



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

**INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA
PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN EL
HONGO INDUSTRIAL *Ashbya gossypii***

PATRICIA LOZANO MARTÍNEZ

TESIS DOCTORAL 2016

Dr. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA: Que la licenciada Dña. Patricia Lozano Martínez ha realizado en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, el trabajo titulado **“INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN EL HONGO INDUSTRIAL *Ashbya gossypii*”** para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, y como director del trabajo, expide el presente certificado en:

Salamanca Septiembre de 2016

Fdo.: Dr. José Luis Revuelta Doval

Agradezco,

Al Dr. José Luis Revuelta, director de esta tesis, por la oportunidad de realizar este trabajo, y por su dedicación y guía a lo largo de estos cuatro años.

A los Drs. M^a Ángeles Santos y Alberto Jiménez, por estar siempre dispuestos a echar una mano cuando lo necesitas.

Al Dr. Rubén Martínez, no sólo por su apoyo en el día a día, sino por su esfuerzo en la recta final de la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Rodri, David, Cris y Jose, que siempre han respondido a todas mis dudas con mucha paciencia. A Fernando, que siempre está dispuesto a ayudar con lo que sea. A Lola y Silvia, todo lo que sé lo aprendí de vosotras. Para mi sois mucho más que compañeros de laboratorio.

A mis amigos, los de Burgos y los que he conocido en Salamanca. Los amigos son la familia que eliges.

A mi familia, porque el esfuerzo de los abuelos y después de mis tíos y mis padres han hecho que nuestra generación tengamos la oportunidad de decidir lo que queremos hacer en nuestra vida. En especial a mis padres, por su apoyo incondicional a lo largo de muchos años. Y a Dani y Ale, porque estáis siempre ahí.

A Nico, parte de este trabajo es tuyo, porque has compartido esta aventura conmigo y siempre me has ayudado en todo lo que has podido, no sólo a nivel personal, sino también profesional. Esto ha sido un gran reto que no hubiese podido superar sin tenerte a mi lado.

ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
TG	Triglicéridos
<i>Ag</i>	<i>Asbhya gossypii</i>
ARA	Ácido araquidónico ó 5,8,11,14-eicosatetranoico, C20:4 n-6
cDNA	DNA complementario
<i>Cp</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
EPA	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaico ó C20:5 n-3
DHA	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahehexanoico ó C22:6 n-3
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos (de la terminología inglesa 'Fatty acid methyl esters')
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
mRNA	RNA mensajero
ORF	Fase de lectura abierta (de la terminología inglesa 'Open Reading Frame')
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (de la terminología inglesa 'Polymerase Chain Reaction')
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (de la terminología inglesa Real Time Polymerase Chain Reaction)
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Yl</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROORGANISMOS

1.1 Lípidos: estructura y biología

1.1.1 Ácidos grasos libres

1.1.2 Triglicéridos

1.2 Importancia de los ácidos grasos y necesidad de nuevas fuentes de lípidos

1.3 Metabolismo lipídico en microorganismos

1.3.1 Ruta de síntesis '*de novo*' de ácidos grasos

1.3.2 Ruta de síntesis '*ex novo*' de ácidos grasos

1.3.3 Ruta de biosíntesis de triglicéridos y formación de cuerpos lipídicos

1.3.4 Ruta de degradación de ácidos grasos

2. *Ashbya gossypii*

2.1 Biología

2.2 Interés industrial

2.3 Producción de lípidos en *A. gossypii*

OBJETIVOS

Objetivos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN *A. gossypii*

1.1 Caracterización de los genes *OLE* implicados en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados

1.1.1 Caracterización funcional de las dos presuntas $\Delta 9$ desaturasas de *A. gossypii* en *S. cerevisiae*

1.1.2 Deleción y sobreexpresión de los genes *OLE* en *A. gossypii*

1.1.3 Producción de lípidos de las cepas mutantes en los genes *OLE*

1.1.5 Efecto de la sobreexpresión de *AgOLE1* y *AgOLE2* y de la delección de los genes *AgPOX1* y *AgDES589* en la producción de lípidos

1.3 Producción de ácido linoleico y ricinoleico en *A. gossypii* mediante la expresión de una desaturasa/hidroxilasa de *C. purpurea* (*CpFAH12*)

1.3.1 Expresión heteróloga de *CpFAH12* en el tipo silvestre de *A. gossypii*

1.3.2 Expresión heteróloga de *CpFAH12* en diferentes fondos genéticos en *A. gossypii*

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROORGANISMOS

El objeto de estudio de este trabajo se enmarca en una línea de investigación que se encarga del análisis de la ruta biosintética de formación de triglicéridos en el hongo filamentoso *A. gossypii* y el incremento de la acumulación de lípidos en las células.

1.1 Lípidos: estructura y biología

Los lípidos son sustancias hidrofóbicas solubles en disolventes orgánicos. Pueden encontrarse en forma sólida, denominada grasa, o líquida, siendo aceite la denominación común en este caso. El punto de fusión de los lípidos y su forma a temperatura ambiente depende de la composición de ácidos grasos libres (AGL) que conforman los triglicéridos (TG). Los lípidos en las células se encuentran mayoritariamente acumulados en forma de TG, y en menor proporción en forma de AGL (Figura 1). También se pueden encontrar en forma de fosfolípidos, que constituyen las membranas celulares, y en forma de esteroides (Michal y Schomburg, 2012).

1.1.1 Ácidos grasos libres

Los AGL están formados por un grupo carboxílico (-COOH) unido a una cadena de carbonos. En la célula, se acumulan en forma de TG, tras la condensación de los ácidos grasos libres con una molécula de glicerol, existiendo solamente una pequeña proporción de AGL en las células eucariotas. Los ácidos grasos que se esterifican junto a la molécula de glicerol pueden ser saturados, monoinsaturados, diinsaturados o poliinsaturados.

Los AGL que se encuentran en plantas y mamíferos tienen habitualmente entre 14 y 20 átomos de carbono y forman una cadena lineal, sin ramificaciones laterales. Existen por naturaleza tanto ácidos grasos saturados como monoinsaturados con un enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10. Si existen más insaturaciones, éstas se encuentran entre el primer doble enlace y el extremo metilo del ácido graso, formando los ácidos grasos poliinsaturados. Algunos ácidos grasos no pueden ser sintetizados por las células eucariotas y es necesario su aporte a través de la dieta.

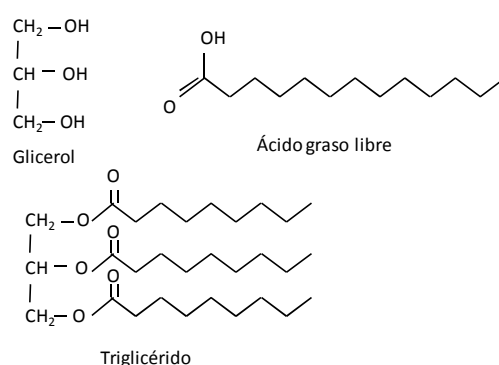


Figura 1. Estructura química de las moléculas de glicerol, ácidos grasos libres y triglicéridos.

La nomenclatura de los ácidos grasos libres consta de una C_n donde n indica el número de carbonos de la cadena, seguida por dos puntos y un número que indica el número de insaturaciones. Además, en algunos casos se usa la nomenclatura n-a o w-a, para indicar el

número de carbonos que hay desde el extremo metilo de la cadena donde está el último doble enlace. Por ejemplo, C18:3 (n-3) es un ácido graso con 18 carbonos, tres insaturaciones, y la última insaturación está en el tercer carbono desde el extremo metilo de la cadena.

1.1.2 Triglicéridos

La mayoría de los ácidos grasos libres se acumulan en forma de TG en plantas y animales, de manera que tres ácidos grasos libres iguales, o con mayor frecuencia diferentes, se unen a una molécula de glicerol formando los triglicéridos, que son lípidos neutros. En el caso de las células, los TG están en fase fluida y, al ser hidrofóbicos, están rodeados de una membrana para formar los denominados cuerpos lipídicos.

1.2 Importancia de los ácidos grasos y necesidad de nuevas fuentes de lípidos

Los ácidos grasos y sus derivados como el biodiesel, lubricantes, adhesivos y plásticos, entre otros, se han producido tradicionalmente como derivados de la industria petrolífera o a partir de aceites vegetales y grasas animales. Actualmente, la fluctuación del precio del barril de petróleo, la preocupación por la estabilidad en su suministro, así como la ocupación de terrenos de cultivo para producir aceites vegetales que podrían dedicarse a la producción de alimentos, han hecho que surja una preocupación creciente en cuanto a los sustratos necesarios para satisfacer la demanda actual de lípidos y derivados. Por otra parte, algunos de los ácidos grasos poliinsaturados como los denominados ácidos grasos omega-3 y omega-6 son utilizados como suplementos dietéticos. Aunque se pretende que la creciente demanda de estos complementos dietéticos pueda ser satisfecha con productos marinos, principalmente algas y aceite de pescado, se está tratando de buscar alternativas más económicas (Ratledge, 2002).

La producción de aceites a partir de microorganismos supone importantes ventajas con respecto a la tradicional obtención de lípidos. Algunas de estas ventajas se basan en que este tipo de producción no compite con la producción de alimentos, al no necesitar grandes terrenos de cultivo. Además, la síntesis de lípidos con microorganismos no depende del clima ni de la estación del año y los ciclos de producción son mucho más cortos que en el caso de las plantas donde una cosecha necesita meses para poder recogerse. Finalmente, las fermentaciones industriales tienen importantes ventajas medioambientales con respecto a la síntesis química de muchos productos y, sobre todo, evitan el uso de fuentes de energía no renovables como el petróleo y sus derivados (Beopoulos et al., 2011).

Por estos motivos, el estudio del metabolismo lipídico en microorganismos, ciencia emergente conocida como lipidómica, ha recibido un gran impulso en los últimos años y los estudios en este tema se han multiplicado.

Una de las aplicaciones de los aceites microbianos consiste en la producción de biodiesel. El biodiesel se compone de ésteres metílicos de ácidos grasos, es biodegradable, no tóxico y libre de sulfuros y compuestos aromáticos. Para cumplir las características estándar establecidas para su uso, la composición del aceite que se utiliza como materia prima tiene que cumplir ciertos requisitos en cuando al porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados, y el

número de carbonos de las cadenas de ácidos grasos que forman los triglicéridos (Ledezma-Amaro et al., 2014b). Los aceites de soja, de colza y de palma son los más utilizados para la producción de biodiesel y cumplen estos requisitos. La composición de ácidos grasos libres de las levaduras tiene una elevada semejanza con la de los aceites vegetales y por este motivo se han propuesto como alternativa a los aceites vegetales para la producción de biodiesel.

A pesar de las innegables ventajas de la producción de lípidos con microorganismos, la rentabilidad solo se consigue si el producto final tiene un elevado valor añadido, como ocurre con producción biotecnológica de vitaminas, como la riboflavina, que es mucho rentable que la producción por ejemplo de bioetanol con *Saccharomyces cerevisiae*. Por este motivo, otro de los objetivos propuesto con respecto a la producción de lípidos con microorganismos, es la modificación del perfil lipídico de los mismos para la síntesis de ácidos grasos con elevado interés comercial, como es el caso de los ácidos grasos omega-6 y omega-3. Los ácidos grasos araquidónico (ARA, C20:4n-6) y docosahexanoico (DHA, C22:6n-3), pertenecientes a los omega-6 y omega-3 respectivamente, se han establecido como suplementos imprescindibles para recién nacidos al ser esenciales para la formación del tejido cerebral y desarrollo de la función neuronal y de la retina y por no estar presentes en otras leches que no sea la materna. El DHA se obtiene de aceite de pescado pero la presencia de metales pesados incluyendo mercurio y otras sustancias tóxicas han suscitado dudas con respecto a su uso como suplemento para bebés. Por este motivo existen procesos biotecnológicos para la obtención de DHA a partir de algas e incluso existen procesos industriales para la producción de ARA utilizando la levadura *Mortierella alpina* (Ratledge, 2004).

