Hsu, *et al.*, 2014). Este tipo de cortes son reparados de manera imprecisa, por un sistema denominado unión de extremos no homólogos (*NHEJ* o *non homologous end joining*). Los fragmentos de DNA formados son religados dando lugar a mutaciones en el marco de lectura de la secuencia y dependiendo de la modificación pueden inactivar o atenuar el gen diana (Bhaya, *et al.*, 2011).

La generación de una mutación dirigida, mediante la tecnología CRISPR-Cas9, que atenúe o inhiba específicamente la citocromo c oxidasa, nos permitirá inhibir la respiración, y posiblemente provocar estrés oxidativo, y así, estimular la síntesis de astaxantina (Martínez Cárdenas, *et al.*, 2018).

1.8 Respirometría

Los parámetros cinéticos de consumo de oxígeno y asimilación en un microorganismo con una modificación en la COX pueden ser medidos mediante microrrespirometría.

La microrrespirometría (MR) es la medición de la velocidad de consumo biológico de oxígeno, bajo condiciones controladas. Es una técnica que nos permite realizar mediciones de oxígeno “*in situ*” y en tiempo real (Oliveira, *et al.*, 2011).

La MR se puede realizar en microbiorreactores (MBRs), que generan mediciones rápidas y directas del oxígeno consumido del medio, eliminando una gran cantidad de errores, además nos permite trabajar con varias réplicas simultáneas con volúmenes de trabajo relativamente pequeños (en mililitros).

A partir de la adquisición de datos, que expresan la dinámica de oxidación del sustrato por el microorganismo, se pueden hacer determinaciones de parámetros cinéticos como: i) la velocidad máxima de consumo de oxígeno ($OUR_{m\acute{a}x}$); ii) la constante de afinidad para sustrato (K_s); iii) el rendimiento de oxidación del sustrato ($Y_{O_2/s}$); iv) el rendimiento celular ($Y_{x/s}$) y v) la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$). (Ramirez-Vargas, *et al.*, 2014).

2. Justificación

La astaxantina es un pigmento de interés biotecnológico, con una alta demanda en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, principalmente. Existen diversos organismos productores de este carotenoide, siendo *X. dendrorhous* una de las opciones biotecnológicas más atractivas (Johnson, 2003).

Diversos trabajos publicados han estudiado el efecto de la limitación de cobre en distintos tipos de células (Culotta, *et al.*, 1999; Flores-Cotera & Sánchez, 2001; Light, 1972). Flores-Cotera y Sánchez en 2001, estudiaron el efecto de la limitación de Cu^{2+} en cultivos de *P. rhodozyma* (estado sexual, *X. dendrorhous*), y observaron que a bajas concentraciones de Cu^{2+} la síntesis de astaxantina es estimulada. Debido a que COX es una enzima que posee un sitio catalítico dependiente de cobre, se ha sugerido que bajos niveles de Cu disminuyen la actividad de la enzima, ocasionando estrés oxidativo y la activación de la síntesis de astaxantina.

Por lo tanto, la modificación de la secuencia codificante para la COX de *X. dendrorhous*, mediante el método de edición genómica CRISPR-Cas9, se busca estimular la síntesis de astaxantina. Adicionalmente, se busca mostrar que una respuesta similar a la que se observa bajo limitación de cobre, puede también observarse ante una mutación en COX.

3. Hipótesis del trabajo

Una modificación de tipo *InDel* de la secuencia que codifica la COX de *X. dendrorhous*, usando la técnica de CRISPR-Cas9, favorecerá la síntesis de astaxantina.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

4.1.1 Mostrar que la inactivación o atenuación específica de la enzima COX, mediante CRISPR-Cas9, estimula la síntesis de carotenoides.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Establecer una secuencia nucleotídica de un péptido de la citocromo c oxidasa como secuencia blanco para su inactivación/atenuación mediante Cas9.

4.2.2 Definir tres secuencias sgRNA, complementarias a la secuencia nucleotídica.

4.2.3 Obtener un vector pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458) que contenga las secuencias codificantes para: a) sgRNA de la citocromo c oxidasa, b) Cas9.

4.2.4 Transformar células de *X. dendrorhous* con el vector PX458, para atenuar o inactivar la función de citocromo c oxidasa.

4.2.5 Mediante secuenciación del gen blanco, comprobar que las células transformadas de *X. dendrorhous* contienen un gen citocromo c oxidasa modificado.

4.2.6 Estudiar el efecto de la atenuación y/o inactivación de la citocromo c oxidasa (de *X. dendrorhous*) en la síntesis de carotenoides.

5. Estrategia experimental

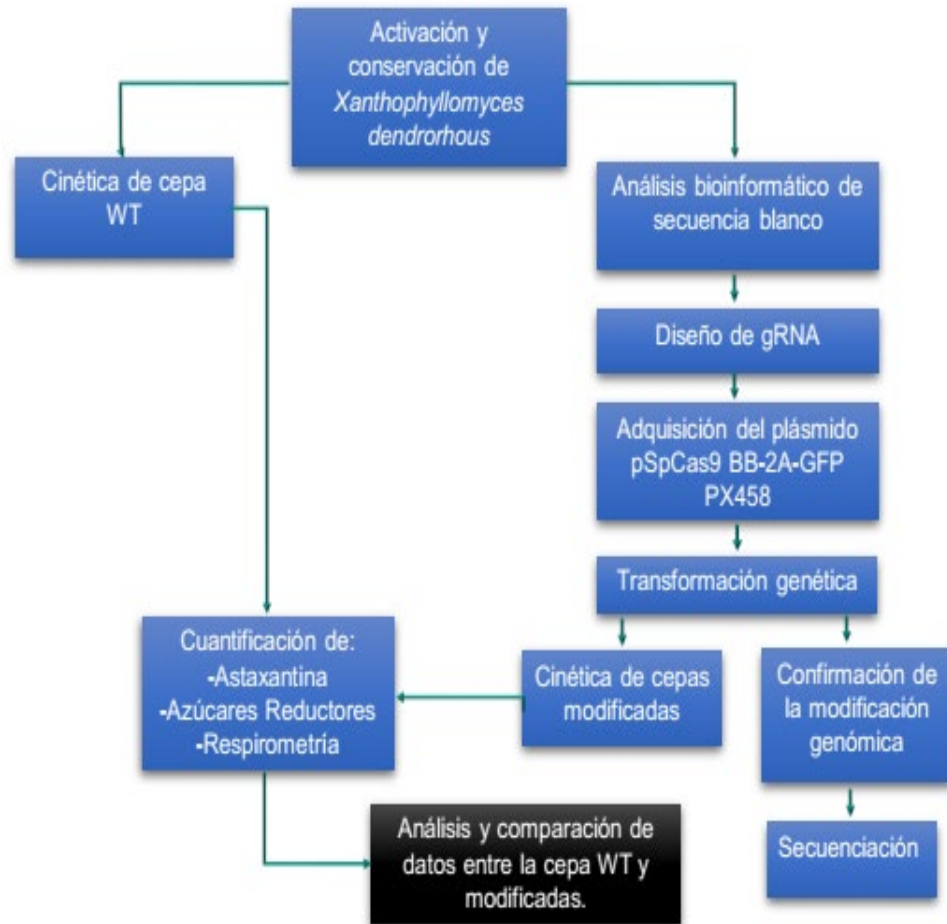


Figura 3: Estrategia experimental utilizada para el presente proyecto.

6. Metodología

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Cepas y medios de cultivo

X. dendrorhous cepa ATCC96594 (CBS 6938 CCRC 22365, SzMC 1456, VKM Y-2793), estado asexual *Phaffia rhodozyma*, fue crecida en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio 2YM a 20°C, 150 rpm, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀=0.6, el cual se usó como preinóculo. Se adicionaron 150 µL de este cultivo a matraces de 250 mL con 32 mL de medio 2YM para realizar una cinética de 96 h, a 150 rpm y 20°C, en condiciones de obscuridad, por triplicado. El medio 2YM contenía (gL⁻¹): 3 extracto de levadura, 3 extracto de malta, 5 peptona de caseína, 20 dextrosa.

Escherichia coli TOP 10 fue usada para la conservación y propagación de todas las moléculas de DNA recombinante. Esta cepa fue crecida en medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100µg/mL).

6.1.2 Plásmidos codificantes para Cas9

Mediante el servicio de construcción de gRNA GenCRISPR de GenScript (Piscataway, NJ, USA), se obtuvieron 3 plásmidos pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) con diferentes gRNA: 1) 5'-ATGAGAATGGTCCTCCGATC-3', 2) 5'-CAACAACCTGCTCGGCCGTA-3', 3) 5'-ACATAAGACCTTCGGACCA-3'; todos teniendo como blanco el gen *SCO1* de *X. dendrorhous*.

6.1.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico fue realizada como lo describe el protocolo de Lööke, *et al.*, (2011) con modificaciones.

Todas las reacciones de amplificación por PCR del gen *SCO1*, se llevaron a cabo con 35 ciclos: 94°C por 2 minutos, temperatura de hibridación 60°C por 30 segundos, y amplificación a 68°C usando High Fidelity Polymerase (Invitrogen, USA), conforme al protocolo del fabricante. La Tabla 1 muestra los iniciadores usados en este estudio. Los iniciadores fueron sintetizados por Sigma ^a, (Saint Louis, MO, USA) y por T4 Oligo ^b (Irapuato, Gto., México).

Tabla 1

Iniciadores utilizados en este estudio.

Abreviación	Iniciador	Secuencia
F1	Forward 1 ^a	5' CGA CGC CAA TTT TGA AGC CA 3'
F2	Forward 2 ^a	5' CCA CCA CTT CAC TCA TCT TAT C 3'
R1,2	Reverse 1,2 ^a	5' CCT TCC GAC CTT GCC TTT CT 3'
Fi	Forward inicio ^b	5' GCACATATTTCTTTACAGACAAACA 3'
Ri	Reverse inicio ^b	5' GGACGATGATTACCTCGTTG 3'

Las secuencias nucleotídicas de los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia nucleotídica del gen *SCO1* de *X. dendrorhous* número de acceso a Gen Bank LN483345.1.

6.1.4 Generación de protoplastos

Una colonia aislada de *X. dendrorhous* se inoculó en un tubo de 10 mL que contenía 5 mL de medio YM, y se incubó a 150 rpm, 20°C, en condiciones de

obscuridad, por 12 horas. El medio YM contenía (gL^{-1}): 3 extracto de levadura, 3 extracto de malta, 5 peptona de caseína, 10 dextrosa.

A un matraz de 500 mL, que contenía 100 mL de medio YM, se le añadieron 100 μL del cultivo previo. El matraz se incubó en las mismas condiciones descritas hasta alcanzar una DO de 0.8-1.0 (óptimo a 0.6). Después, las células se centrifugaron en tubos falcon por 10 min a 880 g (Centrifuge 5810, Eppendorf). Se retiró el sobrenadante y las células se lavaron con 10 mL de buffer SCS. El buffer SCS se prepara mezclando volúmenes iguales de SCSa (20 mM de citrato de sodio, 1 M D-sorbitol) y SCSb (20 mM ácido cítrico, 1 M D-sorbitol), para ajustar a un pH de 5.8 (se necesitan aproximadamente 1.5 volúmenes de SCSb para ajustar el pH). Después de los lavados, las células se resuspendieron en 1 mL de SCS con aproximadamente 200 mg de Glucanex (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), la mezcla se agitó por inmersión y se inspeccionó al microscopio hasta observar la formación de protoplastos (1-2 h). Una vez obtenidos los protoplastos se centrifugó inmediatamente a 2500 rpm por 10 min (Centrifuge 5810, Eppendorf) y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el paquete celular dos veces con 10 mL de SCS para eliminar la enzima y conservar sólo el paquete celular. Con cuidado, se resuspendieron los protoplastos en aproximadamente 200 μL de sorbitol 1M helado, para obtener una concentración celular de 1×10^7 células/mL.

6.1.5 Electroporación de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

A una cubeta de electroporación de 0.2 cm de amplitud de ranura (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), se añadieron 20 μL de protoplastos mezclados con por lo menos 100 ng de DNA plasmídico. La cubeta se mantuvo en baño de hielo

hasta realizar la transformación en un electroporador Bio-Rad Micropulser (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), usando el protocolo para electroporar *E. coli*, debido a la sensibilidad de los protoplastos (1200 V, resistencia de 100 Ohms, capacitancia de 50 uFaradios). Después de la electroporación se añadió 1 mL de medio YM-S. El medio YM-S contenía: 3 gL⁻¹ extracto de levadura, 3 gL⁻¹ extracto de malta, 5 gL⁻¹ peptona de caseína, 10 gL⁻¹ dextrosa y sorbitol 1 M. Con mucho cuidado, la mezcla de electroporación se sembró con una asa de vidrio Drigalski en placas que contenían medio YM-S suplementado con 20 gL⁻¹ de agar y ampicilina a 100 µg/mL. Se incubaron por 4 días a 20°C, en condiciones de obscuridad.