Aunque los estudios sobre la producción de lípidos microbianos se iniciaron principalmente en *S. cerevisiae*, como organismo modelo más ampliamente estudiado, posteriormente se han extendido a las denominadas levaduras oleaginosas, que se definen como aquellas capaces de acumular más de un 20 % de lípidos en su biomasa. Estos organismos se caracterizan por no ser patógenos y por acumular triglicéridos con una composición similar a la que se puede encontrar en un aceite vegetal (Beopoulos y Nicaud, 2011). Una de las levaduras oleaginosas más estudiada es *Yarrowia lipolytica*, aunque otras especies tales como *Pichia pastoris* o *Rhodospiridium toruloides* también han suscitado un gran interés.

Además de las aplicaciones biotecnológicas de los lípidos producidos por microorganismos, el estudio del metabolismo lipídico en células eucariotas, especialmente en *S. cerevisiae*, ha servido de base para el estudio de homeostasis de lípidos en mamíferos. La investigación básica de la formación y acumulación de lípidos en *S. cerevisiae* sirve de modelo para el estudio de algunas enfermedades humanas (Koch et al., 2014). El conocimiento de los mecanismos fundamentales de formación y degradación de los lípidos en *S. cerevisiae* puede ayudar a encontrar una solución a enfermedades relacionadas con desórdenes metabólicos y que se han extendido drásticamente en los últimos años como la obesidad, hígado graso, arteroesclerosis y la diabetes tipo 2 (Liu et al., 2013). Incluso se ha establecido una relación entre algunos genes lipídicos y la proliferación de células cancerosas (Natter y Kohlwein, 2013).

1.3 Metabolismo lipídico en microorganismos

La acumulación de lípidos en levaduras y hongos varía en función de la especie estudiada, tanto en el valor total de acumulación como en el perfil de los distintos ácidos grasos acumulados. Estas diferencias tan notables existentes entre unas levaduras y otras han tratado de ser explicadas mediante el estudio del metabolismo lipídico en diferentes microorganismos. Así, mientras *S. cerevisiae* acumula mayoritariamente los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico, *Y. lipolytica*, una de las levaduras oleaginosas más ampliamente estudiadas, además acumula linoleico. Existen otras especies que acumulan ácidos grasos omega 3 y omega 6, como es el caso de *M. alpina*, que acumula C18:3 n-6 y C20:4 n-6 entre otros (Ratledge, 2002).

Los lípidos se acumulan en los microorganismos principalmente en forma ácidos grasos neutros, entre un 80 y 90 %, y el resto en forma de esteroides. Los ácidos grasos acumulados en su forma libre son tóxicos en elevadas cantidades y pueden desestabilizar las membranas celulares por lo que solamente se encuentran en bajas concentraciones en el interior de las células (Koch et al., 2014). La acumulación de lípidos se produce en un compartimento intracelular denominado cuerpo lipídico; que consiste en un núcleo formado por los TG rodeado por una monocapa de fosfolípidos. Aunque durante mucho tiempo se pensó que los cuerpos lipídicos eran simples formas de almacenamiento, hoy día se sabe que participan en procesos celulares y algunas proteínas que participan en el metabolismo lipídico se localizan en los cuerpos lipídicos (Beopoulos et al., 2011).

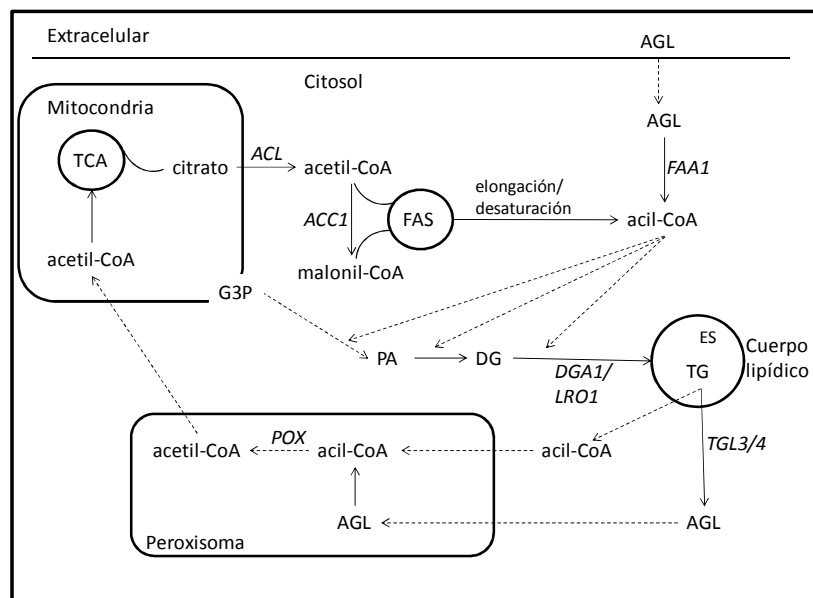


Figura 2. Ruta de biosíntesis de lípidos en microorganismos basada en las descripciones para *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*. TG triglicérido, AGL ácidos grasos libres, ES esteroides, TCA ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, G3P glicerol-3-fosfato, ACL ATP citrato liasa, ACC1 acetil-CoA carboxilasa, FAS sintasa de ácidos grasos, FAA1 acil-CoA sintetasa, DGA1 acil transferasa dependiente de acil-CoA, LRO1 acil transferasa dependiente de fosfolípidos, TGL3/4 lipasa, POX oxidasa del acil-CoA graso

En la célula hay dos tipos de vías metabólicas que conducen a la acumulación de lípidos: la vía 'de novo' y la vía 'ex novo'. La vía 'de novo' empieza a partir de un precursor metabólico, el

acetil-CoA, mientras que en la vía 'ex novo' el precursor son los ácidos grasos exógenos que la célula adquiere del medio de cultivo.

1.3.1 Ruta de síntesis 'de novo' de ácidos grasos

La ruta 'de novo' de síntesis de ácidos grasos comienza con la degradación de carbohidratos que producen el precursor acetil-CoA, y éste, a su vez, el malonil-CoA que es el segundo precursor (Figura 2). El acetil-CoA constituye la base de los ácidos grasos y el malonil-CoA aporta la adición de grupos de dos carbonos a las cadenas que forman finalmente los triglicéridos y esteroides que se acumulan en los cuerpos lipídicos como reserva de energía (Beopoulos et al., 2011).

El acetil-CoA citosólico proviene de la glucólisis de azúcares tanto en los organismos oleaginosos como en los no oleaginosos. En los organismos definidos como oleaginosos, además de producirse el acetil-CoA a través de la glucólisis, existe una enzima capaz de convertir el citrato que proviene del ciclo de Krebs en acetil-CoA. Esta enzima es la ATP citrato liasa (ACL) cuyas dos subunidades están codificadas en organismos oleaginosos como *Y. lipolytica* por los genes *ACL1* y *ACL2*, pero que no existen en *S. cerevisiae* ni en *A. gossypii* (Figura 2; Ratledge, 2002). La presencia de esta enzima es una de las diferencias establecidas entre organismos oleaginosos y no oleaginosos. La conversión de citrato en acetil-CoA en los organismos oleaginosos se ve incrementada cuando existe una limitación de nitrógeno en el medio. Así, la deficiencia de nitrógeno conlleva una disminución del AMP celular, incluido el mitocondrial, lo cual impide que se metabolice el isocitrato y que acaba provocando una acumulación de citrato en la mitocondria. El exceso de citrato mitocondrial es exportado al citosol y convertido en acetil-CoA que es finalmente utilizado como precursor en la síntesis de ácidos grasos (Ratledge, 2004).

El malonil-CoA se forma a partir de acetil-CoA, por la acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa, codificada por el gen *ACC1*. A continuación, la acción del complejo enzimático *FAS*, codificado por los genes *FAS1* y *FAS2*, permite la condensación del acetil-CoA y el malonil-CoA para formar la cadena de carbonos saturada que está constituida por 14 o 16 carbonos dependiendo de la especie (Beopoulos y Nicaud, 2011).

La elongación y desaturación de los ácidos grasos tiene lugar gracias a la acción de varias enzimas en el retículo endoplasmático. Se han identificado varias elongasas, codificadas por los genes *ELO1*, *ELO2*, *ELO3*, entre otras. Estas elongasas llegan a sintetizar ácidos grasos de hasta 26 carbonos, utilizando el malonil-CoA sintetizado por la acetil-CoA carboxilasa para agregar secuencialmente grupos de 2 carbonos a las cadenas sintetizadas por *FAS*. Las desaturasas son proteínas transmembrana hidrofóbicas que se encuentran ancladas al retículo endoplasmático. Las más comunes son la $\Delta 9$ y $\Delta 12$ desaturasa, que introducen un doble enlace en el noveno y duodécimo carbono de las cadenas de los ácidos grasos, respectivamente. En primer lugar actúa la $\Delta 9$ desaturasa, siendo esta clase de enzima la única capaz de insertar un doble enlace en un ácido graso saturado, comúnmente en los ácidos grasos C16:0 y C18:0; y en algunos casos en ácidos grasos de cadena larga como C24:0 y C26:0 (Ratledge, 2004). La $\Delta 12$ desaturasa introduce un segundo doble enlace en el C18:1, produciendo C18:2. En algunos microorganismos existen otras desaturasas: $\Delta 15$ desaturasa que transforma el ácido linoleico en γ -linolénico (C18:3, n-3); la $\Delta 6$ desaturasa que sintetiza γ -linolénico C18:3(n-3) y C18:4(n-3);

y la $\Delta 5$ que sintetiza los ácidos grasos araquidónico (ARA, C20:4(n-6)) y eicosapentanoico (EPA, C20:5(n-3)).

1.3.2 Ruta de síntesis 'ex novo' de ácidos grasos

La acumulación 'ex novo' de ácidos grasos se traduce como la incorporación de ácidos grasos presentes en el medio de cultivo a los cuerpos lipídicos. Estos sustratos pueden ser degradados para la obtención de energía o también modificados por el sistema celular de elongasas y desaturasas (Beopoulos et al., 2011). Las enzimas encargadas del transporte intracelular de los ácidos grasos y su activación para poder ser utilizados por la célula son las acil-CoA sintetetasas, que están codificadas por los genes *FAA1*, *FAA2*, *FAA3*, *FAA4* y *FAT1*, siendo este último identificado y caracterizado como responsable de la activación de los ácidos grasos de cadena larga en *S. cerevisiae* (Black y DiRusso, 2007). Los genes *FAT* se han caracterizado como los transportadores de AGL desde el exterior al interior celular, aunque la función de estos genes en algunos microorganismos no está definida y existen diferencias entre los genes *FAT* de *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* (DiRusso et al., 1999; Dulermo et al., 2014). Por otra parte, se ha descrito en *S. cerevisiae* la acil-CoA sintetasa codificada por el gen *FAA1* como el principal activador de los ácidos grasos libres. El producto de esta reacción es el acil-CoA graso (o ácidos grasos libres activados) que es el intermediario metabólico que posteriormente se convierte en TG (Figura 2; DiRusso et al., 1999). *FAA1* no solo activa los ácidos grasos libres exógenos, sino también los endógenos procedentes de la degradación de fosfolípidos, triglicéridos y esteroides (Koch et al., 2014).

1.3.3 Ruta de biosíntesis de triglicéridos y formación de cuerpos lipídicos

Los ácidos grasos formados tanto a través de la ruta biosintética 'de novo' como 'ex novo' se unen a una molécula de glicerol para formar triglicéridos. Dos moléculas de acil-CoA se unen secuencialmente por transesterificación a una molécula de glicerol-3-fosfato, formando el ácido fosfatídico. Este ácido fosfatídico puede activarse y formar fosfolípidos o defosforilarse a diacilglicerol (Ratledge, 2004; Natter y Kohlwein, 2013). En este último caso, el diacilglicerol puede dar lugar a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina o ser utilizado como sustrato para la síntesis de triglicéridos. La última reacción enzimática para la formación de triglicéridos es la catalizada por diacilglicerol aciltransferasas codificadas por los genes *DGA1* y *LRO1* y en la que los diglicéridos se transforman en TG por la adición de otro grupo acil-CoA al diglicérido (Figura 2; Dorval Courchesne et al., 2009). La aciltransferasa codificada por *DGA1* es dependiente del acil-CoA y utiliza diferentes acil-CoA grasos (oleoil-CoA, palmitoil-CoA, etc) como sustrato uniéndolos a la molécula de diacilglicerol (Koch et al., 2014). Por otra parte, la acil transferasa codificada por *LRO1* usa los fosfolípidos como donadores de acil-CoA. En el caso de *S. cerevisiae*, *DGA1* tiene una gran influencia en la acumulación total de lípidos aunque no es un gen esencial (Sandager et al., 2002). Tanto Dga1p como Lro1p se localizan en el retículo endoplasmático en *S. cerevisiae* y en *Y. lipolytica*, aunque Dga1p también ha sido localizada en los cuerpos lipídicos en *Y. lipolytica* (Athenstaedt y Daum, 2006).