6.1.6 Citometría de flujo para selección de células transformadas.

Una primera selección en placa se realizó con base en las características deseadas, por ejemplo, un crecimiento menor y una mayor pigmentación. Por cada plásmido se seleccionaron dos colonias y se resembraron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio YM y se incubaron toda la noche a 20°C, 150 rpm y en condiciones de obscuridad. La biomasa obtenida se centrifugó y el paquete celular se lavó con solución salina estéril, después de otro lavado se resuspendió en 3 mL de la misma solución. Se mantuvo en hielo hasta la selección de colonias, con base en la expresión de EGFP, mediante *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) en un citómetro de flujo FACS-calibur flow cytometer (Becton Dickinson & Co. Mountain View, CA, USA). Más de 10, 000 eventos fueron analizados para la intensidad de fluorescencia. Las células seleccionadas por el equipo con emisión de fluorescencia por EGFP se resembraron en medio YM líquido suplementado con antibiótico por 12 h y después se resembraron en placa, con el mismo medio.

6.1.7 Microscopía de fluorescencia.

Después de la selección mediante FACS, se verificó la presencia de emisión de fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia (Nikon ECLIPSE Ci, Japón) con filtro azul (Nikon blue excitation fluorescence filter) con un tiempo de exposición de 30 s.

6.1.8 Extracción de carotenoides totales

La extracción de carotenoides totales se realizó de acuerdo al método reportado por Sedmak (1990). El paquete celular con aproximadamente 2.5 mg de células obtenido por centrifugación, se homogenizó con 0.5 ml de perlas de vidrio (0.5 mm diámetro) y después se añadió 1 ml de dimetilsulfóxido a 58°C, incubando por 1 min a la misma temperatura. Posteriormente, se agitó en vórtex durante 45 segundos, para lograr el rompimiento celular. A cada muestra se le adicionaron 0.2 ml de NaH₂PO₄ 0.01M. El pigmento fue recuperado con 2.5 ml de una mezcla hexano: acetato de etilo (1:1) y agitando en vórtex durante 1 minuto. Para separar la fase orgánica con los carotenoides de la fase acuosa se llevó a centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos. La concentración de carotenoides totales se determinó mediante espectrometría a una absorbancia de 480 nm, usando un coeficiente de extinción de 2100 en la ecuación:

$$\frac{\mu g}{mL} = \frac{1000 * A * Vs}{Vm * E_{1cm}^{1\%}}$$

Donde:

A Absorbancia, 480 nm

V_s Volumen del solvente recuperado (ml)

V_m Volumen de muestra (ml)

$E_{1cm}^{1\%}$ Coeficiente de extinción específico para astaxantina, 2150

6.1.9 Determinación de biomasa

Un volumen de 2.5 ó 5 mL de caldo fermentado (dependiendo de la fase de crecimiento de la levadura) se centrifugó a 4000 rpm por 5 min (Centrifuge Type SS-1; Sorvall, USA). El paquete celular obtenido se lavó una vez con agua bidestilada y después se suspendió en aproximadamente 3 ml de agua bidestilada. La biomasa se determinó por peso seco (Flores-Cotera *et al.* 2001).

6.1.10 Determinación de azúcares

Los azúcares reductores fueron determinados colorimétricamente por el método de DNS con modificaciones (Miller, 1959). Entre 20 y 300 μ L de muestra (dependiendo de la muestra), se colocaron en un tubo de vidrio de 20 mL, se aforó a 1 mL con agua destilada. Para hidrolizar la sacarosa residual en el caldo de cultivo, a cada muestra se le añadió 30 μ L de HCl concentrado y se mantuvo por 8 min a 90°C, y posteriormente se neutralizó el ácido con 30 μ L de NaOH al 40%. Finalmente se añadieron 3 mL de reactivo DNS y se colocaron los tubos en agua hirviendo durante 15 min, al concluir este tiempo se adicionó 1 mL de solución de tartrato de sodio y potasio al 40% y se enfriaron los tubos en baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se registró su absorbancia a 575 nm en un CLARIOstar® (Marca BMG LABTECH). La curva de calibración se realizó con una

solución de 1 gL^{-1} de sacarosa con volúmenes de 0, 250, 500, 750 y 1000 μL , aforados a 1 mL con agua destilada. Todos los tratamientos tuvieron tres réplicas.

6.1.11 Microrrespirometría de pulsos

La caracterización del consumo de oxígeno se realizó mediante Microrrespirometría de pulsos de concentración creciente, el cuál es un método desarrollado en el Laboratorio de Bioprocesos Ambientales (Cinvestav-Zacatenco, México). El método se aplicó a las cepas WT y *JR2-1* (cepa seleccionada mediante citometría de flujo). En cada caso a pH de 4 y 6. La biomasa necesaria para los ensayos respirométricos se obtuvo de cultivos por lote de 72 h de edad, en matraces de 250 mL con 32 mL de medio 2YM, de acuerdo al protocolo antes descrito en el capítulo 6.1.1 de Materiales y métodos. La biomasa se tomó al final de la fase exponencial del cultivo, a las 72 h, con la finalidad de obtener células que se encontraban en el principio de la fase estacionaria del cultivo, y con la menor cantidad de sustrato residual en el medio de cultivo.

El medio 2YM se eliminó después de centrifugar a 5000 g por 6 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf) y la biomasa se lavó 4 veces con 45 mL de medio mineral sin fuente de carbono, con el fin de eliminar la mayor cantidad de residuos de sustrato. La biomasa lavada fue resuspendida en 32 mL de medio mineral. Es importante destacar que el medio mineral utilizado para los estudios de microrrespirometría, carecía de fuente de carbono. El medio mineral contenía (gL^{-1}): 0.049 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.39 Na_2HPO_4 , 0.08 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 K_2SO_4 , 0.02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0006 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.012 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0006 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0002 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00013 H_3BO_4 , 0.00053 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.45

NaCl, 0.35 Na₂SO₄ y 0.4 ml de solución de vitaminas. La solución de vitaminas contenía: 75 mg pantotenato de calcio, 38 mg tiamina, 2 mg biotina, 3.8 mg cianocobalamina, 3.75 g mioinositol, 19 mg piridoxina, 38 mg riboflavina, and 225 mg nicotinamida en 500 mL de agua desionizada.

Para los experimentos respirométricos, se utilizaron los microbiorreactores OxoDish® OD24 (PreSens, México), los cuales constan de 24 pozos de 16 mm de diámetro y 18 mm de profundidad (2.5 mL de volumen), cada uno con un sensor fluorométrico de oxígeno disuelto (OD). Las lecturas en los pozos fueron realizadas mediante un lector de placa de 24 canales (SDR-281, PreSens, México) conectado a un ordenador personal para la adquisición de datos, procesado con el software de PreSens (SDR v37), tal como lo describe Esquivel-Ríos, *et al.* (2014). La transferencia de oxígeno se determinó en una incubadora (SK- 737R, Amerex Instruments, México) con agitación a 150 rpm. El sistema se operó a 20°C con 1.9 mL de la mezcla biomasa/medio mineral en cada pozo del microbiorreactor. Una vez que los valores de temperatura y OD (línea base, C_b) se estabilizaron, se inyectó a cada pozo 100 μ L de solución de glucosa con diferentes concentraciones (8, 10, 25, 50, 75, 150 y 200 mg/L de glucosa), obteniendo un volumen final en cada pozo de 2 mL. Cada experimento se realizó por triplicado. La DQO de la biomasa y de las soluciones de glucosa, fue cuantificada mediante el método colorimétrico de reflujó cerrado (Clesceri, *et al.*, 1998).

Después de la inyección de los 100 μ L de las soluciones de glucosa, se determinó el K_{La} cuando la concentración de OD se mantuvo estable por más de 10

min en la línea base (C_b), esto se logró cuando el sustrato presente en los pozos fue consumido totalmente.

La adquisición de datos, es decir, las variaciones de OD en los microbiorreactores, generó respirogramas, los cuales reflejan la dinámica de oxidación del sustrato por el microorganismo.

A partir del análisis de los respirogramas obtenidos para las dos cepas a 2 pH distintos, se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos siguientes: a) la velocidad máxima de consumo de oxígeno ($OUR_{m\acute{a}x}$); b) la constante de afinidad para sustrato (K_s); c) el rendimiento de oxidación del sustrato ($Y_{O_2/s}$); d) el rendimiento celular ($Y_{x/s}$) y f) la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$).

7. Resultados y Discusión

7.1 Revisión bibliográfica

La COX es una proteína dimérica, ampliamente conservada en organismos aerobios, conformada por subunidades codificadas tanto en el nDNA como en el mtDNA. El centro activo, compuesto por las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3, es codificado y sintetizado en la mitocondria (Mick, *et al.*, 2011; Soto, *et al.*, 2012; Rak, *et al.*, 2016). Ninguno de los genes de estos polipéptidos fue considerado para la edición por Cas9, debido a que el sistema CRISPR-Cas9 posee un péptido señal para su transporte al núcleo (NLS), i.e., sólo realizaría modificaciones en el nDNA.

Las subunidades codificadas en el nDNA, en su mayoría, son proteínas encargadas del ensamblaje y unión de las subunidades que conforman el centro activo (Mick, *et al.*, 2011), por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica de estos polipéptidos en donde se asocie una disfunción directa en la COX por efecto de una mutación.

Actualmente no hay estudios que nos permitan conocer con exactitud las subunidades que conforman la COX en *X. dendrorhous*, pero al ser secuencias conservadas en diversos organismos, se realizó una búsqueda bibliográfica para elegir una secuencia blanco, para ser integrada en una plásmido junto a Cas9 y así lograr una atenuación o inactivación de dicha enzima. En la Tabla 2, se resume la información relevante.

Tabla 2

Polipéptidos que al modificarse, alteran el funcionamiento de COX.

^a Proteína	Función en la COX	Problema asociado a su mal funcionamiento	Fuente	Gen en <i>X. dendrorhous</i> y No. de acceso al GenBank
Shy1	Factor de ensamblaje	Causa la enfermedad de Leigh en humanos.	(Mick, <i>et al.</i> , 2007; Farzadfard, <i>et al.</i> , 2008; Nijtmans, <i>et al.</i> , 2008; Reinhold, <i>et al.</i> , 2011)	SHY1 , LN483345.1:603486-604769
Oxy2	Activador trascricional para el consumo de cobre.	Falla en la reducción y transporte de cobre en <i>Cryptococcus neoformans</i> .	(Nyhus & Jacobson, 2004)	^b N.D.
Cox11	Transporte de Cu _A , factor de ensamblaje, proteína integral de MIM.	Problemas de asimilación de cobre en <i>S. cerevisiae</i> .	(Nyhus & Jacobson, 2004; Banting & Glerum, 2006; Radin, <i>et al.</i> , 2015)	COX11 , LN483142.1:44696-46624
Sco2	Proteína de unión a cobre	Problemas de asimilación de cobre en <i>S. cerevisiae</i> . Cardioencefalitis en humanos.	(Jaksch, <i>et al.</i> , 2001; Salviati, <i>et al.</i> , 2002; Pecina, <i>et al.</i> , 2004; Leary, <i>et al.</i> , 2004; Stiburek, <i>et al.</i> , 2005; Williams, <i>et al.</i> , 2005; Leary, <i>et al.</i> , 2007; Gamberi <i>et al.</i> , 2012)	N.D.
Sco1	Proteína de ensamblaje. Regulación de cobre (homeostasis)	Problemas de asimilación de cobre en <i>S. cerevisiae</i> . Hepatopatía, acidosis metabólica, miocardiopatía hipertrófica, encefalopatía en humanos.	(Valnot <i>et al.</i> , 2000; Jaksch, <i>et al.</i> , 2001; Nittis <i>et al.</i> , 2001; Salviati, <i>et al.</i> , 2002; Pecina, <i>et al.</i> , 2004; Leary, <i>et al.</i> , 2004; Leary, <i>et al.</i> , 2007; Stiburek, <i>et al.</i> , 2005; Williams, <i>et al.</i> , 2005; Leary, <i>et al.</i> , 2007; Gamberi, <i>et al.</i> , 2012; Hlynialuk, <i>et al.</i> , 2015)	SCO1 , LN483345.1:696751-698286

Tabla 2. Polipéptidos reportados que afectan al correcto funcionamiento de la COX cuando se ven modificados. Continuación.

Ctr1	Transportador de cobre.	Defectos de crecimiento en levaduras.	(Lee, <i>et al.</i> , 2002; Banting & Glerum, 2006; Ding, <i>et al.</i> , 2011; Hlynialuk, <i>et al.</i> , 2015)	N.D.
Coa6	Factor 6 de ensamblaje de COX.	Cardioencefalomiopatía fatal en humanos	(Ghosh, <i>et al.</i> , 2014)	N.D.
Coa4	Chaperona metálica, afecta COX y Sod1	Anemia neonatal y síndrome de Leigh en humanos. Defectos de ensamblaje de COX. Degradación rápida de Cox2 y Cox3.	(Wood & Thiele, 2009; Banci, <i>et al.</i> , 2010; Horn, <i>et al.</i> , 2010; Bode, <i>et al.</i> , 2013)	N.D.
Coa2	Factor de ensamblaje	Activa la degradación de Cox1. Interrumpe la cadena respiratoria.	(Pierrel, <i>et al.</i> , 2008)	N.D.
Coa3	Estabiliza COX1, Factor de ensamblaje	Deficiencia de la COX	(Clemente, <i>et al.</i> , 2013; Dennerlein & Rehling, 2015; Rak, <i>et al.</i> , 2016)	N.D.
Cox10	Feniltransferasa, síntesis de hemo ^{aa} . Proteína de ensamblaje.	Síndrome miasténico congénito en humanos	(Valnot, <i>et al.</i> , 2000; Pecina, <i>et al.</i> , 2004; Fukui, <i>et al.</i> , 2007)	N.D.
Cox17	Chaperona metálica	Deficiencia de la COX	(Leary, <i>et al.</i> , 2004; Pierrel, <i>et al.</i> , 2008; Gamberi, <i>et al.</i> , 2012)	COX17 , LN483167.1: 1852055-1852558
TACO1	Activador traduccional de COX1	Síndrome miasténico congénito en humanos	(Weraarpachai <i>et al.</i> , 2009)	N.D.
Oxa1	Biogénesis de COX	Hipertiroxinemia disalbuminémica en humanos	(Altamura, <i>et al.</i> , 1996)	N.D.

Tabla 2. Polipéptidos reportados que afectan al correcto funcionamiento de la COX cuando se ven modificados. Continuación.

Yme1	Proteasa putativa dependiente de ATP.	Atrofia óptica y paraplejía espástica en humanos	(Pearce & Sherman, 1995)	N.D.
Cox15	Cataliza la transferencia de electrones del citocromo c reducido al oxígeno.	Cardioencefalomiopatía fatal en humanos	(Pecina, <i>et al.</i> , 2004)	COX15. LN483157.1 (1354671-1356516)
Cox14	Importador de cobre	Distrofia muscular en humanos	(Weraarpachai, <i>et al.</i> , 2009)	N.D.

Nota. ^aProteína, el nombre es el anotado para *S. cerevisiae*, a pesar de tener homólogos en diferentes organismos.

^bN.D.= No descrita en el genoma de *X. dendrorhous*.

Dentro del genoma de *X. dendrorhous* sólo se encontraron anotados los genes que codifican para las proteínas: Shy1, Cox11, *Sco1*, Cox17 y Cox15. Con base en la bibliografía consultada, y considerando que *Sco1* (codificada por el gen *SCO1*) es una proteína ampliamente conservada, se eligió como blanco para la mutación. *Sco1* es esencial para el transporte de cobre hacia la COX (Gamberi, *et al.*, 2012), estudios previos han mostrado que una mutación en esta subunidad, da lugar a una COX no funcional (Nittis, *et al.*, 2001).

7.2 Plásmido pSpCas9 BB-2A-GFP PX 458

. Se sintetizaron tres plásmidos pSpCas9 BB-2A-GFP PX-458, cada uno conteniendo un gRNA distinto de 20 nucleótidos de longitud, del gen *SCO1*, con el número de acceso al GenBank LN483345.1: 696751-698286, el cual se seleccionó como blanco. Los gRNA, propuestos y construidos por GenScript (Piscataway, NJ, USA) se describen en la Tabla 3.

Tabla 3

gRNA's para la inactivación de SCO1 en X. dendrorhous

Plásmido	Secuencia	PAM (NGG)
1	CAACAACCTGCTCGGCCGTA	TGG
2	ATGAGAATGGTCCTCCGATC	AGG
3	AACATAAGACCTTCGGACCA	AGG

Cada plásmido pSpCas9 BB-2A-GFP PX-458 (Figura 1), posee resistencia a ampicilina y la nucleasa Cas9 está asociada a una GFP.

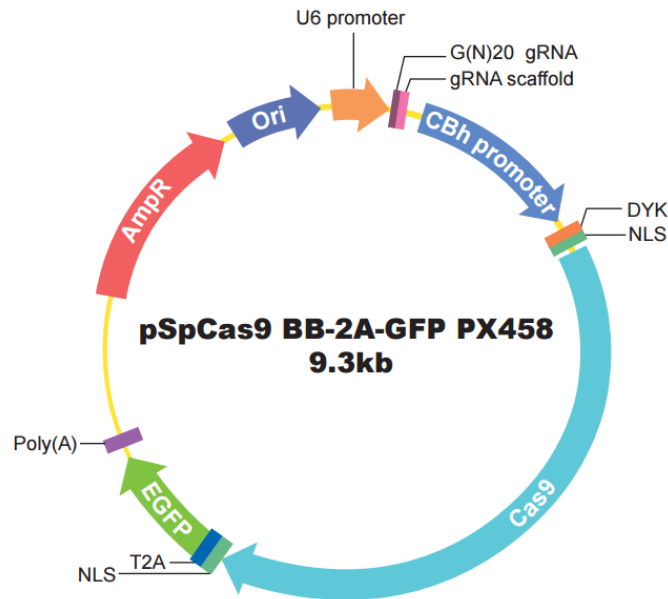


Figura 4: Plásmido con la secuencia codificante para Cas9 y para el gRNA. Los plásmidos fueron sintetizados por GenScript®.

7.3 Generación de protoplastos

Para la transformación de *X. dendrorhous* se utilizó la técnica de protoplastos descrita por Schulz, *et al.*, en 1990. En la Figura 2 se muestra una fotografía de los protoplastos obtenidos. La generación de protoplastos se comprobó mediante lisis celular al añadir una gota de SDS al 1%.

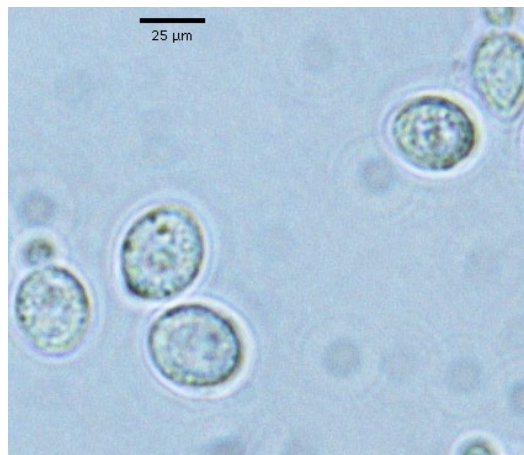


Figura 5: Protoplastos de *X. dendrorhous* observados con un objetivo de 40x (Nikon ECLIPSE Ci, Japón).

7.4 Selección de cepas transformadas con pSpCas9 BB-2A-GFP (PX458)

Las células transformadas con el vector PX458 (plásmidos 1, 2, o 3), expresan la proteína Cas9 unida a EGFP (proteína verde fluorescente mejorada), la cual se utilizó para seleccionar sólo las células que expresaron dicha proteína.

La fluorescencia se midió mediante FACS, en donde se analizaron más de 10, 000 eventos para cada uno de los tres plásmidos. En la Figura 6 observamos el citograma que representa la señal de la EGFP.

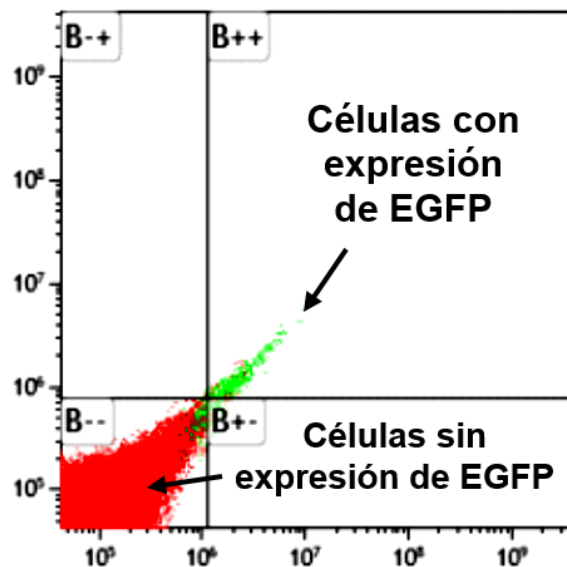


Figura 6 Resultados obtenidos del citómetro de flujo, Cell Sorting. Como blanco se utilizó la cepa WT. El citograma muestra en color rojo las células sin expresión de EGFP (cuadrante B--) y en color verde las células que sí la están expresando (cuadrante B++). El equipo seleccionó únicamente las células con emisión de fluorescencia.

7.5 Confirmación de transformación de células de *X. dendrorhous* mediante microscopía de fluorescencia.

Una vez realizada la selección de células de *X. dendrorhous* que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP), la expresión se confirmó mediante el uso de

un microscopio de fluorescencia (Nikon ECLIPSE Ci, Japón) con el objetivo de 40x, utilizando el filtro Nikon Blue excitation fluorescence (420 a 495 nm). Como blanco se utilizó la cepa silvestre (*wild type*, WT) la cual no presentó emisión de fluorescencia con una exposición de 50 ms (Figura 7A). Las células transformadas con los plásmidos 1, 2 y 3 seleccionadas mediante FACS presentaron emisión de fluorescencia (Figura 7B) a tiempos de exposición de 30 ms.

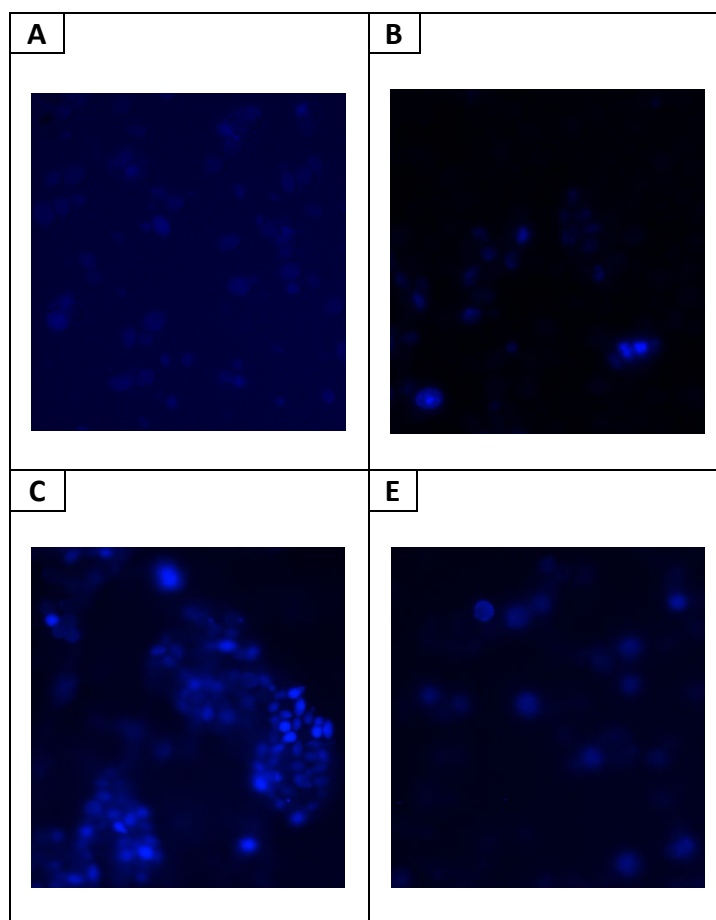


Figura 7: (A) Células WT de *X. dendrorhous* expuestas por 50 ms a emisión de luz (no se observa fluorescencia). Células transformadas de *X. dendrorhous* expuestas por 30 ms a emisión de luz con una longitud de onda entre 420 y 495 nm, (B) con el plásmido número uno, (C) con el plásmido número dos, (D) con el plásmido número tres. En los casos B, C y D se observa fluorescencia.

7.6 Fenotipos de células modificadas

Las células en las que se confirmó la presencia de EGFP se propagaron en placas con medio YM para elegir las colonias con mayor pigmentación en comparación con las colonias de la cepa WT. Pero sólo después de 3 meses, pudo ser perceptible la presencia de colonias con un color rojo intenso, visiblemente oleaginosas y con un crecimiento de “papilas” similares o iguales a las citadas por An, *et al.*, (1989), en su trabajo en donde generó mutantes tratadas con antimicina (inhibidor de la respiración). Células obtenidas de las “papilas” (Figura 8) se resembraron.