Los cuerpos lipídicos están formados por una monocapa de fosfolípidos que rodea un centro hidrófobo formado por los triglicéridos y los esteroides (Kohlwein et al., 2013). Durante muchos años se creyó que los cuerpos lipídicos eran simples formas de acumulación de lípidos, siendo orgánulos inertes en el interior celular. Sin embargo, ahora se sabe que en los cuerpos

lipídicos se produce la reutilización de los ácidos grasos almacenados y se han localizado proteínas en estos orgánulos que indican su participación en la formación de triglicéridos y en la formación de membranas y la proliferación celular (Ratledge, 2002; Natter y Kohlwein, 2013).

1.3.4 Ruta de degradación de ácidos grasos

Los ácidos grasos almacenados en los cuerpos lipídicos pueden mobilizarse para suplir carencias energéticas en la célula o en el caso de que se necesiten ácidos grasos para la formación de nuevas membranas celulares. En este proceso han sido identificadas, tanto en *S. cerevisiae* y en *Y. lipolytica*, dos lipasas que están codificadas por los genes *TGL3* y *TGL4*. Además, en *S. cerevisiae* existe otro gen, *TGL5*, que es redundante y homólogo a *TGL4* (Figura 2). En este mismo organismo se ha identificado la enzima específica para la movilización de los esteroides que es codificada por *TGL1* (Beopoulos et al., 2011).

Después de que los ácidos grasos sean movilizados de los cuerpos lipídicos, son redirigidos al peroxisoma donde ocurre la degradación a través de la β -oxidación. No se conoce con exactitud cómo se produce este transporte aunque se ha sugerido que *FAA2* o *FAT1* están implicados (DiRusso et al., 1999). Una vez en el peroxisoma la β -oxidación se produce por la acción de las enzimas catalizadas por los genes *POX*, *PEX*, *POT*. Los genes *POX* están presentes tanto en *S. cerevisiae*, *POX1*, como en *Y. lipolytica* donde existen 6 genes *POX* (Beopoulos et al., 2011).

2. *Ashbya gossypii*

2.1 Biología

A. gossypii es un hongo filamentoso, descrito por primera vez en 1926 por Ashby y Nowel como *Nematospora gossypii*, que es un patógeno que en plantas de algodón y algunos cítricos de las zonas subtropicales causa la estigmatomicosis (Ashby, 1926).

Este hongo, taxonómicamente, pertenece al género *Eremothecium* aunque se considera correcta por uso común la denominación de *Ashbya*. Actualmente el género *Ashbya* está incluido en la familia *Saccharomycetaceae* por su proximidad filogenética con *S. cerevisiae*. Fue identificado como un hongo hemiascomiceto superproductor de riboflavina o vitamina B₂, que es el compuesto responsable de su característico color amarillo. La capacidad de producir grandes cantidades de riboflavina motivó inicialmente la investigación sobre este hongo (Park et al., 2007; Wendland y Walther, 2005), aunque actualmente también es utilizado como organismo modelo para el estudio del crecimiento polarizado de las hifas de los hongos miceliales (Wendland y Walther, 2005).

Su ciclo de vida es asexual (se desconoce si posee ciclo de vida sexual) y comienza a partir de una espora con forma aculeiforme, uninucleada y con un genoma haploide. Esta espora germina iniciando una fase de crecimiento isotrópico en la zona central (Figura 3) y durante la germinación, el núcleo se divide varias veces. Este estadio de diferenciación se observa, en condiciones óptimas de crecimiento, a las 8 horas de iniciarse el cultivo, tiempo en el que pueden ocurrir hasta 3 rondas de división nuclear. A continuación, ocurre un crecimiento

polarizado que da lugar a la emergencia de una hifa que se separa de la célula germinal por un septo. El crecimiento polarizado continúa de manera bipolar de forma que en el polo contrario al que surgió la primera hifa, aparece una segunda, ambas se alargan y se ramifican en nuevas hifas laterales dando lugar al denominado micelio juvenil. 20 ó 24 horas después de la germinación, se forma el micelio maduro. Este micelio se caracteriza por crecimiento apical de las hifas en forma de Y. El ciclo celular termina cuando se forman nuevas esporas o se produce la autólisis de algunas hifas, lo que ocurre cuando se agotan los nutrientes. Las hifas se alargan y se forma un septo de manera que constituye el primer paso de formación de un saco esporífero que acaba aislándose de la hifa. El saco esporífero contiene habitualmente 12 esporas aunque este número varía entre 8 y 16.

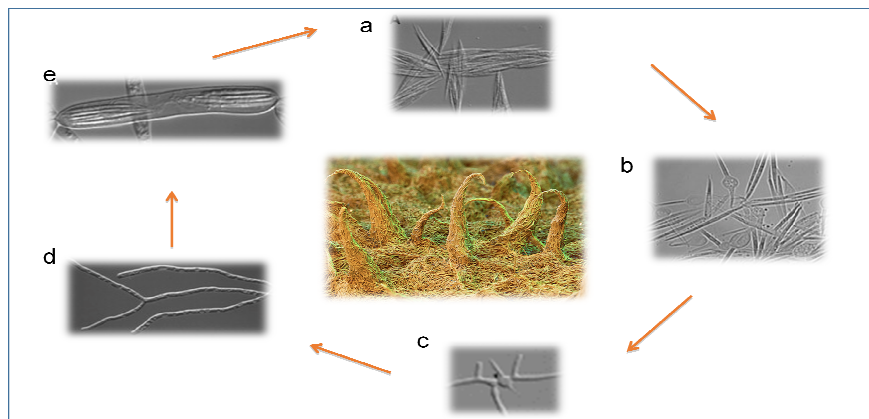


Figura 3. Ciclo de vida de *Ashbya gossypii*. La imagen central corresponde al micelio. Los estados de crecimiento son (a) esporas, (b) crecimiento isotrópico durante la germinación, (c) formación de las hifas y crecimiento polarizado bipolar, (d) micelio maduro y crecimiento apical en forma de Y, (e) esporulación.

A. gossypii se ha convertido en un organismo modelo de estudio en el desarrollo de herramientas genéticas moleculares por su pequeño genoma (9,2 Mb) y porque más de un 95 % de sus genes poseen un ortólogo en el organismo modelo *S. cerevisiae*. El genoma de *A. gossypii* ha sido completamente secuenciado por lo que se ha podido determinar que es el más pequeño identificado en un organismo eucariota, que está distribuido en siete cromosomas y que codifica para 4726 proteínas (Dietrich et al., 2004).

Al contrario que en otros hongos, pero a semejanza de las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, los genes de *A. gossypii* pueden ser fácilmente sustituidos mediante recombinación homóloga (Wendland et al., 2000). La transformación con un plásmido no es eficaz en *A. gossypii*, aunque se ha descrito que plásmidos que contienen el marcador de resistencia a *G418* y el origen de replicación *ARS* de *S. cerevisiae* son capaces de ser estables en *A. gossypii* si se mantiene la presión selectiva. Estos plásmidos no se integran en el genoma de estas secuencias y su eficacia de transformación es menor que cuando se presentan secuencias que permiten la recombinación homóloga (Wright y Philippsen, 1991).

Al utilizar la transformación genética como herramienta en *A. gossypii*, es necesario considerar que las hifas de este organismo son multinucleadas, de manera que los primeros transformantes (transformantes primarios) son heterocigóticos y contienen tanto núcleos transformantes, como de tipo silvestre. Por lo tanto, las esporas generadas a partir de estos transformantes primarios serán mezclas de esporas uninucleadas transformantes y silvestres.

El uso de marcadores de selección dominantes en la transformación permite seleccionar fácilmente las esporas uninucleadas homocigóticas y obtener cepas con el genotipo mutante.

2.2 Interés industrial

El interés suscitado por *A. gossypii* debido a su capacidad de sintetizar riboflavina hizo que fuese el primer microorganismo utilizado en la producción biotecnológica industrial de la riboflavina o vitamina B₂ (Kato y Park, 2012).

La riboflavina es una sustancia amarilla que se usa como suplemento dietético, colorante (E101), aplicaciones farmacéuticas y en su forma menos pura como aditivo en alimentación animal. Se encuentra en alimentos como la leche, huevos y algunos vegetales. Aunque los primeros procesos industriales de producción de riboflavina se realizaban mediante síntesis química, éstos han sido sustituidos en su totalidad por producción microbiológica mediante fermentación. Se estima que la producción global en el año 2015 fue de unas 9000 toneladas (Schwechheimer et al., 2016).

La riboflavina se produce actualmente utilizando *A. gossypii* y la bacteria *Bacillus subtilis*; siendo las empresas BASF y DSM respectivamente las que han desarrollado los procesos biotecnológicos (Stahmann et al., 2000). A finales de la década de los 50, la empresa Merck estableció el primer proceso de producción de riboflavina biotecnológico utilizando *Eremothecium ashbyii*, pero debido a su inestabilidad genética fue sustituido por *A. gossypii* el cual relacionado filogenéticamente con esta especie pero es más estable genéticamente. En 1990, la empresa BASF comenzó la producción a gran escala de la vitamina B₂ utilizando *A. gossypii*. Actualmente la planta de producción se encuentra en Corea y se utiliza aceite vegetal como fuente de carbono para la producción. La cepa empleada produce al menos 20 g/L de riboflavina que precipita en el medio de fermentación en forma de cristales (Schwechheimer et al., 2016). Las cepas industriales productoras de riboflavina son objeto de continuos procesos de mejora tanto por mutagénesis aleatoria (Park et al., 2007) como por mutaciones dirigidas en diferentes genes diana (Jiménez et al., 2005). Las especiales propiedades de *A. gossypii* como organismo para la producción biotecnológica de vitamina a escala industrial ha suscitado el interés de utilizar este hongo filamentoso para la producción de otros productos biotecnológicos como biolípidos (Ledesma-Amaro et al., 2015a) y nucleótidos (Ledesma-Amaro et al., 2015b).

2.3 Producción de lípidos en *A. gossypii*

A. gossypii es un organismo que no se considera oleaginoso (Vorapreeda et al., 2012), puesto que la acumulación intracelular de lípidos en el tipo silvestre es de alrededor del 5 % en medio rico con glucosa como fuente de carbono (Ledesma-Amaro et al., 2014a). Sin embargo, este hongo es capaz de crecer en aceite como única fuente de carbono, llegando a acumular el tipo silvestre un 25 % de ácidos grasos en un medio con 2 % de ácido oleico y 1 % de glucosa (Ledesma-Amaro et al., 2014a). Estos dos fenómenos indican la existencia de un metabolismo lipídico muy activo en este hemiascomiceto. Por este motivo, se ha propuesto la utilización de *A. gossypii* como organismo productor de biolípidos.

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación dirigida al estudio del metabolismo lipídico en *A. gossypii* con la finalidad de aumentar la síntesis de lípidos en este hongo y redirigirla hacia la producción ácidos grasos con interés industrial. Los ácidos grasos que *A. gossypii* sintetiza de forma natural se muestran en la Tabla 1 (Ledesma-Amaro et al., 2014b).

Tabla 1. Ácidos grasos que se sintetizan en *A. gossypii*

ÁCIDO GRASO	NOMENCLATURA	ESTRUCTURA
Ácido tetradecanoico/ mirístico	C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Ácido delta-9-cis-hexadecénico/ palmitoleico	C16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Ácido hexadecanoico palmítico	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Ácido cis-9,cis-12-octadecadienóico/ linoleico	C18:2	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ $\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$
Ácido cis-9-octadecenoico/ oleico	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Ácido octadecanoico/ esteárico	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Ácido cis-11-eicosenoico	C20:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Ácido eicosanoico/ araquídico	C20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Ácido docosanoico/ behénico	C22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Ácido cis-15-tetracosenoico/ nervónico	C24:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$
Ácido tetracosanoico/ lignocérico	C24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Ácido cis-17-hexacosenoico	C26:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$
Ácido hexacosanoico/cerótico	C26:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$

En *A. gossypii* se han estudiado con bastante detalle el catabolismo de ácidos grasos y los sistemas de elongación y desaturación de los mismos que determinan su perfil lipídico. El hecho de que *A. gossypii* no sea un hongo oleaginoso está en concordancia con la ausencia de genes *ACL*, de manera que en este microorganismo una limitación en el nitrógeno en el medio de cultivo no tiene como consecuencia un aumento de la síntesis de lípidos (Ratledge, 2004). Por este motivo, la acumulación de lípidos es estudiada en condiciones de exceso de fuente de carbono en lugar de condiciones de limitación de nitrógeno.

Los genes que codifican las enzimas implicadas en el catabolismo de ácidos grasos en *A. gossypii* son *AgPOX1* (*AER358c*), *AgFOX2* (*AGL060W*) y *AgFOX3* (*AFR302W*). Estos genes, así como el resto de los incluidos en este trabajo, fueron identificados por su homología con los correspondientes en *S. cerevisiae*. La delección del gen *AgPOX1*, implicado en el catabolismo de ácidos grasos, provoca un aumento de la acumulación intracelular de ácidos grasos de 1,7 respecto a la del tipo silvestre. La acumulación en los mutantes *AgPOX1* aumenta a medida que transcurre el tiempo de cultivo mientras que en el tipo silvestre existe un aumento hasta los 3-4 días de cultivo y a partir de ese momento se mantiene constante o, incluso, disminuye

ligeramente. Sin embargo, cuando el medio con glucosa es suplementado con ácido oleico el mutante $\Delta pox1$ es capaz de alcanzar un 70 % (total ácidos grasos con respecto al peso seco) de acumulación de ácidos grasos tras 7 días de cultivo (Ledezma-Amaro et al., 2014a).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la producción de biolípidos con el hongo filamentoso industrial *A. gossypii* mediante la caracterización del metabolismo lipídico en *A. gossypii* y se enmarca en una línea de investigación que se dedica a la ingeniería metabólica de este hongo para la síntesis de compuestos de interés industrial como pueden ser nucleósidos, ácido fólico o riboflavina.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Caracterización de la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en *A. gossypii*, catalizada por las enzimas $\Delta 9$ desaturasa y regulada por el gen *MGA2*. Se propone aumentar la biosíntesis total de ácidos grasos en *A. gossypii* y reorientar esta síntesis hacia ácidos grasos con interés comercial como ácido linoleico y ricinoleico.
- Caracterización de los genes implicados en la movilización de los triglicéridos en *A. gossypii* y bloqueo de esta movilización para incrementar la acumulación de lípidos.
- Caracterización de los genes implicados en la ruta de acumulación 'ex novo' de *A. gossypii* con el fin de determinar si alguno de los genes de esta ruta puede controlar una etapa clave en la inducción de la acumulación de ácidos grasos.
- Estudio de la producción y secreción de ácidos grasos libres en *A. gossypii* mediante la expresión citosólica de dos tioesterasas.
- Caracterización de la regulación de la conversión de acetyl-CoA en malonil-CoA catalizada por la enzima malonil-CoA sintetasa codificada por el gen *ACC1* para intentar favorecer la síntesis 'de novo' de ácidos grasos.
- Combinación de las distintas estrategias de activación de rutas lipídicas y del bloqueo del catabolismo de ácidos grasos para maximizar la síntesis de lípidos en *A. gossypii*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los últimos años, dado el creciente interés en la producción de biolípidos mediante fermentaciones microbianas, las rutas biosintéticas de producción de lípidos han sido caracterizadas total o parcialmente en distintos tipos de organismos incluyendo bacterias, levaduras, plantas y mamíferos.

Nuestro grupo de investigación se ha centrado desde hace unos años en la caracterización de los genes que codifican para las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico del hongo *A. gossypii*, la mayoría de los cuales han sido identificados mediante homología de secuencia con sus ortólogos en *S. cerevisiae*. De esta forma, nuestro grupo ha caracterizado recientemente el sistema de elongación y desaturación en *A. gossypii*, que determina el perfil lipídico (Ledesma-Amaro et al., 2014b). Así mismo, el gen *AgPOX1* (*AER358c*) codifica una de las enzimas peroxisomales implicadas en la degradación de ácidos grasos y mediante el bloqueo del catabolismo de ácidos grasos (*Δpox1*) se han conseguido cepas capaces de acumular enormes cantidades de aceite cuando *A. gossypii* se crece en medio suplementado con ácido oleico. Además se expresaron heterológicamente los genes *ACL1* y *ACL2* de *Y. lipolytica* en la cepa silvestre de *A. gossypii* y en la cepa *Δpox1* con el fin de aumentar el contenido citoplasmático de acetil-CoA y fomentar así su transformación en triglicéridos. Los genes ACL catalizan la conversión de citrato en acetil-CoA y *A. gossypii*, al igual que *S. cerevisiae*, carece de estos genes (Ledesma-Amaro et al., 2014a).

Por tanto, a pesar de que *A. gossypii* no es considerado un microorganismo oleaginoso, tanto su capacidad natural de crecer utilizando aceite como única fuente de carbono como de acumular cantidades notables de TG cuando crece en un medio suplementado con ácido oleico, hace que *A. gossypii* sea un buen candidato para manipular genéticamente e intentar redirigir el flujo de acetil-CoA a TG.

El presente trabajo profundiza en la caracterización de los genes lipídicos de *A. gossypii* y la aplicación directa de la ingeniería genética y metabólica para aumentar la producción de biolípidos.

1. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN *A. gossypii*

1.1 Caracterización de los genes *OLE* implicados en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados

La presencia de ácidos grasos insaturados en las células eucariotas es esencial para su crecimiento (Stukey et al., 1989) y, por tanto, casi todos los organismos poseen enzimas capaces de introducir insaturaciones en los ácidos grasos. En *A. gossypii*, el perfil lipídico viene determinado fundamentalmente por la acción de dos elongasas y dos desaturasas (Figura 4). El complejo *FAS* sintetiza ácidos grasos de 16 o 18 átomos de carbono, C16:0 y C18:0. La elongasa codificada por el gen *AgELO624* (*AFR624W*) añade hasta dos grupos de dos carbonos al ácido esteárico. La segunda elongasa, codificada por el gen *AgELO586* (*AFR586W*) puede sintetizar hasta C20:0 y C22:0 como *AgELO624*, y además es capaz de añadir otros dos grupos de dos carbonos, llegando a sintetizar C24:0 y C26:0 (Ledema-Amaro et al., 2014b). Sin embargo, las formas monoinsaturadas de estos ácidos grasos también están presentes en el perfil lipídico de *A. gossypii*, por lo que debe existir al menos una desaturasa $\Delta 9$ funcional (que cataliza la inserción del primer doble enlace en los ácidos grasos sintetizados por el complejo *FAS*) en este microorganismo. A diferencia de *S. cerevisiae*, que no posee actividad $\Delta 12$ desaturasa capaz de transformar C18:1 en C18:2, *A. gossypii* posee una $\Delta 12$ desaturasa codificada por el gen *AgDES589* (*AFR589C*), que permite en este hongo la síntesis de pequeñas cantidades de ácido linoleico (C18:2).

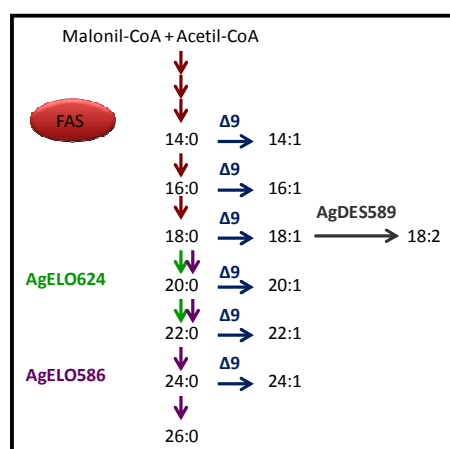


Figura 4. Sistema de elongación y desaturación de ácidos grasos en *A. gossypii*. *FAS*: sintasa de ácidos grasos, *AgELO624*: elongasa, *AgELO586*: elongasa, $\Delta 9$: $\Delta 9$ desaturasa, *AgDES589*: $\Delta 12$ desaturasa.

S. cerevisiae tiene un único gen que codifica para una $\Delta 9$ desaturasa, pero en otros organismos como rata, ratón, *Drosophila* y *Arabidopsis* han sido identificados dos o más genes capaces de desarrollar esta función (Thiede et al., 1986; Wicker-Thomas et al., 1997; Ntambi et al., 1988; Fukuchi-Mizutani et al., 1998). *A. gossypii* posee dos presuntos genes que codifican enzimas con actividad $\Delta 9$ desaturasa, que fueron identificados por su homología con el gen *OLE1* de *S. cerevisiae*. Con el objetivo de determinar si los genes que codifican para las $\Delta 9$ desaturasas son esenciales para el crecimiento de *A. gossypii* y su influencia en el perfil lipídico, así como en la acumulación total de ácidos grasos, se procedió a la caracterización de los genes *AgOLE1* (*AAR153C*) y *AgOLE2* (*AAR078C*).

En primer lugar, la función 'in vivo' de las enzimas que codifican estos genes fue caracterizada a través de su expresión en el organismo modelo *S. cerevisiae*. A continuación, para estudiar las posibles diferencias existentes en la actividad o función entre ambas enzimas, se construyeron cepas de *A. gossypii* en las que se deleccionaron o se sobreexpresaron *AgOLE1* y/o *AgOLE2*, analizándose a continuación su perfil lipídico. Por último, también se estudió la expresión cuantitativa y temporal de ambos genes con el fin de determinar la existencia de patrones de expresión diferenciales.

1.1.1 Caracterización funcional de las dos presuntas $\Delta 9$ desaturasas de *A. gossypii* en *S. cerevisiae*

Para confirmar la función 'in vivo' de las dos supuestas $\Delta 9$ desaturasas, se realizaron experimentos de complementación heteróloga con los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* de *A. gossypii* en la cepa de *S. cerevisiae* Y1306, que tiene deleccionado el gen *ScOLE1* ($\Delta ole1$: *MATa ole1 Δ his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*; Stukey et al., 1989). La cepa haploide Y1306 no puede crecer en un medio de cultivo carente de ácidos grasos insaturados y, por tanto, *ScOLE1* es un gen esencial (Stukey et al., 1989). La cepa $\Delta ole1$ fue transformada con vectores que contienen bien el gen *AgOLE1* (JR3775; $\Delta ole1/AgOLE1$) o el gen *AgOLE2* (JR3783; $\Delta ole1/AgOLE2$). Mientras que las cuatro cepas ensayadas son capaces de crecer en un medio suplementado con ácido oleico (Figura 5, panel derecho), sólo los transformantes $\Delta ole1/AgOLE1$ y $\Delta ole1/AgOLE2$ son capaces de crecer en medio carente de ácido oleico (Figura 5, panel izquierdo).