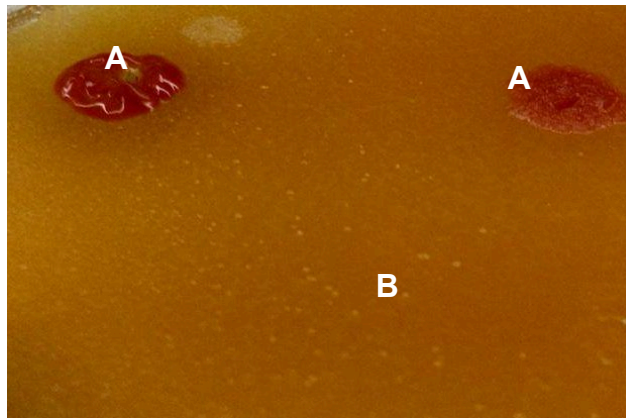


Figura 8: A) "Papilas" presentes en las placas sembradas con células que expresan EGFP. Las papilas fueron visibles después de alrededor de 3 meses. B) Células de *X. dendrorhous* con pigmentación típica de la cepa nativa. La placa se mantuvo por 1 mes a 20°C y 2 meses a 4°C, en ambos casos se mantuvo en condiciones de obscuridad.

En las placas resembradas con células provenientes de las papilas, se obtuvieron distintos morfotipos celulares, en particular de las células que contenían los plásmidos 1 y 2. Las células transformadas con el plásmido 3 no formaron papilas. En cambio, las células formaron colonias con tonalidades más rojas en

comparación con la cepa WT, y formación de colonias con un tamaño mayor a la cepa WT. La Figura 9, muestra fotografías de las cepas antes mencionadas.

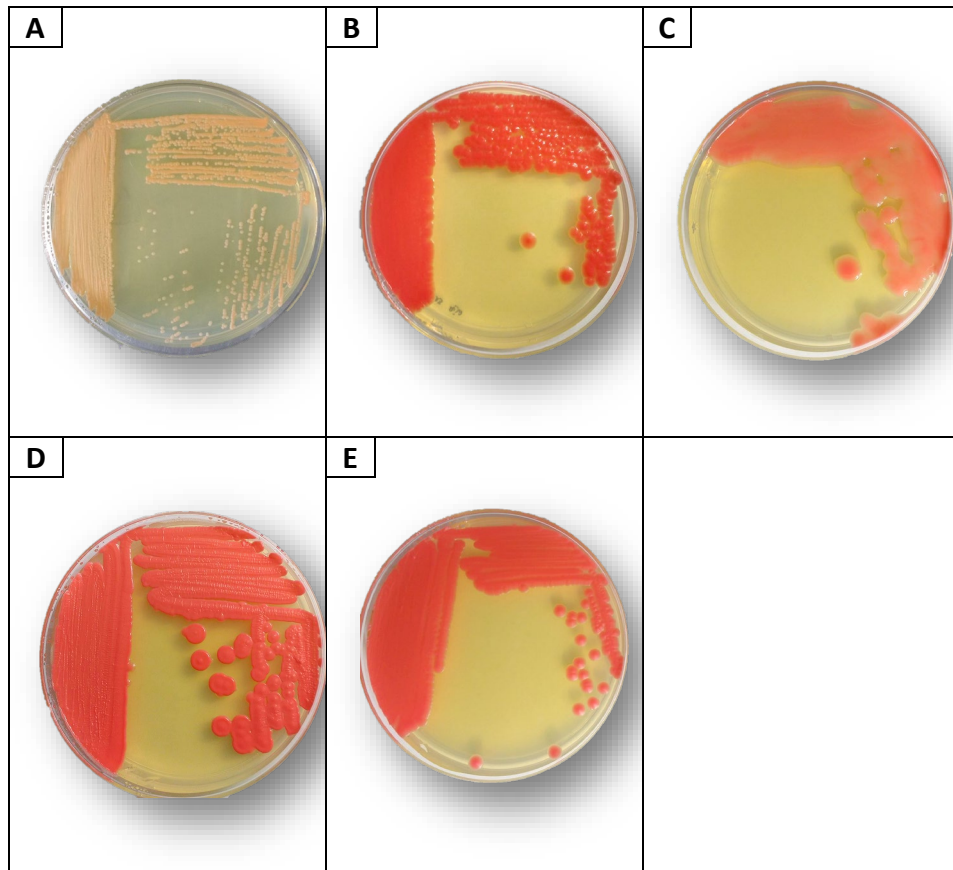


Figura 9. (A) **Cepa WT** de *X. dendrorhous* (control). Las colonias presentaron una tonalidad salmón, con colonias aisladas relativamente pequeñas. (B) **JR2-1**. Células transformadas con el plásmido No. 2, las colonias presentan una coloración roja brillante, y son de mayor tamaño en comparación con la cepa nativa, las colonias tienden a formar "papilas". (C) **JR2-2**, Células transformadas con el plásmido No. 2, las colonias en forma de papilas presentan una secreción de líquido, aparentemente oleaginoso, el cual puede sobrepasar el volumen de la placa y derramarse. (D) **JR2-3**, Células transformadas con el plásmido No. 2, las colonias presentan una coloración rojiza, opaca, las colonias forman papilas. (E) **JR1-1**. Células transformadas con el plásmido No. 1, las colonias presentan una tonalidad roja brillante y tienden a formar papilas. En todos los casos las células fueron cultivadas en medio 2YM, 120 h, 20°C, y en condiciones de obscuridad.

Para fines del presente trabajo, se decidió trabajar con la cepa JR2-1, la cual presentaba un intenso color rojizo-rosado, para encontrar diferencias en respiración, pigmentación y crecimiento en comparación con la cepa nativa.

7.7 Cinéticas de crecimiento de cepa WT y JR2-1 de *X. dendrorhous*

La Figura 10 muestra el crecimiento de las cepas nativa y JR2-1. La cepa WT presentó una concentración mayor de biomasa a partir de las 36 h (32%) y manteniéndose hasta las 72 h (12 %). La biomasa final alcanzada (96 h) fue de 10.5 y 9.8 g/L de la cepa WT y JR2-1, respectivamente. JR2-1 creció un 6.7% menos.

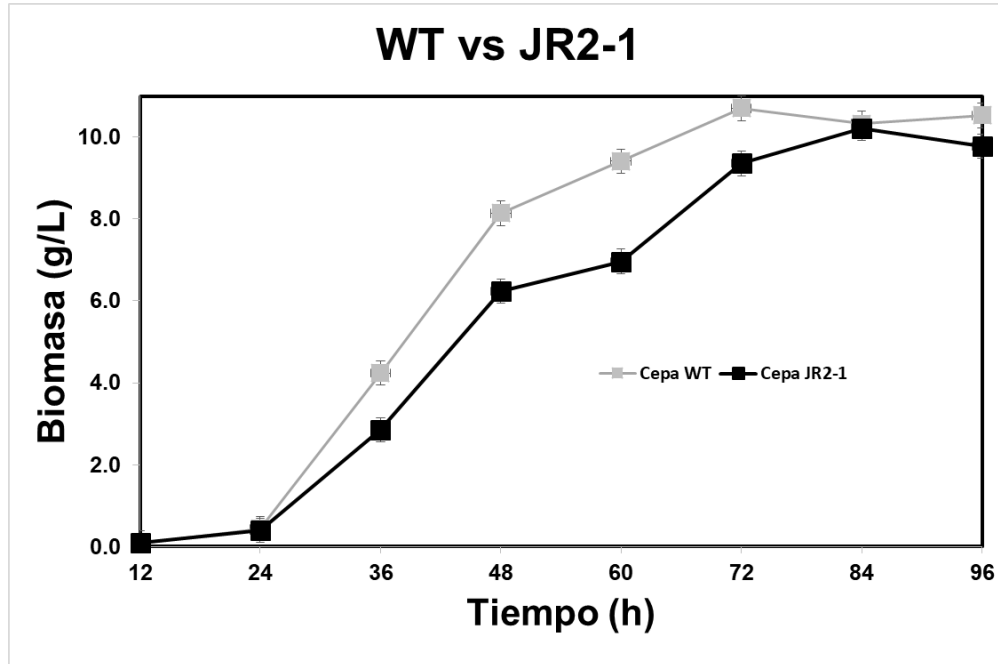


Figura 10: Cinética de crecimiento de la cepa WT (cuadrados grises) y la cepa JR2-1 (cuadrados negros), en medio 2 YM, 150 rpm, 20°C, en condiciones de obscuridad.

Se puede apreciar que la cepa WT consumió aproximadamente el 90% del sustrato durante las primeras 48 horas. En cambio, la cepa JR2-1 sólo consumió 57% a las 48 h y generó 2 g/L menos de biomasa que la cepa WT (23% menos biomasa). La cepa WT entró en etapa estacionaria a las 72 h, mientras que la cepa JR2-1 lo hizo a partir de las 84 h.

Como se indica en el apartado 7.8, la cepa JR2-1 mostró una pigmentación mayor, en comparación con la cepa WT, a partir de las 40 h. Está ampliamente

reportado que *X. dendrorhous* sintetiza carotenoides como protección celular ante la formación de radicales libres. La producción de carotenoides requiere de NADPH, cofactor necesario para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, lo cual pudo provocar que se reprimiera el flux metabólico hacia el metabolismo primario y favoreciera la síntesis de antioxidantes, y así, evitar el daño celular que pudiera provocar la muerte de la célula (Yamane, *et al.*, 1997; Johnson, 2003).

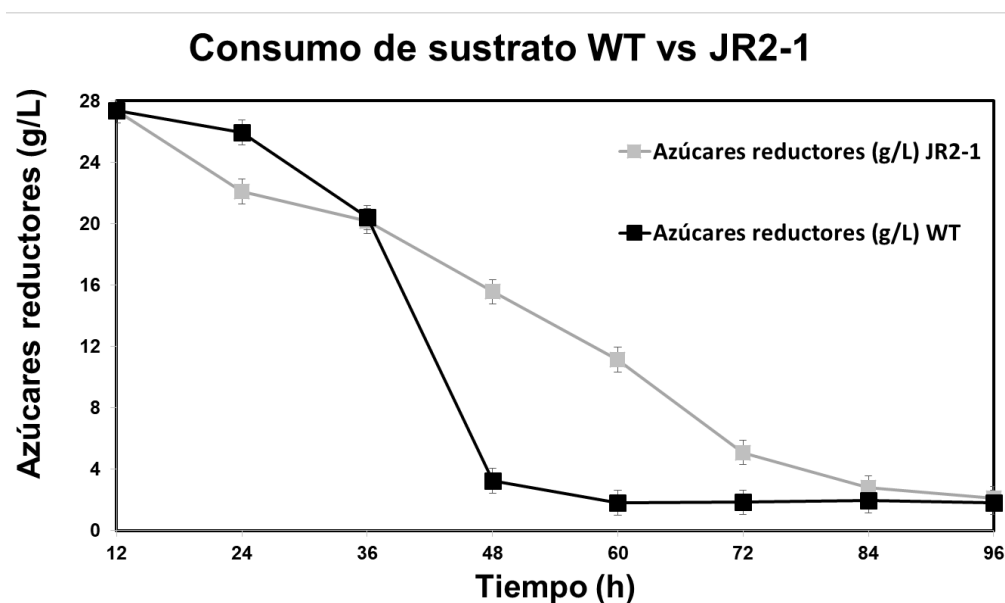


Figura 11: Consumo de azúcares por la cepa WT (línea negra) y la cepa JR2-1 (línea gris), durante cultivo.

7.8 Producción de carotenoides de cepa WT y JR2-1 de *X. dendrorhous*

Durante los experimentos realizados, aún antes de realizar el análisis cuantitativo de la producción de carotenoides, se observó a simple vista una coloración más intensa con tonos rojos en el cultivo de la cepa JR2-1 (a partir de las

40 h de cultivo aproximadamente), en comparación con la cepa WT, a pesar de tener las mismas condiciones de cultivo, como se ilustra en la Figura 12.

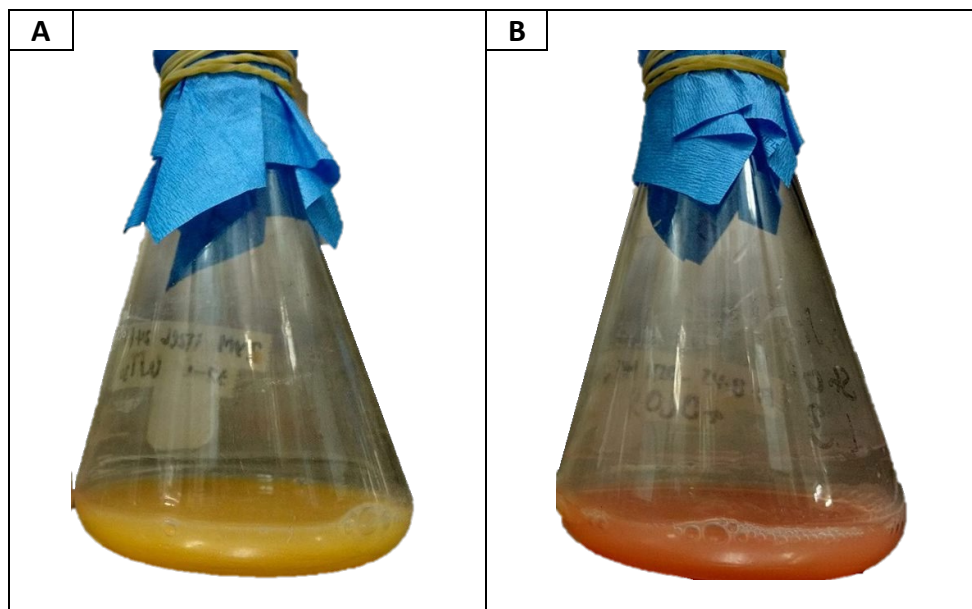


Figura 12: Cultivo de 48 h, medio 2YM, 20°C, 150 rpm en condiciones de obscuridad. (A) Cultivo de cepa WT. (B) Cultivo de cepa JR2-1.