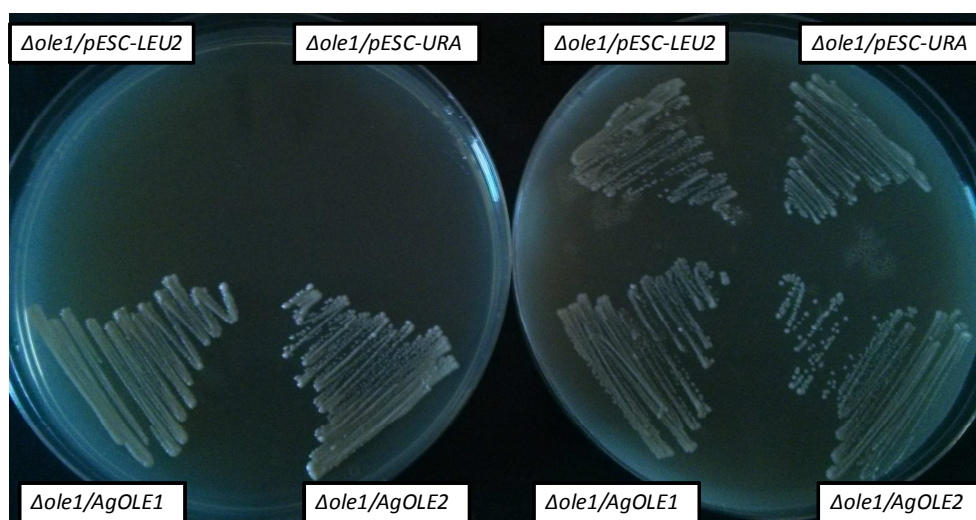


Figura 5. Crecimiento de las cepas $\Delta ole1/pESC-LEU2$, $\Delta ole1/pESC-URA3$, $\Delta ole1/AgOLE1$ y $\Delta ole1/AgOLE2$ de *S. cerevisiae* en SC sin ácido oleico (panel izquierdo) y en medio SC suplementado con 1 % de ácido oleico (panel derecho).

Estos resultados demuestran que tanto el gen *AgOLE1* como el gen *AgOLE2* de *A. gossypii* son capaces de complementar la mutación $\Delta ole1$ de *S. cerevisiae* y sugieren que ambos codifican para enzimas con actividad $\Delta 9$ desaturasa.

Para analizar con mayor detalle la complementación de la mutación $\Delta ole1$ en *S. cerevisiae*, se determinó el crecimiento de estos transformantes en medio líquido SC, carente de ácido oleico. Como se observa en la Figura 6, el transformante que expresa el gen *AgOLE1* muestra una mayor capacidad de crecimiento en medio sin oleico, que el que expresa el gen *AgOLE2*.

Aunque la diferencia en la capacidad de crecimiento entre ambos transformantes pudiera ser debida a una expresión diferencial de los genes, también es posible que ambos genes codifiquen $\Delta 9$ desaturasas con diferentes características cinéticas o especificidad de sustrato.

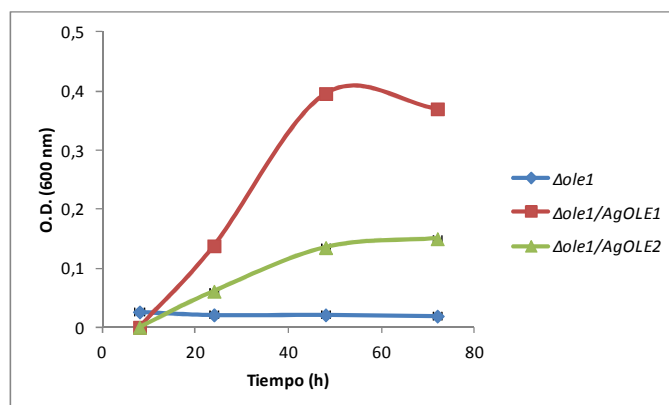


Figura 6. Curva de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* $\Delta ole1$, $\Delta ole1/AgOLE1$ y $\Delta ole1/AgOLE2$ cultivadas en YPD. Los valores se expresan en función de la densidad óptica (O.D.).

El análisis del perfil lipídico por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) de los ácidos grasos de cultivos de las cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* muestra la presencia de C18:1 y C16:1 de igual forma que en la cepa parental diploide y confirma que ambos genes expresan enzimas con actividad $\Delta 9$ desaturasa en la levadura (Figura). Se observa una notable diferencia entre el perfil de la cepa silvestre y las que expresan los genes de *A. gossypii*. Esto puede ser debido a que en *A. gossypii* el ácido graso mayoritario es el ácido oleico, y cabe esperar que las $\Delta 9$ desaturasas muestren mayor especificidad de sustrato por el C18:0 que por el C16:0. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, la proporción de C16:0 y C16:1 con respecto al total de ácidos grasos es mucho mayor que en *Ashbya*, y parece que las desaturasas codificadas por *AgOLE1* y *AgOLE2* no son capaces de incorporar un doble enlace en el ácido palmítico en la misma magnitud que su homólogo en *Saccharomyces*. Además, nuestros resultados confirman que el gen *OLE1* es esencial para el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo sin ácidos grasos insaturados (Stukey et al., 1989).

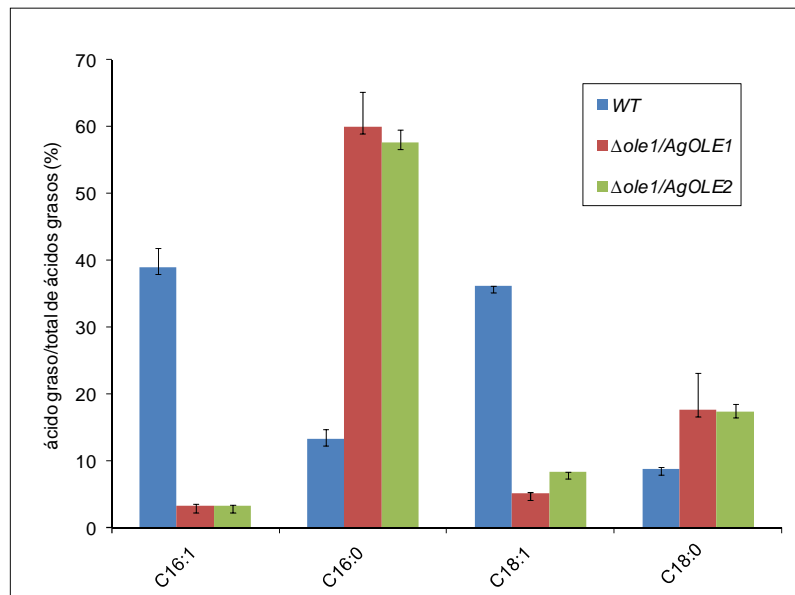


Figura 7. Perfil de ácidos grasos de cepas transformantes de *S. cerevisiae* portadoras de los genes *AgOLE1* ($\Delta ole1/AgOLE1$) o *AgOLE1* ($\Delta ole1/AgOLE2$) cultivadas en medio rico YPD durante 3 días. Los valores de cada especie de ácido graso están expresados como porcentaje con respecto al total de ácidos grasos de cada cepa. Los resultados son la media de dos experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

1.1.2 Delección y sobreexpresión de los genes *OLE* en *A. gossypii*

La presencia en *A. gossypii* de dos genes que codifican enzimas que catalizan la primera reacción de insaturación de C16:0 y C18:0 plantea la posibilidad de que su función sea redundante o de que tengan funciones biológicas especializadas. Para intentar resolver esta cuestión, se construyeron cepas de *A. gossypii* donde los genes *OLE* se deleccionaron o sobreexpresaron de manera independiente o simultáneamente. Para la sobreexpresión, se sustituyó el promotor nativo de cada uno de los genes por el promotor constitutivo del gen que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*GPDp*; Ledesma-Amaro et al., 2014a). Esto permite no solo aumentar la expresión sino evitar posibles mecanismos negativos de regulación a nivel transcripcional. Siguiendo esta estrategia se construyeron las cepas: A407 ($\Delta ole1$), A408 ($\Delta ole2$), A409 (*GPDp-OLE1*), A412 (*GPDp-OLE2*), A476 ($\Delta ole2\Delta ole1$) y A545 (*GPDp-OLE1*, *GPDp-OLE2*).

Mientras que las cepas que sobreexpresan individual o simultáneamente los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* y el deletante $\Delta ole2$ presentan una morfología y tasa de crecimiento similares a las de tipo silvestre A4, el mutante $\Delta ole1$ es incapaz de crecer en un medio de cultivo carente de ácidos grasos insaturados (ácido oleico; Figura 8).

Para encontrar una explicación a por qué *OLE1* es un gen esencial en *A. gossypii*, mientras que *OLE2* no lo es, se determinaron los niveles de expresión de ambos genes, es decir, la abundancia de transcritos de *AgOLE1* y *AgOLE2* en la cepa de tipo silvestre (A4). Como se puede ver en la Figura 9, en la cepa A4 de tipo silvestre, la actividad transcripcional de *AgOLE1* es significativamente mayor que la de *AgOLE2*. Para ambos genes, los niveles de transcripción más altos se dan al principio de la fase estacionaria del cultivo (72h; Figura 9). Estos resultados

sugieren que la síntesis de ácidos grasos insaturados es más activa en la fase estacionaria de crecimiento que en la fase logarítmica.

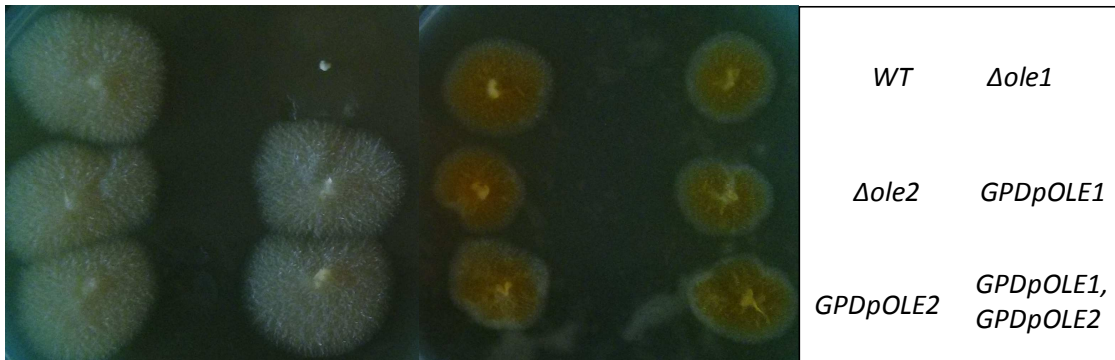


Figura 8. Crecimiento de las cepas mutantes en los genes *OLE* en medio MA2 (panel izquierdo) y MA2 suplementado con un 2 % de ácido oleico (panel derecho).

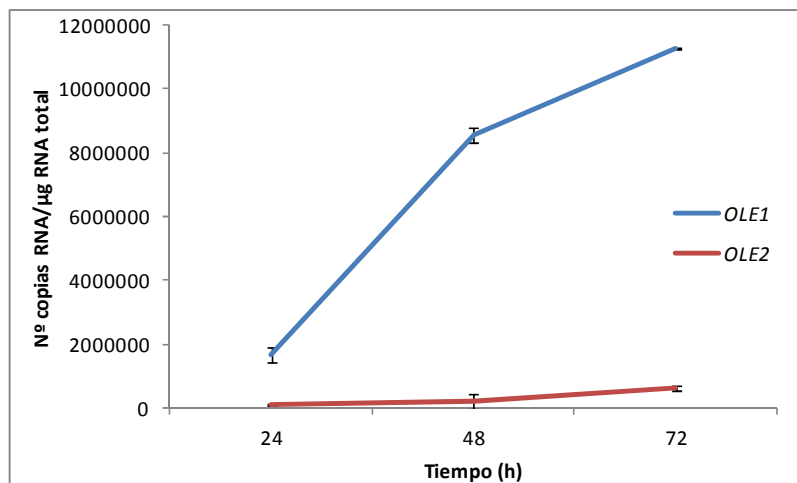


Figura 9. Análisis transcripcional de los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* en el tipo silvestre. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Nuestros resultados sugieren que en *A. gossypii*, el gen *AgOLE1* codifica la principal $\Delta 9$ desaturasa mientras que *AgOLE2* codifica para una actividad $\Delta 9$ desaturasa minoritaria, que no es suficiente para proporcionar la cantidad necesaria de ácidos grasos monoinsaturados para que los mutantes $\Delta ole1$ puedan crecer sin una fuente adicional de ácido oleico. Se puede concluir, por tanto, que en *A. gossypii* únicamente *AgOLE1* es esencial para el crecimiento en ausencia de ácidos grasos insaturados en el medio.