La concentración de carotenoides totales fue mayor (25%) en el cultivo de la cepa WT en las primeras 60 h en comparación con la cepa JR2-1. Sin embargo, debemos considerar que en esta etapa de crecimiento la biomasa en la cepa nativa era un 20% mayor que la de la cepa JR2-1. La asimilación de sustrato se ve favorecida en esta primera etapa del cultivo, permitiendo desarrollar un número mayor de células, y por lo tanto, mayor cantidad de carotenoides. Entre las 72 y 96 h la cepa JR2-1 produjo 18% más carotenoides totales que la cepa WT (Figura 13). Caso contrario, al cuantificar los carotenoides específicos (μg de carotenoides totales por gramo de célula), la cepa JR2-1 produce en promedio un 10% más de carotenoides desde las 24 h de cultivo, al final de la cinética genera 620 $\mu\text{g/g}$ de célula, mientras que la cepa nativa sólo produce 472 $\mu\text{g/g}$ de célula (un 24% menos) (Figura 14).

En cultivos de *P. rhodozyma*, se sabe que la producción de carotenoides es detonada como respuesta a estrés oxidativo, como el provocado por la reasimilación de etanol, lo cual genera un aumento de NADH en la mitocondria, como explica Martínez-Cárdenas, *et al.*, en 2018. La modificación de COX en la cepa JR2-1, aparentemente provocó un desbalance en la proporción NADH/NAD⁺ debido a una deficiente oxidación del NADH en la cadena respiratoria, lo que condujo a estrés oxidativo y activación de la síntesis de carotenoides, para proteger a la célula (Martínez-Cárdenas, *et al.*, en 2018).

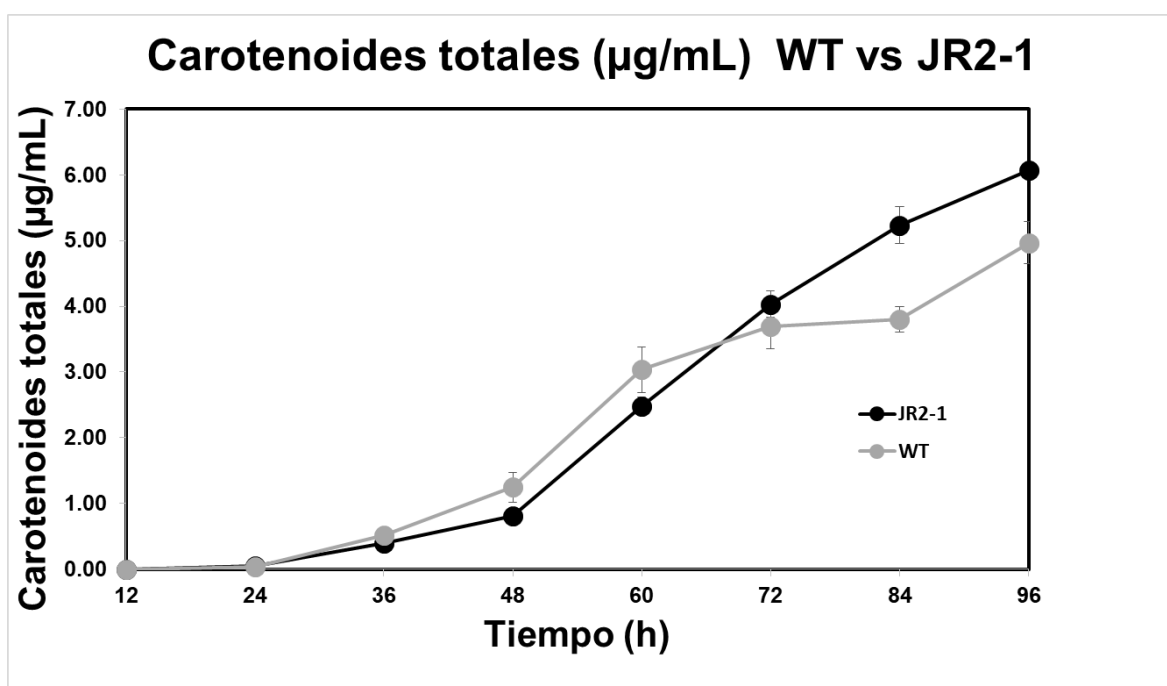


Figura 13: Carotenoides totales ($\mu\text{g/mL}$) producidos por la cepa WT (círculos grises) y por la cepa JR2-1 (círculos negros). Obteniendo un máximo de 4.97 y 6.07 $\mu\text{g/mL}$, para la cepa WT y JR2-1, respectivamente al cabo de 96 horas de cultivo.

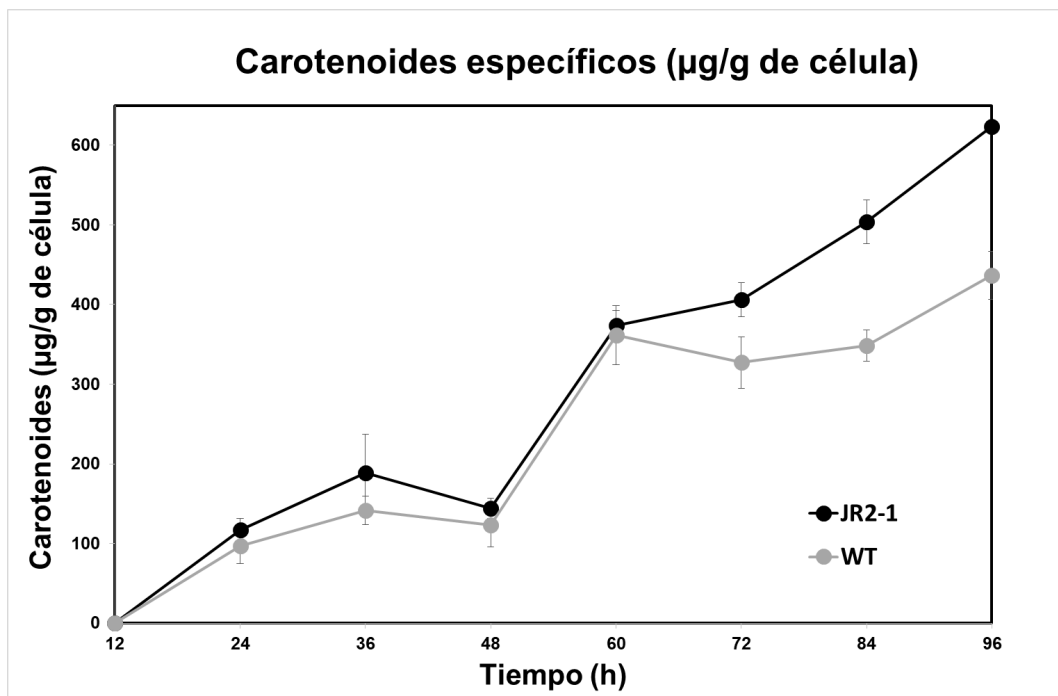


Figura 14: Contenido intracelular de carotenoides ($\mu\text{g/g}$ de células) en la cepa WT (círculos grises) y en la cepa JR2-1 (círculos negros). Para ambas cepas (cepa WT y JR2-1) se observan máximos de 472 y 620 $\mu\text{g/g}$ células, respectivamente al cabo de 96 horas de cultivo.

7.9 Estudios de microrrespirometría de pulsos en Microbiorreactores (MBRs).

La adquisición de datos durante el monitoreo de la concentración de oxígeno para los experimentos de las cepas WT y JR2-1 a pH 6 y 4, arrojaron perfiles respirográficos cuando se suministraron concentraciones crecientes de glucosa (Materiales y métodos, sección 6.1.11). En la Figura 15 se muestran los respirogramas obtenidos.

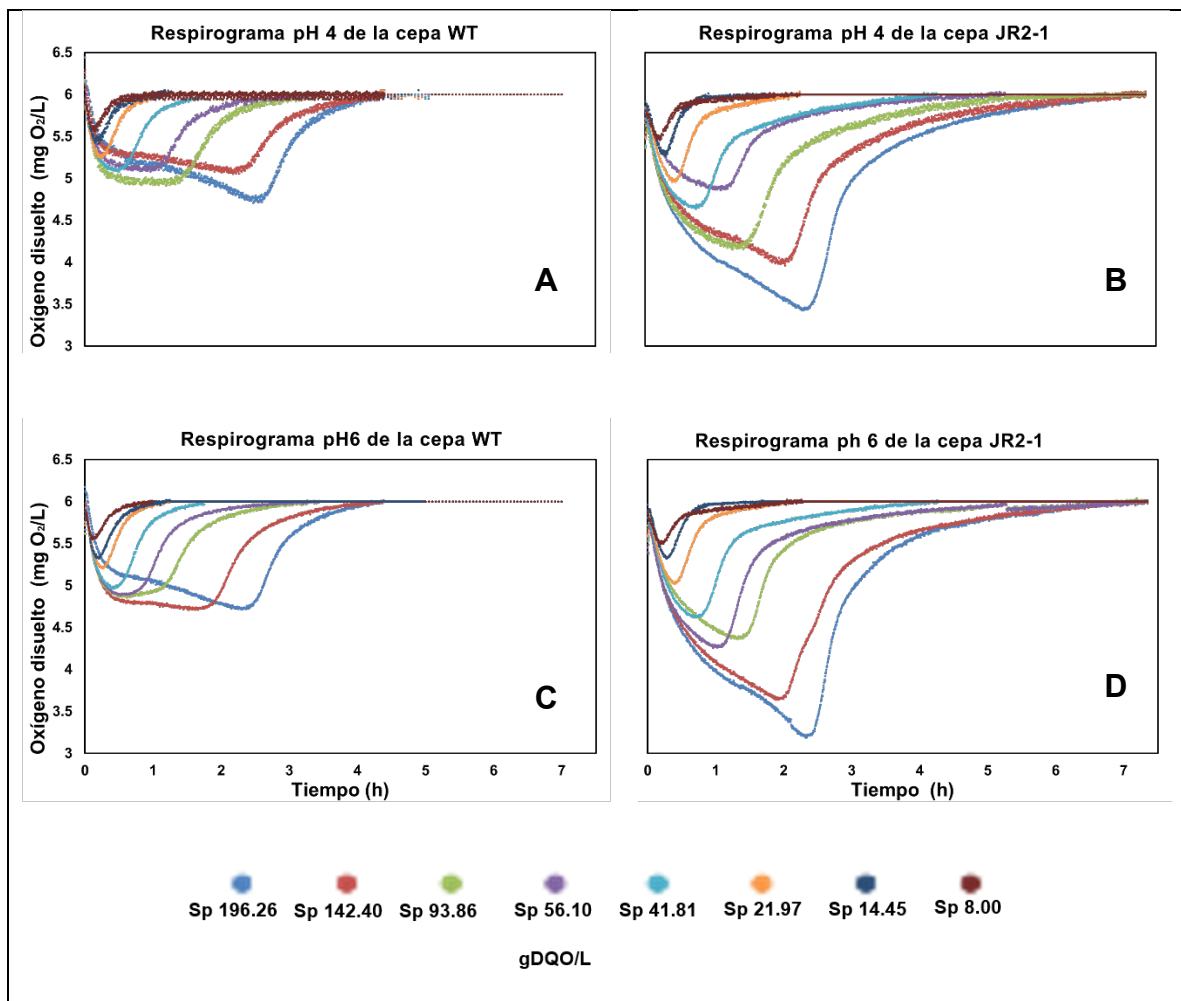


Figura 15: Respirogramas en respuesta a pulsos de 100 μ L de diferentes soluciones de glucosa a 200, 150, 100, 75, 50, 35, 15 y 8 g/L. Estas concentraciones corresponden a DQOs de: 196, 142.4, 93.9, 56.1, 41.8, 22, 14.5 y 8 gDQO/L, respectivamente. A) WT a pH 4; B) JR2-1 a pH 4; C) WT a pH 6; D) JR2-1 a pH 6.