A pesar de que en otros microorganismos se hayan identificado varias enzimas capaces de insertar la primera insaturación en los ácidos grasos saturados (por ejemplo, en *M. alpina* se han identificado tres $\Delta 9$ desaturasas, de las cuales dos son esenciales; Mackenzie et al., 2002; Sakuradani et al., 2010), la presencia de dos $\Delta 9$ desaturasas en *A. gossypii* sugiere la posibilidad de que *AgOLE2* tenga alguna otra función. De hecho, resulta raro encontrar duplicaciones de genes en *A. gossypii* que no aparezcan en *S. cerevisiae*, y este último microorganismo solo posee una $\Delta 9$ desaturasa (Stukey et al., 1989).

1.1.3 Producción de lípidos de las cepas mutantes en los genes *OLE*

A continuación, se analizó el perfil lipídico de las cepas que tienen deletado o sobreexpresan *OLE1* y *OLE2*. Como se observa en la Tabla 2, las cepas que sobreexpresan *AgOLE1* (*GPDp-OLE1* y *GPDp-OLE1, GPDp-OLE2*) acumulan aproximadamente un 20-40 % más de ácidos grasos totales que el tipo silvestre (5 %). Por el contrario, la cepa que sobreexpresa *OLE2* acumula aproximadamente la misma cantidad de ácidos grasos que el tipo silvestre (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de ácidos grasos totales en las cepas de *A. gossypii* modificadas en los genes *OLE* y cultivadas en medio MA2 8G durante 3 días. La cepa $\Delta ole1$ no se analizó debido a su incapacidad de crecer en este medio de cultivo. Los resultados son la media de dos experimentos independientes junto con la desviación estándar.

Cepa	Total ácidos grasos/peso seco (%)
A4 (WT)	5,3 ± 0,4
A408 ($\Delta ole2$)	4,7 ± 0,8
A409 (<i>GPDp-OLE1</i>)	7,4 ± 0,9
A412 (<i>GPDp-OLE2</i>)	5,9 ± 0,5
A545 (<i>GPDp-OLE1, GPDp-OLE2</i>)	6,4 ± 0,2

Así mismo, el perfil lipídico de las cepas modificadas en los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* muestra algunas diferencias con respecto al tipo silvestre (Figura). Atendiendo a la especificidad de estas dos enzimas, ambas muestran preferencia por el ácido esteárico como sustrato sobre el ácido palmítico (siendo el esteárico mucho más abundante en *A. gossypii*). Comparando la actividad de ambas desaturasas, se observó que la enzima codificada por *AgOLE1* muestra mayor especificidad por C16:0 como sustrato que la enzima codificada por *AgOLE2*. La cepa $\Delta ole2$ presenta un mayor porcentaje de C16:1, de manera que cuando la única desaturasa activa en *A. gossypii* es la codificada por *AgOLE1*, el ácido palmítico se convierte en palmitoleico de manera más efectiva que cuando ambas desaturasas están activas. Este resultado sugiere una mayor especificidad de *AgOle1p* en la insaturación del ácido palmítico que *AgOle2p*.

Cuando se sobreexpresan los dos genes (*GPDp-OLE1, GPDp-OLE2*), el porcentaje de ácido oleico disminuye respecto al total de ácidos grasos mientras que aumenta el de ácido linoleico. En esta cepa, los ácidos grasos de cadena larga C24:0 y C26:0, así como sus formas monoinsaturadas, se sintetizan en mayor proporción que en la cepa silvestre. Esto sugiere que existe una relación entre una mayor actividad de ambas desaturasas y una mayor capacidad de síntesis de ácidos grasos de cadena larga; así como también un moderado efecto sobre su grado de insaturación.

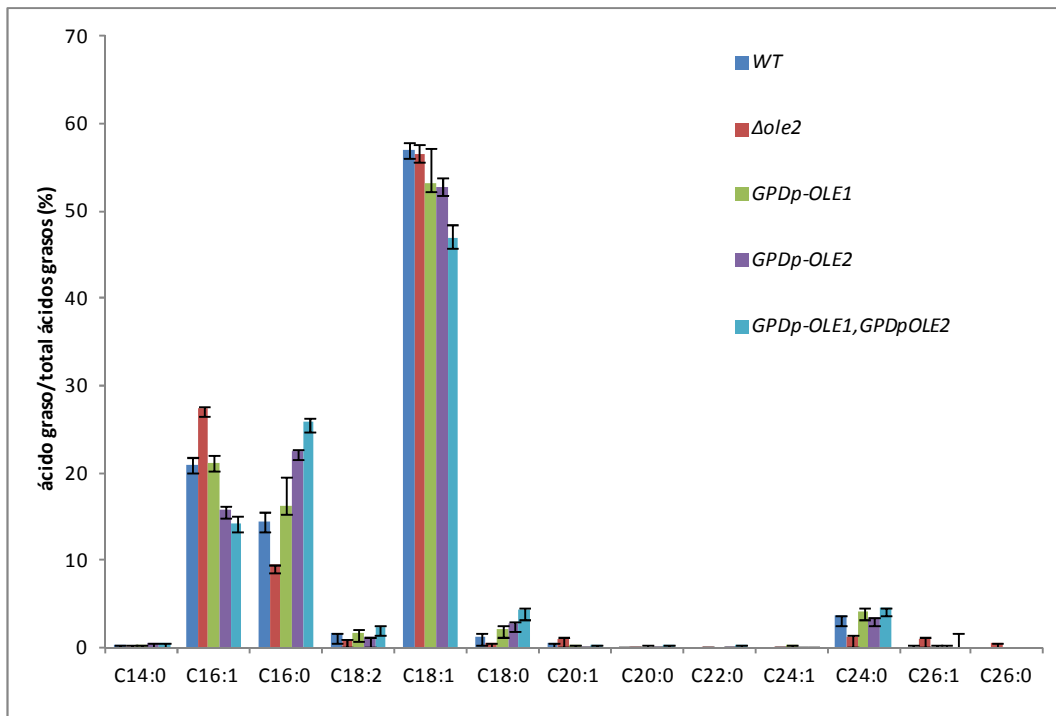


Figura 10. Perfil de ácidos grasos de cepas de *A. gossypii* modificadas en los genes *OLE* y cultivadas en MA2 8G durante 3 días. Los valores de cada especie de ácido graso están expresados como porcentaje con respecto al total de ácidos grasos de cada cepa. La cepa $\Delta ole1$ no se analizó debido a su incapacidad de crecer en este medio de cultivo. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. Los resultados son la media de dos experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de *AgOLE1* no sólo influye en el perfil lipídico, sino que también aumenta el contenido total de ácidos grasos, de acuerdo con anteriores publicaciones (Qiao et al., 2015). Aunque los primeros estudios sobre la insaturación de ácidos grasos en células eucariotas no consideraron este paso como una diana para incrementar la capacidad total de síntesis de ácidos grasos en *S. cerevisiae* (Tehlivets et al., 2007; Beopoulos et al, 2011), trabajos posteriores en *Y. lipolytica* han propuesto que la etapa catalizada por la $\Delta 9$ desaturasa es un punto de control clave en la acumulación de TG, junto con las reacciones controladas por la actividad enzimática de las proteínas codificadas por los genes *ACC1* y *DGA1* (Qiao et al., 2015). De hecho, uno de los valores máximos descritos de acumulación de ácidos grasos en *Y. lipolytica*, en condiciones de fermentación (55 g/l), se ha conseguido en una cepa que combina la sobreexpresión de los genes *YIACC1*, *YIDGA1* y la $\Delta 9$ desaturasa presente en este organismo (Qiao et al., 2015).

Por otro lado, las diferentes especificidades de las desaturasas presentes en *A. gossypii* (tanto *AgOle1p* como *AgOle2p* muestran mayor especificidad por el esteárico que por el palmítico, y *AgOle1p* muestra mayor especificidad por palmítico que *AgOle2p*) puede responder al hecho de que en *A. gossypii* se sintetiza una mayor cantidad de ácido esteárico que de palmítico (Ledesma-Amaro et al., 2014b). Estas diferencias de especificidad también han sido observadas en otros microorganismos. Por ejemplo, de las dos desaturasas identificadas en *Aspergillus nidulans*, *sdeA* muestra mayor especificidad por el ácido esteárico mientras que *sdeB* es más específica para el ácido palmítico (Wilson et al., 2004). En *M. alpina*, donde se han identificado hasta tres $\Delta 9$ desaturasas, dos de ellas muestran mayor especificidad por la insaturación del ácido esteárico que por la del palmítico, y la tercera es incapaz de utilizar el ácido palmítico

como sustrato (Mackenzie et al., 2002). De forma similar, de las tres $\Delta 9$ desaturasas que han sido caracterizadas en *Cunninghamella echinulata*, una muestra mayor preferencia por la transformación de C16:0 a C16:1 que las otras dos (Wan et al., 2013).

Las diferencias observadas en el perfil de ácidos grasos entre el tipo silvestre y la cepa *GPDpOLE1*, *GPDpOLE2*, en lo que concierne al ácido linoleico, se deben probablemente a que el ácido oleico se transforma en linoleico gracias a la presencia de una enzima $\Delta 12$ desaturasa. Por tanto, se puede deducir que la activación de la primera reacción enzimática de introducción de una insaturación en el ácido esteárico por la acción de las $\Delta 9$ desaturasas acelera la síntesis de linoleico.

Sorprendentemente, las diferencias en el perfil de ácidos grasos cuando se sobreexpresan individual y simultáneamente los genes *AgOLE1* y *AgOLE2* no son tan significativas como se esperaba en un principio. Nuestros resultados muestran que se aumenta ligeramente la síntesis de linoleico y de ácidos grasos de cadena larga, pero no se observa un aumento notable del porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados. Esto parece indicar que además de una posible regulación transcripcional (que nosotros hemos eliminado al someter a *AgOLE1* y a *AgOLE2* al control del promotor constitutivo fuerte *GPDp*), existe otro tipo de regulación a nivel post-transcripcional, tal y como se ha descrito en *S. cerevisiae* para el gen *OLE1* (Kandasamy et al. 2004). Cabe también la posibilidad de que exista una regulación de las enzimas *AgOle1p* y *AgOle2p* bien mediante modificaciones post-traduccionales o regulación de la actividad enzimática por algún metabolito y/o proteína reguladora.

1.1.5 Efecto de la sobreexpresión de *AgOLE1* y *AgOLE2* y de la delección de los genes *AgPOX1* y *AgDES589* en la producción de lípidos

El siguiente paso lógico en un proyecto de ingeniería metabólica es la combinación de las modificaciones más favorables encontradas hasta esta punto con otras previamente obtenidas en el laboratorio. De esta forma, se ha estudiado el efecto en la acumulación intracelular de lípidos de la sobreexpresión del gen *AgOLE1* (o bien *AgOLE1*, *AgOLE2*), con los mutantes $\Delta pox1$ y $\Delta des589$.

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que los mutantes $\Delta pox1$, bloqueados en la β -oxidación de ácidos grasos, acumulan grandes cantidades de ácidos grasos (hasta un 70 % con respecto al peso seco; Ledesma-Amaro et al., 2014a). Por ello, con el fin de comprobar si la sobreexpresión *AgOLE1* es capaz de incrementar aún más los niveles de acumulación de $\Delta pox1$ se construyó la cepa *GPDp-OLE1*, $\Delta pox1$ (A622).

A. gossypii sólo posee una $\Delta 12$ desaturasa que está codificada por el gen *AgDES589* de forma que *A. gossypii* no es capaz de sintetizar ácido linoleico cuando se deleciona este gen (Ledesma-Amaro et al., 2014b). Por otra parte, se ha descrito que en *S. cerevisiae* la adición de los ácidos grasos C18:1 y C16:1 al medio de cultivo reprime la expresión del gen *ScOLE1*; curiosamente, la adición exógena de ácido linoleico también reprime la expresión transcripcional de este gen aún cuando esta levadura no es capaz de sintetizar ácido linoleico (McDonough et al., 1992). Este resultado plantea la posibilidad de que la síntesis de ácido linoleico en *A. gossypii* regule negativamente la expresión del gen *AgOLE1* y, en consecuencia, limite la acumulación total de ácidos grasos. Para explorar esta posibilidad se construyó una

cepa portadora de la delección del gen *AgDES589* ($\Delta des589$) y que, por tanto, es incapaz de sintetizar ácido linoleico y se analizó su efecto sobre la acumulación de ácidos grasos totales en los diferentes fondos genéticos que sobreexpresan *OLE1*.

Los resultados del análisis de lípidos acumulados por las distintas cepas ensayadas se realizaron en medio líquido MA2 8G (medio MA2 con 8% de glucosa) durante 3 días (fase exponencial) o 7 días (fase estacionaria) de crecimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Ácidos grasos totales en las cepas de *A. gossypii* cultivadas en MA2 8G durante 3 y 7 días. Los valores se expresan como porcentaje con respecto al peso seco. Los resultados son la media de dos experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Cepa	Total ácidos grasos/peso seco (%), 3 días	Total ácidos grasos/peso seco (%), 7 días
A4 (WT)	5,3 ± 0,4	5,0 ± 0,1
A328 ($\Delta des589$)	6,6 ± 0,1	4,5 ± 1,1
A355 ($\Delta pox1$)	6,4 ± 1,4	7,1 ± 1,1
A409 (<i>GPDp-OLE1</i>)	7,4 ± 0,9	6,2 ± 0,7
A545 (<i>GPDp-OLE1, GPDp-OLE2</i>)	6,4 ± 0,2	4,8 ± 0,2
A559 ($\Delta des589, GPDp-OLE1$)	5,2 ± 0,2	4,8 ± 0,2
A622 ($\Delta pox1, GPDp-OLE1$)	7,0 ± 0,3	6,6 ± 0,3

Paradójicamente, a pesar de que tanto la mutación $\Delta des589$ como la sobreexpresión *GPDp-OLE1* de forma individual aumentan la acumulación de ácidos grasos, cuando las cepas son portadoras de las dos mutaciones ($\Delta des589, GPDp-OLE1$) simultáneamente, se produce una disminución de los ácidos grasos totales, que llegan a ser equivalentes a los niveles del tipo silvestre (Tabla 3).

De forma similar, el perfil de ácidos grasos de la cepa $\Delta des589, GPDp-OLE1$ también es parecido al del tipo silvestre, con la diferencia del ácido linoleico, que no se produce en esta cepa (Figura 11). Estos resultados sugieren que, a diferencia de *S. cerevisiae*, el ácido linoleico C18:2 no ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *AgOLE1*. Por el contrario, parece que la síntesis de ácido linoleico es un requerimiento para que se produzca el efecto positivo que tiene la sobreexpresión de *AgOLE1* sobre la acumulación de ácidos grasos. Aun así, la mayor acumulación (25%) de ácidos grasos que muestra la cepa $\Delta des589$ respecto al tipo silvestre (Tabla 3), sugiere que el sistema de regulación de los ácidos grasos podría ser más complicado y depender del equilibrio existente entre los ácidos grasos con diferentes patrones de insaturación. A este respecto se ha descrito que, en *S. cerevisiae*, el gen *OLE1* está regulado a nivel transcripcional y juega un papel crucial en la estabilidad de su mRNA. De esta forma, aun estando este gen bajo el control de un promotor constitutivo fuerte (nosotros hemos utilizado

el promotor *GPDp*), la síntesis de lípidos puede estar inhibida en este último paso mediante otros procesos regulatorios (Kandamasy et al., 2004). Por tanto, nuestros resultados sugieren que *AgOLE1* no sólo determina el perfil de ácidos grasos en *A. gossypii*, sino que también juega un papel fundamental en la regulación de la síntesis de lípidos.

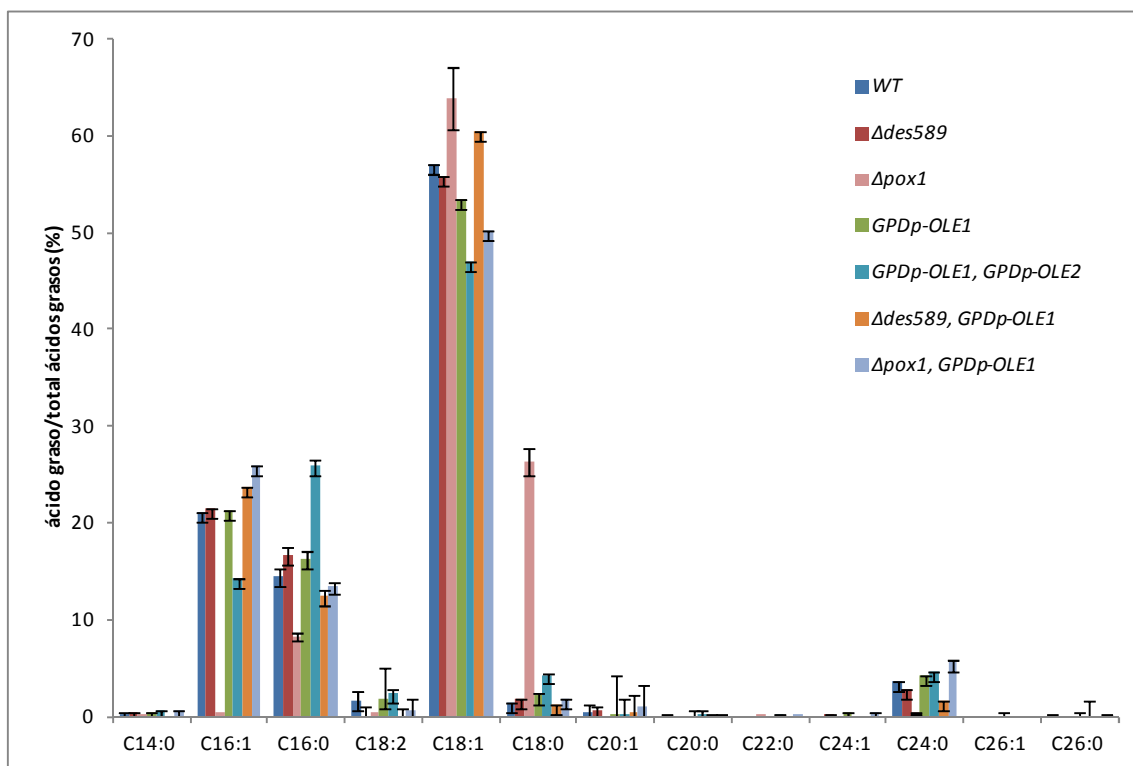


Figura 11. Perfil de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* cultivadas en MA2 8G durante 3 días. Los valores de cada especie de ácido graso están expresados como porcentaje con respecto al total de ácidos grasos. Los resultados son la media de dos experimentos independientes junto a la desviación estándar.

Tampoco la delección $\Delta pox1$ ejerce ningún efecto significativo sobre las cepas que sobreexpresan los genes *OLE*. El contenido total de ácidos grasos es un 30 % mayor en la cepa $\Delta pox1, GPDp-OLE1$ que en el tipo silvestre tanto a 3 como a 7 días de cultivo, pero tras 7 días no supera el contenido de la cepa $\Delta pox1$ (Tabla 3). De hecho, el perfil lipídico de la cepa $\Delta pox1, GPDp-OLE1$ es muy similar al de la cepa *GPDp-OLE1, GPDp-OLE2* (Figura 11). No obstante, la síntesis de ácido linoleico y de ácidos grasos de cadena larga aumenta ligeramente, y el ácido oleico y palmitoleico disminuyen en su abundancia relativa al total de ácidos grasos en la cepa $\Delta pox1, GPDp-OLE1$ con respecto a las cepa tipo silvestre y $\Delta pox1$.

Además, realizamos experimentos donde el medio de cultivo se suplementa con un 2 % de ácido oleico realizados para confirmar si la causa de que no aumenten los niveles de ácidos grasos totales cuando se combinan las mutaciones *OLE* con las *POX* o *DES589* es debida a una represión de los genes lipídogénicos inducida por un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados.

Como se observa en la Tabla 4, en presencia de ácido oleico en el medio, la cepa *GPDp-OLE1, GPDp-OLE2* acumula menos ácidos grasos que la cepa de tipo silvestre. Por el contrario, la cepa $\Delta pox1, GPDp-OLE1$ recupera parcialmente el fenotipo de la cepa $\Delta pox1$, aumentando el

contenido intracelular de lípidos un 5 % respecto al silvestre, pero sin llegar a alcanzar los valores de la cepa $\Delta pox1$ (Tabla 4).

Tabla 4. Total de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* cultivadas en MA2 1G2O durante 3 días. Los valores se expresan en porcentaje con respecto al peso seco. Los resultados son la media de dos experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Cepa	Total ácidos grasos/peso seco (%)
A4 (WT)	20,1 ± 1,5
A328 ($\Delta des589$)	19,1 ± 1,4
A355 ($\Delta pox1$)	28,1 ± 0,4
A545 (<i>GPDp-OLE1</i> , <i>GPDp-OLE2</i>)	15,2 ± 0,2
A559 ($\Delta des589$, <i>GPDp-OLE1</i>)	19,5 ± 1,7
A622 ($\Delta pox1$, <i>GPDp-OLE1</i>)	24,5 ± 1,2

Estos resultados ponen de manifiesto la estricta regulación existente en *A. gossypii* con respecto a la homeostasis de lípidos, puesto que aún cuando las modificaciones individuales aumentan hasta un 40 % la acumulación de lípidos con respecto al silvestre, la combinación de ambas no tienen efectos aditivos. Esto se debe muy probablemente a una regulación por retroalimentación negativa de enzimas clave como *Acc1p* y *Dga1p*, bien sea por fosforilación como se ha descrito recientemente para *Acc1p* (Hofbaouer et al., 2014) o por otros mecanismos. Esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos al cultivar las cepas en medio suplementado con ácido oleico: la acumulación de lípidos en la cepa *GPDp-OLE1*, *GPDp-OLE2* disminuye un 5 % con respecto al tipo silvestre. Esta disminución está inducida probablemente tanto por la activación de la degradación de ácidos grasos como por la represión de los genes implicados en la síntesis y acumulación de lípidos. Así mismo, tras bloquear la β -oxidación de ácidos grasos (en la cepa $\Delta pox1$, *GPDp-OLE1*), el contenido total de lípidos aumenta y alcanza los valores del tipo silvestre, pero no los de la cepa $\Delta pox1$, sugiriendo que cuando *AgOLE1* y *AgOLE2* están sobreexpresados y existe ácido oleico en el medio, se activa la degradación de ácidos grasos. Podemos por tanto deducir que en presencia de ácidos grasos monoinsaturados en el medio los genes lipídogénicos están reprimidos cuando se sobreexpresa *AgOLE1*.

Como resumen de este apartado, se puede concluir a partir de estos resultados que los ácidos grasos insaturados (en su forma activada) son los principales responsables de la regulación de los genes implicados en la síntesis de lípidos. A una conclusión similar se ha llegado en *Y. lipolytica*, donde se ha propuesto que el palmitoil-CoA y el estearoil-CoA inhiben el gen *ACC1* (Qiao et al., 2015). En *A. gossypii*, cuando el ácido oleico está presente en grandes cantidades intracelulares y las dos $\Delta 9$ desaturasas están expresadas de forma constitutiva y fuerte, la homeostasis de lípidos se mantiene activando la degradación de ácidos grasos. Cuando esta degradación está bloqueada, el fenotipo silvestre se recupera. Además, la inserción del primer doble enlace en los ácidos grasos esteárico y palmítico es un paso limitante en la ruta biosintética de lípidos en *A. gossypii*. Los ácidos grasos monoinsaturados ejercen una

retroalimentación negativa en la biosíntesis de lípidos, tanto cuando se incorporan de manera exógena a la célula como cuando se sintetizan '*de novo*'.

Siguiendo nuestro objetivo de maximizar la biosíntesis de lípidos en *A. gossypii*, nuestro siguiente paso fue la identificación y caracterización del gen *AgMGA2*, que se ha descrito previamente como el principal responsable de la regulación del gen *OLE1* en *S. cerevisiae* (Zhang et al., 1999).