A partir de las concentraciones de oxígeno en los MBRs contra tiempo, se estableció la relación entre la demanda (*OUR*) y el suministro (*OTR*) de oxígeno debido a la aireación y agitación. Para tal efecto, el $k_L a$ fue determinado en cada uno de los pozos, mediante el método dinámico descrito por Badino, *et al.* (2000), obteniendo un promedio de 8 h^{-1} para todos los experimentos (Figura 16).

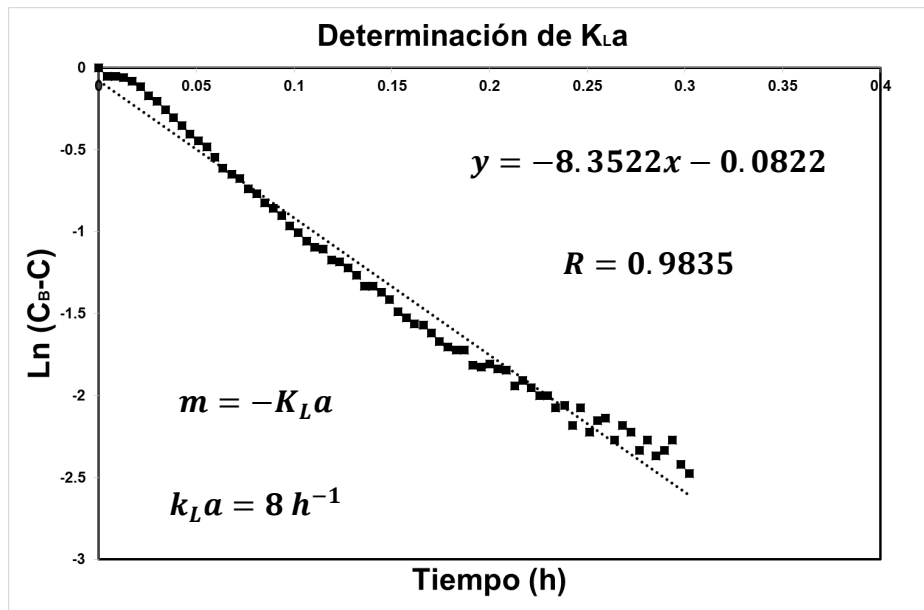


Figura 16: Ejemplo de determinación de k_La . Se consideró una k_La promedio para todos los experimentos igual a 8 h^{-1} . En donde $m = -K_La$.

El rendimiento de oxidación de sustrato ($Y_{O_2/S}$), se determinó al integrar la Ec. 1 y después calculando el consumo de oxígeno por unidad de sustrato (a partir de la inyección de un pulso conocido de glucosa) durante el experimento, en cada pozo, todo expresado en unidades de DQO, para obtener la ecuación 2. El rendimiento celular ($Y_{x/S}$) puede ser obtenido mediante la correlación con a $Y_{O_2/S}$, descrita en la ecuación 3.

Los parámetros cinéticos $OUR_{m\acute{a}x}$, K_S y $\mu_{m\acute{a}x}$ fueron determinados a partir de los datos respirométricos recolectados después de adicionar pulsos con concentraciones crecientes de glucosa (Ramírez-Vargas, *et al.*, 2013).

En cada caso se determinó $OUR_{m\acute{a}x}$ observada ($OUR_{exm\acute{a}x}$). $OUR_{exm\acute{a}x}$ corresponde a la $C_{m\acute{i}n}$ de cada pulso, la cual nos indica en momento en el que la

concentración de sustrato se convierte en el factor limitante, la cual no debe de ser confundida con $OUR_{m\acute{a}x}$ que es un parámetro propio de cada microorganismo dependiendo del tipo de sustrato, en condiciones no limitantes.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_B - C) - OUR \quad (\text{Ec. 1})$$

$$Y_{O_2/s} = \frac{\int_0^t OUR dt}{S_p} = \frac{k_L a \int_0^t (C_B - C) dt + (C_0 - C_f)}{S_p} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$Y_{x/s} = 1 - Y_{O_2/s} \quad (\text{Ec. 3})$$

La $OUR_{exm\acute{a}x}$ fue calculada para cada una de las diferentes concentraciones de glucosa en cada pozo (S_p) a partir de la concentración mínima de OD ($C_{m\acute{i}n}$), mediante la Ec. 4:

$$OUR_{exm\acute{a}x} = k_L a * (C_B - C_{m\acute{i}n}) \quad (\text{Ec. 4})$$

Se determinaron $OUR_{m\acute{a}x}$ (Ec. 6) y K_s (Ec. 7), mediante la linealización de la Ec. 5 por el método de Hanes-Woolf, de los diferentes S_p de cada pozo contra $S_p/OUR_{exm\acute{a}x}$ (Figura 17).

La determinación de $\mu_{m\acute{a}x}$ se consiguió mediante la Ec. 8, todo en unidades de DQO:

$$\frac{S_p}{OUR_{exm\acute{a}x}} = \frac{S_p}{OUR_{m\acute{a}x}} + \frac{K_s}{OUR_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$OUR_{m\acute{a}x} = \frac{1}{m} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$K_s = \frac{S_p}{OUR_{exm\acute{a}x}} - (m * S_p * OUR_{m\acute{a}x}) \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = OUR_{m\acute{a}x} * \frac{Y_{x/s}}{X - Y_{O_2/s}} \quad (\text{Ec. 8})$$

En dónde m = pendiente de la recta

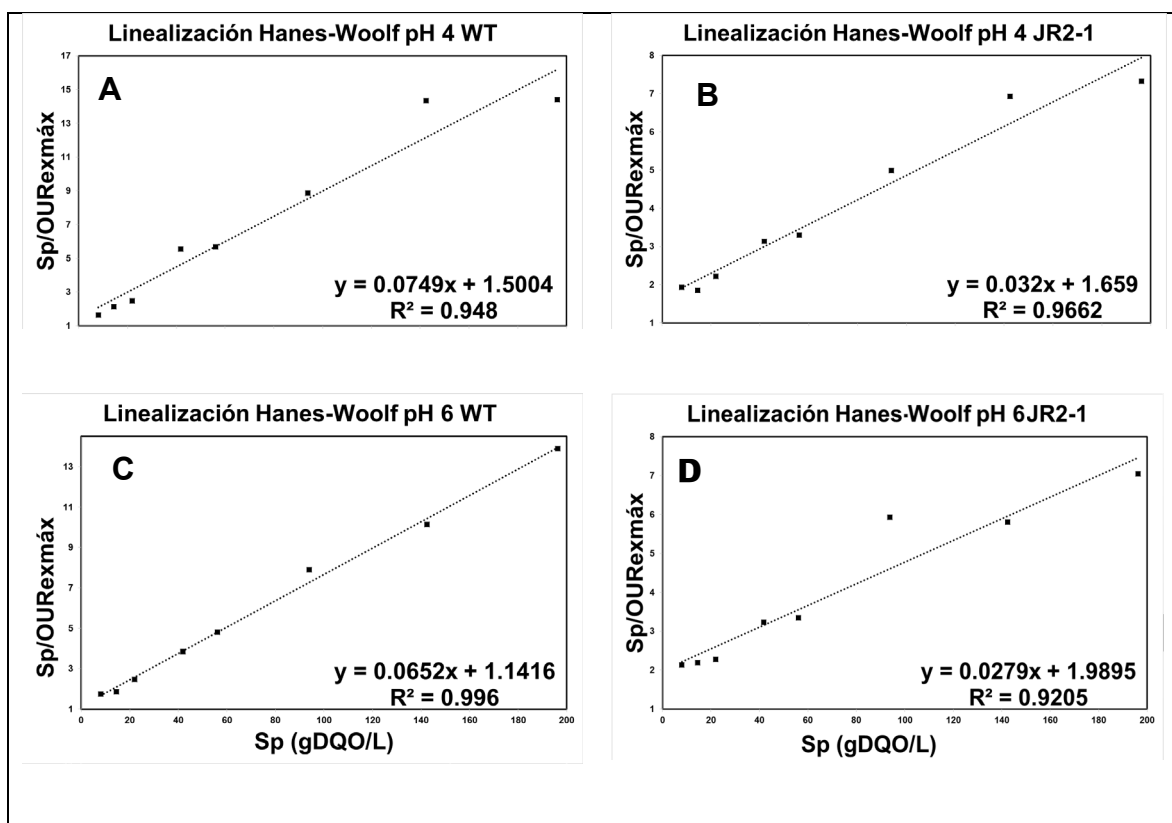


Figura 17: Gráficos de Hanes-Woolf para las cepas WT y JR2-1 a dos pH distintos. K_s y $OUR_{m\acute{a}x}$ fueron determinados a partir de la pendiente de la gráfica, en cada caso. A) WT a pH 4; B) JR2-1 a pH 4; C) WT a pH 6; D) JR2-1 a pH 6.

Los parámetros calculados para cada experimento a partir de las ecuaciones antes mencionadas, se resumen en la Tabla 4:

Tabla 4

Parámetros cinéticos calculados a partir de datos obtenidos por microrrespirometría de pulsos crecientes en las cepas WT y JR2-1. En donde S= mgDQOL⁻¹.

	WT		JR2-1	
	pH 6	pH 4	pH 6	pH 4
$OUR_{m\acute{a}x}$ (mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	14.8	12.35	29.95	25.14
K_s (mgDQOL ⁻¹)	14.7	7.72	54.75	33.95
$Y_{O_2/s}$ (gO ₂ DQOS ⁻¹)	0.20	0.20	0.34	0.32
$Y_{x/s}$ (gDQOX * gDQOS ⁻¹)	0.8	0.8	0.66	0.68
$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	0.148	0.1235	0.145345	0.1335

Al realizar una comparación de $\mu_{m\acute{a}x}$ entre el pH de 4 y el pH 6, para las dos cepas, se observa un incremento en la velocidad máxima de crecimiento a un pH de 6, como se ha reportado en la literatura (Hu, *et al.*, 2006).

En cada una de las cepas, el rendimiento celular mostró un comportamiento similar entre pH 4 y 6; pero al compararlas, JR2-1 mostró un $Y_{x/s}$ menor (15%), y por consiguiente, un aumento en el $Y_{O_2/s}$. La $OUR_{m\acute{a}x}$ aumentó más del doble en la cepa JR2-1, lo que indica que necesita una mayor cantidad de oxígeno para poder oxidar la misma cantidad de sustrato que la cepa WT (Figura 18), debido a que la afinidad al sustrato disminuye en promedio 4 veces. En la Figura 18, se muestra cómo la K_s aumenta en B y D, correspondiendo a JR2-1.

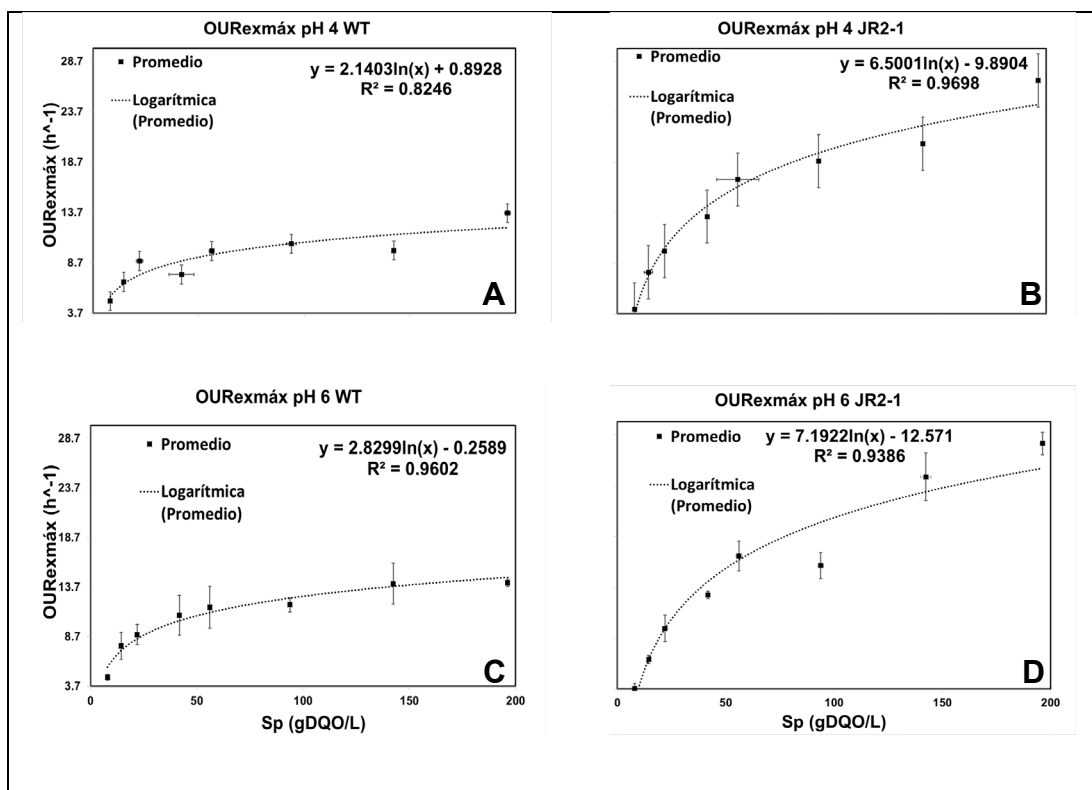


Figura 18: Para cada Sp (gDQO/L) se realizaron triplicados (a menos que se indique lo contrario), los cuales fueron promediados y ajustados a un modelo tipo Monod. A) WT a pH 4; B) JR2-1 a pH 4; C) WT a pH 6; D) JR2-1 a pH 6.

En la Figura 19 se muestra la variación de $OUR_{exmáx}$ durante cada experimento. La cepa JR2-1 exhibió un consumo de oxígeno mayor a pH 4 y 6 que la cepa WT, en todos los casos. Por otra parte, a la cepa JR2-1 le toma más tiempo el poder oxidar el mismo sustrato, ejemplo de ello es a pH 6, para oxidar toda la glucosa en el pozo con una concentración de 142.40 gDQO/L a la cepa WT le toma 4 h, mientras que a JR2-1, le lleva 6 h. Esto podría ser debido que la respiración se vio afectada en la cepa modificada, haciéndola más ineficiente.

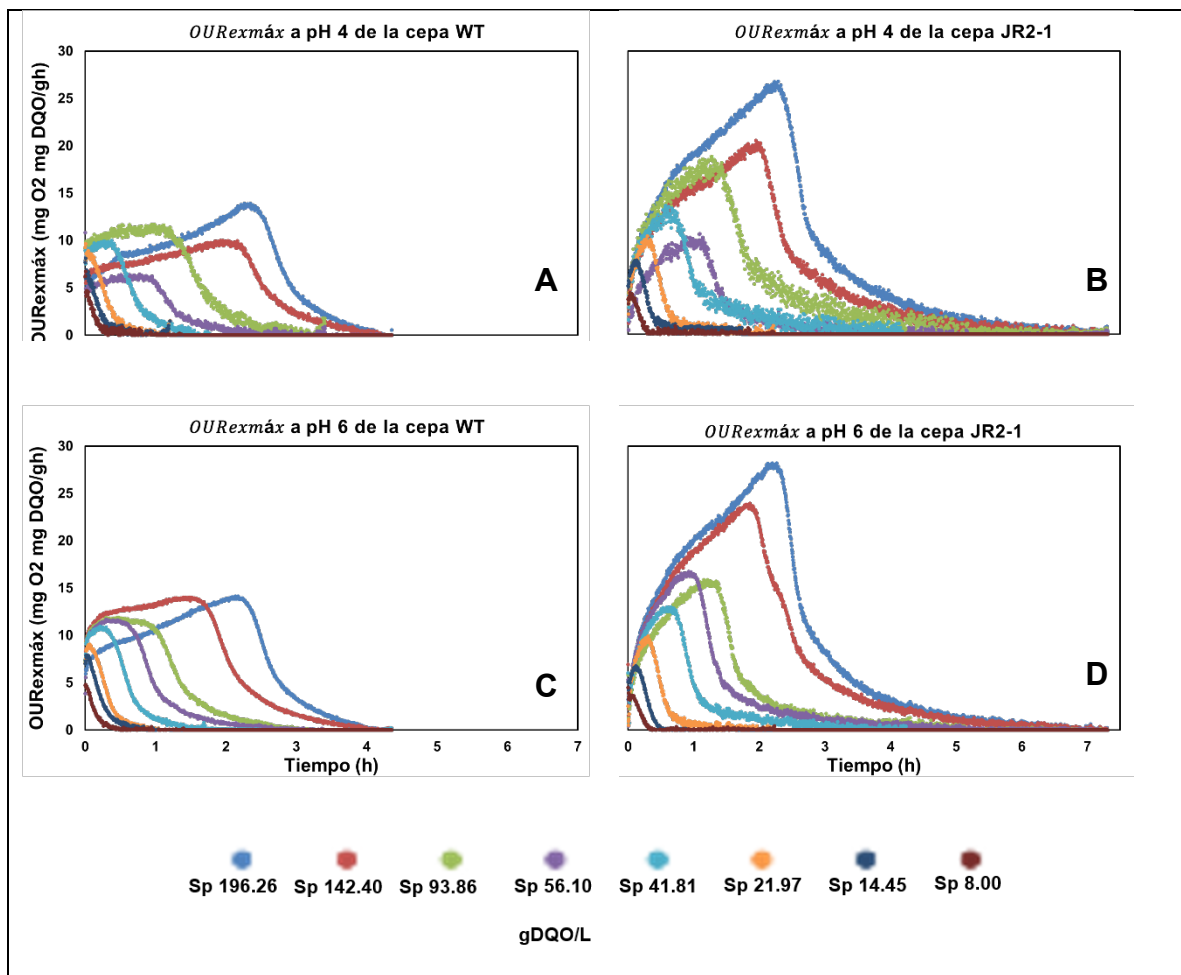


Figura 19: $OUR_{\text{máx}}$ vs tiempo (h). A) WT a pH 4; B) JR2-1 a pH 4; C) WT a pH 6; D) JR2-1 a pH 6.

El mayor consumo de oxígeno en la cepa JR2-1, podría indicar un incremento en la permeabilidad de los protones de la membrana interna, a causa de un posible desequilibrio en la proporción $NADH/NAD^+$ en la mitocondria (Mourier, *et al.*, 2010).

Sco1 juega un papel importante en la entrega de cobre en el centro activo de la COX, en dónde también participa el canal-D, el cual permite la transferencia de protones a través de la MIM. Se ha reportado que mutaciones cercanas a este canal desencadenan una fuga de protones (Siegbahn & Blomberg, 2014).

La fuga de protones ocurre cuando la cadena principal de transporte de electrones es inhabilitada, originando que los electrones pueden pasar a través de la MIM sin necesidad de pasar a través de la cadena de transporte de electrones. Los electrones pasan a través de la cadena respiratoria antes de que la COX pueda reducir el oxígeno a agua, provocando que en su lugar reaccione el O₂ y forme superóxido, favoreciendo la formación de ROS, como peróxido de hidrógeno o radicales que reaccionan con lípidos (Fomby, *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la fuga de protones juega un papel protector contra la producción de ROS. Este mecanismo provoca una baja en la fuerza protón-motriz, incrementando el consumo de oxígeno (Brand, *et al.*, 1994), teniendo como resultado la disminución de la tensión del oxígeno alrededor de la mitocondria y afectando la producción de súper óxido se ve afectada al (por disminución de la concentración de oxígeno), lo que protege a la célula (Brand, 2000); lo cual podría explicar el incremento en la tasa de consumo de oxígeno en la cepa JR2-1, en comparación con la cepa WT.

La producción de carotenoides, estaría destinado a ayudar a controlar la concentración de ROS que escapan de este mecanismo de protección celular (Brookes, 2005; Fomby, *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha reportado un modelo metabólico que propone un consumo de 21 mol de O₂ por 1 mol de astaxantina sintetizada, pudiendo explicar porque aumentó el consumo de oxígeno. Además, en células de *P. rhodozyma* cuando la cadena de transporte de electrones se ve interrumpida o afectada, se activa la síntesis de una oxidasa alterna (AOX) la cual ayuda a oxidar las especies de NADH generadas durante el metabolismo basal del

microorganismo, (Li, *et al.*, 2008). Esta enzima se activa al verse afectada la cadena respiratoria, y a pesar de que su eficiencia es menor a COX, también ocupa el oxígeno como último aceptor de electrones (Martínez-Cárdenas, *et al.*, 2018).

7.10 Amplificación del gen *Sco1*.

La cepa JR2-1 fue modificada con el plásmido dos, que contenía el sgRNA: 5'-CAACAACCTGCTCGGCCGTA-3'. Para comprobar la modificación en el genoma de *X. dendrorhous*, se diseñaron diferentes pares de iniciadores (Tabla 5).

Tabla 5

Pares de iniciadores utilizados para amplificar partes del gen SCO1.

Par de iniciadores	Tamaño de amplicón esperado (pb)
Fi-Ri	402
F1-R1,2	1460
F2-R1,2 ^a	777

Para corroborar la modificación en la secuencia blanco, generada por Cas9 del plásmido dos, en un principio se intentó amplificar con el par de iniciadores F1-R1,2, los cuales flanquean dicha secuencia, sin embargo, sólo se logró amplificar la secuencia nucleotídica de la cepa WT (Figura 21, carriles 1, 2 y 3). Para descartar problemas con la mezcla de PCR, condiciones de PCR e integridad/concentración del nDNA extraído de cada una de las cepas, se realizó una amplificación con los iniciadores F2-R1,2. Estos iniciadores amplifican una región de 777 pb corriente abajo de la secuencia de interés. Para la cepa WT, JR2-1 y JR2-2 se obtuvieron los

amplicones del tamaño esperado (Figura 21, carriles 4, 5 y 6), descartando los problemas antes mencionados.

El corte esperado por Cas9 se localiza tres bases corriente arriba de la PAM del sgRNA establecido, por lo que una modificación de tipo *InDel* se esperaría en una región circundante a esta posición (LN483345.1: 696838). Al no poder amplificar con F1-R1,2 las cepas JR2-1 y JR2-2, se propuso un nuevo par de iniciadores (Fi-Ri).

```

5' -TAARCATG Fi→ GCACATATTTCTTTACAGACAAGTCATTTCAGTCATGTTTCAGATGTTATTCT
TGTTCCTTCTCATAATTTCTGTCCTACTCATCAAGAGAATCGTCGCAATCAAAGACATATATGATACGC
CAAAGGGGAGAT F1→ CGACGCCAATTTTGAAGCCGCTTTGGTCTCTGTTCCAATCGGCTAGGGCCCT
BLANCO→ TCAACAACCTCTCGGCCGTTGGTCTTTCGCCAAGCATCGACAATGCGCCGTCGGG
ATCCATCAGATAGAAAGTAAATACTGTTGGACATAAAAAGTAAAAGCCAGGTCGATTTGTCAAGAGGAGGA
ACTCAAGAAAGAACAGAGAAAGCATTGGAGGGAGTTCCTCAC Ri→ TAACAGAGTAATCATCGTCG
GTCCAGCTGTGGGAGGAGTCGAGAAGTAAACTCGGAAGGCTTTGCACATGGCCTTGACGGCTCGAAAGG
TCCAGTGAGACCAACCGCTTCGGGGATGGAAGTCTTTTATATAGCATCCCGGTCATAAATCAGCGCCAGAC
ATAGGGAACCCCAACCATATATGACAAACTGAGAAGGCCAAAAGGAGGCTTAAGGGGACTTACCAGCAAC
ATATGCTTTCACGGTCGGCACAATCATCTCGGGCAGGATCGCAAGAGATGAATACAGGTGCGCAAAATCTTT
CCGTGCTTTTCTGAAAAGAGATGAAGGGGAGGTAAGGATAAAGGTCATTGTCCAGATCAATAAGAAAGTG
GTACCCT F2→ TCCCTTCTAGAGAAACCCACAGCCAACAGAAGAGCAAAGAGAGCCACCCGCAATAT
CCACCACCTTCACTCATCTTATCAAGCTCTCCGGACAGATATCAGGACAGTTGGTGAACCCAAAGTACAT
CAAACTCCATTGTCGAGCAAGTTTTTCTCGGTAAAAACATTGCCATTATGATCGAGCAATGAGAATGGT
CTCCGATCAGGGGTTTTCCGGTCTTGACCGGACTTGGCATGCTGTTGGCCTTTGATATGGAAGAGAGAG
ATAACCCGAGAGGCGTTGATTTGTTAGCTTCGATCTCTATGTTAAATGGACGAAACTATATCACTGCGGG
AAACATACGCTTGAGTTCTTGAATACGTTCTTCTCCAGTAAAGTATACGTACAACCCAACTCCAGCC
GCCACGAAGAGACTGCTGCCCTTCCAGTTGAAAACCTAGATGTATCATCCATCCAAATCAGAAGCAAAC
GTAACGATTCTATAAGTTTTCGTTGTCACGGGAGATAAAAACACCAACCATTACGAAGATAATGTAGGCAG
AAGGAGAGAAAGAAJAATGACAGGAGGTAGGAAAAAATCCCTCCGATGAAGAGGAAACGAAGAAACTC
AAACATCGACTGACCCCAATGAGTTCAAGAGGAACTAGCCGGTCTGCCAGCATACGGCTTCTCCAGAGGAG
CCTTGAAGTTCGATTTCTCCATTCTGAGGTGATACATCGCCTGAGGCTTCCGAGGAGGGGTCGACCC
GGAAAGGGAAGCAGAACCTGGAGAAACATAAGACCTTCGGACCAAGGG R1,2→ AGAAAGGCAAGGT
CGGAAGGATCCGGCGCCGTTCCGTTGAGTGGCCGAAACGGTGAAGCTGTGATAATCGAGATGCAGATGGGG
TGAACATGAATATAGTGGAGGAAGAGAAGAGGATGGGTGGTGGTACGAAGAAATAGTCAAGATCGG
TTGAGTGTAGTTCAAGAAGCCGGCGGGAATATCGACAACGGTCTGCCGG-3'

```

Figura 20: Gen *Sco1* de *X. dendrorhous* (LN, GenBank). . a) Los iniciadores Fi y Ri, amplifican 402 pb; b) Los iniciadores F1 y R1,2 se espera generen un amplicón de 1,460 pb; c) Los iniciadores F2 y R1, 2 generarían un amplicón de 777 pb.

Se buscó una posición más alejada corriente arriba de F1 (LN483345.1: 696617), en caso de que la modificación tipo *InDel* hubiese alterado la secuencia nucleotídica del nDNA de las cepas JR2-1 y JR2-2, que a tal grado, no permitiera la amplificación. Una vez más, sólo se obtuvieron amplicones de la cepa WT, con el peso esperado. Por otra parte, se ha reportado que las deleciones obtenidas mediante CRISPR-Cas9 son en promedio de 9 pb, aunque Shin, *et al.*, (2017), obtuvieron deleciones de hasta 600 pb, lo que podría explicar porque no se logró la

amplificación. En todos los casos se logró la amplificación con la cepa WT, lo cual descarta un mal diseño de iniciadores. Será necesario diseñar nuevos oligos, que permitan amplificar la región blanco, ya que en nuestro estudio no se logró realizar la amplificación y por ende tampoco la secuenciación.

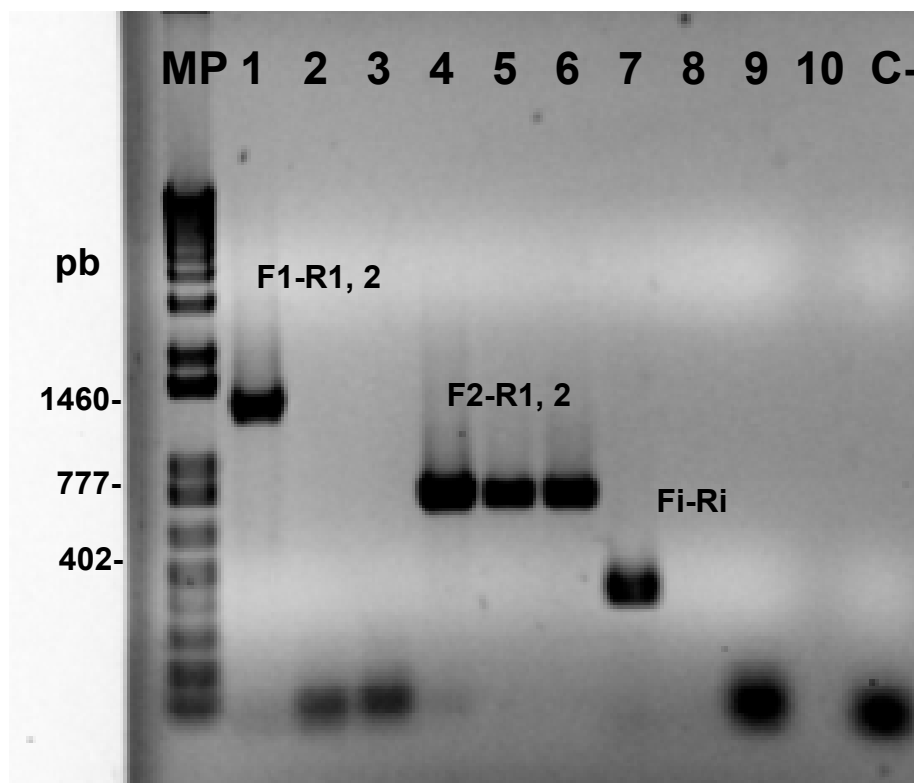


Figura 21: Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus de Thermo Fisher Scientific. Carril 1, amplificación de 1460 pb de la cepa WT con el par de oligos F1-R1, 2. Carriles 2 (JR2-2) y Carril 3 (JR2-2), no se obtuvieron amplicones con los oligos F1-R1, 2. Carriles 4(WT), 5 (JR2-1) y 6 (JR2-2), amplificaciones con los oligos F2-R1, 2 con productos de 777 pb. Carril 7(WT) producto de PCR de 402 pb por el par de oligos Fi-Ri. Carril 8 (JR2-1) y 9 (JR2-2) no generó amplicones con los oligos Fi y Ri. En el Carril 11 se encuentra el control negativo (mezcla de PCR sin DNA).

8. Conclusiones

Se obtuvieron clones de *E. coli* y *X. dendrorhous* con el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458).

La transformación de *X. dendrorhous* mediante protoplastos mostró ser una metodología efectiva.

Se obtuvieron clones transformadas de *X. dendrorhous*, las cuales se recuperaron mediante Citometría de Flujo (FACS). Cinco clones con el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458), presentaron fenotipo y morfologías coloniales distintas.

La cepa JR2-1 produce 18% más carotenoides totales en comparación con la cepa WT.

La cepa JR2-1 produce 24% más carotenoides específicos en comparación con la cepa WT.

En la cepa JR2-1 modificada, se observó una velocidad máxima de consumo de oxígeno del doble, en comparación con la cepa WT.

La cepa JR2-1 creció 7% menos (750 mg/L) a las 96 h, en comparación con la cepa WT.

9. Referencias

- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Baeza & Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC microbiology*, 8(1), 169.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Marine drugs*, 12(1), 128-152.
- An, G. H., & Johnson, E. A. (1990). Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(4), 191-203.
- An, G. H., Schuman, D. B., & Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 116–124.
- Badino A.C., Facciotti M.C.R., Schmidell W., Improving kLa determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (2000) 469-474.
- Baker, R., & Günther, C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 484-488.
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J., Kötter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH

- metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37.
- Banting, G. S., & Glerum, D. M. (2006). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. *Eukaryotic cell*, 5(3), 568-578.
- Becker, D. M., & Lundblad, V. (1994). Introduction of DNA into yeast cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, 27(1), 13-7.
- Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology*, 35(6-7), 811-820.
- Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F., & Porter, R. K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1187(2), 132-139.
- Brehm-Stecher, B. F., & Johnson, E. A. (2012). Isolation of carotenoid hyperproducing mutants of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) by flow cytometry and cell sorting. In *Microbial Carotenoids From Fungi* (pp. 207-217). Humana Press, Totowa, NJ.
- Britton, G. (1996). Carotenoids. In *Natural food colorants* (pp. 197-243). Springer, Boston, MA.
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12-23.

- Carr, H. S., & Winge, D. R. (2003). Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Accounts of Chemical Research*, 36(5), 309-316.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante, Z. R., Marsch, R., del Carmen Montes, M., Sánchez, S., Cancino-Díaz, J. C., & Flores-Cotera, L. B. (2010). ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1953-1960.
- Clesceri, L., Greenberg, A. E., & Eaton, A. D. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, 4, 137-41.
- Dufossé, L. (2006). Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 313-323.
- Esquivel-Ríos, I., Ramírez-Vargas, R., Hernández-Martínez, G. R., Vital-Jácome, M., Ordaz, A., & Thalasso, F. (2014). A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochemical engineering journal*, 83, 70-78.
- Farzadfard, F., Perli, S. D., & Lu, T. K. (2013). Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS synthetic biology*, 2(10), 604-613.

- Flores-Cotera, L. B., & Sanchez, S. (2001). Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. *Biotechnology Letters*, 23(10), 793-797.
- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., & Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1129-C1147.
- Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(2), 163.
- Gamberi, T., Magherini, F., Borro, M., Gentile, G., Cavalieri, D., Marchi, E., & Modesti, A. (2009). Novel insights into phenotype and mitochondrial proteome of yeast mutants lacking proteins *Sco1p* or *Sco2p*. *Mitochondrion*, 9(2), 103–114.
- Gamberi, T., Puglia, M., Bianchi, L., Gimigliano, A., Landi, C., Magherini, F., ... Bini, L. (2012). Evaluation of *SCO1* deletion on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism through a proteomic approach. *Proteomics*, 12(11), 1767–1780.
- Heaton, D., Nittis, T., Srinivasan, C., & Winge, D. R. (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone *Cox17*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37582–37587.

- Hu, Z. C., Zheng, Y. G., Wang, Z., & Shen, Y. C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 586–590.
- Johnson, E. A. (2003). *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology*, 6(3), 169–174.
- Li, Y., Sommerfeld, M., Chen, F., & Hu, Q. (2008). Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 165(17), 1783–1797.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of Genomic DNA From Yeasts for PCR- Based Applications. *Biotechniques*, 50(5), 325–328.
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M.,... & Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC microbiology*, 12(1), 235.
- Martínez-Moya, P., Watt, S. A., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11(1), 131.
- Martínez-Cárdenas, A., Chávez-Cabrera, C., Vázquez-Bahena, J. M., & Flores-Cotera, L. B. (2018). A common mechanism explains the induction of aerobic

fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*. *Microbial Cell Factories*, 17:53.

Mick, D. U., Fox, T. D., & Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(1), 14–20.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

Mourier, A., Devin, A., & Rigoulet, M. (2010). Active proton leak in mitochondria: a new way to regulate substrate oxidation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(2), 255-261.

Nittis, T., George, G. N., & Winge, D. R. (2001). Yeast Sco1, a Protein Essential for Cytochrome c Oxidase Function Is a Cu(I)-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42520–42526.

Nyhus, K., & Jacobson, E. S. (2004). Oxy2 as a transcriptional activator gene for copper uptake in *Cryptococcus neoformans*. *Medical mycology*, 42(4), 325-331.

Oliveira, C. S., Ordaz, A., Ferreira, E. C., Alves, M., & Thalasso, F. (2011). In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal*, 58–59(1), 12–19.

- Pierron, D., Wildman, D. E., Hüttemann, M., Letellier, T., & Grossman, L. I. (2012). Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748(October), 185–213.
- Rak, M., Benit, P., Chretien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., El-Khoury, R., ... Rustin, P. (2016). Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clinical Science*, 130(6), 393–407.
- Ramirez-Vargas, R., Vital-Jacome, M., Camacho-Perez, E., Hubbard, L., & Thalasso, F. (2014). Characterization of oxygen transfer in a 24-well microbioreactor system and potential respirometric applications. *Journal of Biotechnology*, 186, 58–65.
- Rick, W. Y., Sharpe, P. L., & Zhu, Q. (2012). Bioengineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for lycopene production. In *Microbial Carotenoids from Fungi* (pp. 153-159). *Humana Press, Totowa, NJ*.
- Rodríguez-Sáiz, M., De La Fuente, J. L., & Barredo, J. L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 645–658.
- Rogov, A. G., & Zvyagilskaya, R. A. (2015). Physiological Role of Alternative Oxidase (from Yeasts to Plants). *Biochemistry (Moscow)*, 80(4), 400–407.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D., & Arnold, F. H. (2000). Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nature Biotechnology*, 18(7), 750–753.

- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., ... & Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(3), 555-571.
- Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., & Thines, M. (2015). The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. *BMC Genomics*, 16(1), 233.
- Shin, H. Y., Wang, C., Lee, H. K., Yoo, K. H., Zeng, X., Kuhns, T., ... & Hennighausen, L. (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nature communications*, 8, 15464.
- Siegbahn, P. E., & Blomberg, M. R. (2014). Mutations in the D-channel of cytochrome c oxidase causes leakage of the proton pump. *FEBS letters*, 588(4), 545-548.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., & Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(6), 883-897.
- Stumpferl, S. W., Stephan, O., & Osiewacz, H. D. (2004). Impact of a Disruption of a Pathway Delivering Copper to Mitochondria on *Podospora anserina* Metabolism and Life Span. *Eukaryotic Cell*, 3(1), 200–211.

- Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N., Mehaye, B., Amiel, J., Cormier-Daire, V., ... Rötig, A. (2000). Mutations of the *SCO1* gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *American Journal of Human Genetics*, 67, 1104–9.
- Wery, J., Gutker, D., Renniers, A. C. H. M., Verdoes, J. C., & Van Ooyen, A. J. J. (1997). High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene*, 184(1), 89–97.
- Wu, W., Lu, M., & Yu, L. (2011). A new environmentally friendly method for astaxanthin extraction from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *European Food Research and Technology*, 232(3), 463–467.
- Yamamoto, K., Hara, K. Y., Morita, T., Nishimura, A., Sasaki, D., Ishii, J., ... Kondo, A. (2016). Enhancement of astaxanthin production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by efficient method for the complete deletion of genes. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 155.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., & Nishio, N. (1997). Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. *Applied and environmental microbiology*, 63(11), 4471-4478.