1.3 Producción de ácido linoleico y ricinoleico en *A. gossypii* mediante la expresión de una desaturasa/hidroxilasa de *C. purpurea* (*CpFAH12*)

El ácido linoleico (ácido (cis 9, cis 12)-octadec-9,12-dienoico, C18:2) es uno de los denominados ácidos grasos omega-6 y es esencial en la dieta humana. Se encuentra habitualmente en aceites vegetales, huevos y carne de pollo. Además de su importancia en la industria alimentaria, se usa también en cosméticos. El ácido ricinoleico (ácido (R)-12-hidroxi-octadec-cis-9-enoico, C18:1-OH) es un ácido graso con un grupo hidroxilo en el carbono 12 y con muchas aplicaciones en la industria química. Tanto este ácido graso como sus derivados se usan en la industria alimentaria (aditivo), textil (surfactantes, pigmentos), papelera, plástica (plastificante, películas), cosmética (desodorante, emulsificante), electrónica, farmacéutica, etc. Además, recientemente se ha probado como sustitutivo de los componentes sulfurosos en su función de aditivos lubricantes en el diesel y el biodiesel (Beopoulos et al., 2013).

El ácido ricinoleico se extrae habitualmente del aceite de ricino, que proviene de las semillas de la planta *Ricinus communis*, donde se acumula en forma de TG, alcanzando el 90 % con respecto al total de ácidos grasos. Sin embargo, el ricino, una potente toxina que se acumula en altas cantidades en estas semillas, hace que no sea una planta con la que se pueda trabajar por los riesgos que conlleva para la salud humana. Fue en esta planta donde se identificó la hidroxilasa que añade el grupo hidroxilo al ácido oleico, por su homología con las desaturasas de ácidos grasos. Esta hidroxilasa se denominó *RcFAH12* (Van de Loo et al., 1995). La producción de ácido ricinoleico se ha intentado en *Arabidopsis thaliana*, y en los organismos modelo *S. cerevisiae* y *S. pombe*. El hecho de que estas especies no sean consideradas oleaginosas, ha reducido notablemente la producción total conseguida. Por este motivo, especies como *Y. lipolytica* se han propuesto como viables para la producción de ácido ricinoleico. En *S. cerevisiae*, la expresión de *RcFAH12* consiguió una acumulación de ácido ricinoleico del 10 % con respecto al total de ácidos grasos (Mavraganis et al., 2010). En *S. pombe*, la expresión de la hidroxilasa de *R. communis* junto a la delección de determinadas lipasas intracelulares, consiguió una acumulación del 53 % de ácido ricinoleico con respecto al total de ácidos grasos (Holic et al., 2012).

Aparte de la producción de ácido ricinoleico a partir de semillas de ricino, *Claviceps purpurea* es un hongo patógeno que causa cornezuelo en cultivos de cereales, y ha sido objeto de interés científico porque es capaz de acumular hasta un 50 % de ácido ricinoleico con respecto al total de ácidos grasos. La hidroxilación del ácido oleico se cataliza por la acción de la enzima codificada por el gen *CpFAH12*, la cual introduce un grupo hidroxilo en el carbono 12 del ácido oleico (Mavraganis et al., 2010; Meesapyodsuk y Qiu, 2008). Esta hidroxilasa tiene una doble función, ya que además de introducir el grupo hidroxilo, puede introducir un doble enlace en el mismo carbono, convirtiendo el ácido oleico en linoleico. Esta enzima se ha utilizado previamente en *Y. lipolytica* para sintetizar ácido ricinoleico (Beopoulos et al., 2014).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, *A. gossypii* acumula grandes cantidades de ácidos grasos, mayoritariamente (más del 60 %) C18:1, que puede transformarse en C18:2 por mediación de la $\Delta 12$ desaturasa codificada por el gen *AgDES589* (Ledesma-Amaro et al., 2014b). De hecho, la síntesis de ácido linoleico aumenta cuando se sobreexpresan los dos $\Delta 9$

desaturasas codificadas por los genes *AgOLE1* y *AgOLE2*, puesto que se estimula la conversión de C18:0 a C18:1 y en consecuencia la conversión de C18:1 a C18:2 (como se ha descrito en los apartados anteriores). No obstante, no se ha identificado en *A. gossypii* una hidroxilasa que introduzca de forma eficaz un grupo hidroxilo en el ácido linoleico para convertirlo en ácido ricinoleico. Con el objetivo de aumentar la producción de linoleico y sintetizar ácido ricinoleico en *A. gossypii*, se estudió el efecto de la expresión heteróloga del gen *CpFAH12*, que codifica para una hidroxilasa/desaturasa en *C. purpurea* (Mavraganis et al., 2010 Meesapyodsuk y Qiu, 2008).

1.3.1 Expresión heteróloga de *CpFAH12* en el tipo silvestre de *A. gossypii*

Para la expresión heteróloga de *CpFAH12* se utilizaron dos estrategias. Por un lado, se sometió al gen bajo el control del promotor fuerte y constitutivo *GPDp* descrito en los apartados anteriores (cepa A537; *GPDp-CpFAH12*). Alternativamente, también se utilizó el promotor inducible por acetato *ICLp* (Umemura et al., 1995), para prevenir la toxicidad potencial de la síntesis de grandes cantidades de ácido ricinoleico (cepa A538: *ICLp-CpFAH12*). Para la inducción con acetato las células fueron crecidas en primer lugar en MA2 8G, para después ser transferidas a un medio con la misma composición que el MA2 pero con un 2 % de acetato sódico, en lugar de glucosa.

Tras analizar ambas cepas, se observó un ligero aumento del contenido total de ácidos grasos con respecto al tipo silvestre A4, pero no se detectaron cantidades significativas de ácido ricinoleico (Tabla 7). Sin embargo, la cepa *GPDp-CpFAH12* sintetiza un 40 % más de C18:2 que el tipo silvestre (Figura 12).

Tabla 7. Total de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* modificadas con la expresión del gen *CpFAH12* y cultivadas en MA2 8G durante 3 días y en MA2 con acetato. Los valores se expresan como porcentaje con respecto al peso seco y como porcentaje de ácido ricinoleico y linoleico con respecto al total de ácidos grasos. Los resultados son la media de dos experimentos independientes junto con la desviación estándar.

Cepa	Total de ácidos grasos/peso seco (%)	Ácido ricinoleico/total de ácidos grasos (%)	Ácido linoleico/total de ácidos grasos (%)
A4 (WT)	4,9 ± 0,1	0	1,6 ± 0,5
A537 (<i>GPDp-CpFAH12</i>)	5,4 ± 0,2	0	2,3 ± 0,1
A538 (<i>ICLp-CpFAH12</i>)	5,8 ± 0,1	0	1,5 ± 0,4

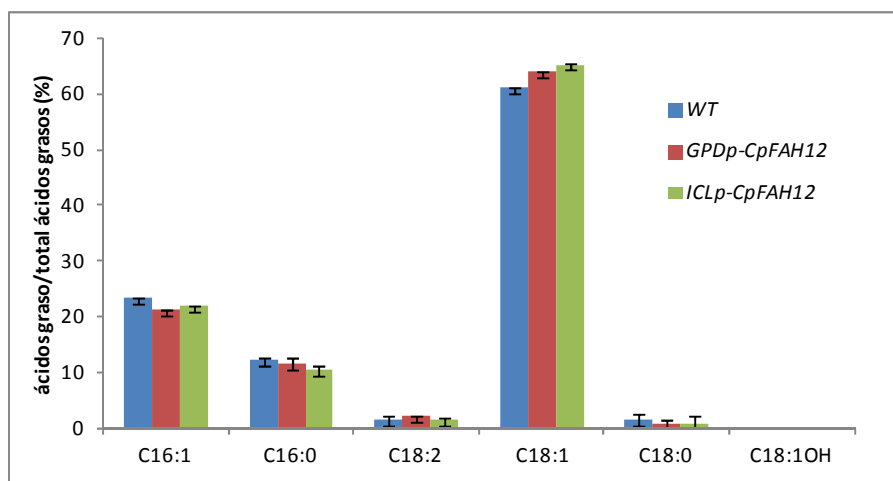


Figura 12. Total de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* modificadas con la expresión del gen *CpFAH12* y cultivadas en MA2 8G durante 3 días y en MA2 con acetato. Los valores de cada especie de ácido grasos están expresados como porcentaje con respecto al peso seco. Los resultados son la media de dos experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Estos resultados demuestran, por tanto, que la expresión heteróloga del gen *CpFAH12* no es suficiente para producir ácido ricinoleico en *A. gossypii*, en contra de lo descrito para *S. pombe* (Holic et al., 2012). Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con otros descritos en *Y. lipolytica*, donde fueron necesarias modificaciones genéticas adicionales para producir este ácido graso (Beopoulos et al., 2014). Animados por estos resultados, nuestro siguiente paso consistió en la expresión de *CpFAH12* en diferentes fondos genéticos de *A. gossypii*.

1.3.2 Expresión heteróloga de *CpFAH12* en diferentes fondos genéticos en *A. gossypii*

Para incrementar la síntesis de ácido linoleico y producir ricinoleico, se expresó el gen *CpFAH12* en tres fondos genéticos diferentes:

- i) ***Δpox1*** (cepa A549: *Δpox1*, *GPDp-CpFAH12*), en la que se expresa *CpFAH12* bajo la influencia del promotor *GPDp* en la cepa *Δpox1*, que presenta un aumento de la acumulación total de ácidos grasos. Al mejorar la biosíntesis de lípidos se esperaba detectar el ácido ricinoleico e incrementar el porcentaje de ácido linoleico.
- ii) ***GPDp-OLE1*, *GPDp-OLE2*** (cepa A586: *GPDp-OLE1*, *GPDp-OLE2*, *ICLp-CpFAH12*), que contiene la sobreexpresión simultánea de las dos $\Delta 9$ desaturasas de *A. gossypii* y en la que se expresa *CpFAH12* bajo el promotor *ICLp*.
- iii) ***Δdga1*** (cepa A588: *Δdga1*, *ICLp-CpFAH12*), que tiene el gen *AgDGA1* deletado y en la que se expresa *CpFAH12* bajo el promotor *ICLp*. Existen dos enzimas en *A. gossypii* que catalizan la última reacción de formación de TG, en la que los diacilgliceroles se convierten en TG. Estas enzimas están codificadas por los genes *AgDGA1* (*ACR140C*) y *AgLRO1* (*AFL179C*) que codifican una diacilglicerol transferasa dependiente de acil-CoA y una diacilglicerol transferasa dependiente de fosfolípidos respectivamente. La enzima codificada por *LRO1* ha sido identificada como la responsable de la acumulación de ácidos grasos con un grupo hidroxilo, como es el caso del ricinoleico (Dahlqvist et al., 2000; Beopoulos et al., 2014). Por este motivo, se construyó la cepa con *AgDGA1* inactivado con el fin de que todos los TG se sinteticen por medio de *AgLRO1* y se favorezca la acumulación del ácido ricinoleico en *A. gossypii*.

El análisis del contenido en ácidos grasos en estas cepas reveló que el ácido ricinoleico sólo se sintetiza en cantidades detectables en la cepa *Δpox1*, *GPDp-CpFAH12* (Tabla 8 y Figura 13). En esta cepa se acumula un 6,8 % de ácidos grasos con respecto al peso seco, al igual que en la cepa parental *Δpox1* donde esta cifra es de 6,5 % tras 3 días de incubación (un 32 % más que en el tipo silvestre). En los otros dos fondos genéticos propuestos, no se detectó ácido ricinoleico, pero sí un aumento significativo del contenido de ácido linoleico.

De manera interesante, en la cepa *GPDp-OLE1*, *GPDp-OLE2*, *ICLp-CpFAH12*, el ácido linoleico representaba un 20 % del total de ácidos grasos, un valor significativamente mayor que el 0,8 % observado en la cepa de tipo silvestre (Tabla 8).

Tabla 8. Total de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* modificadas con la expresión del gen *CpFAH12* y cultivadas en MA2 8G durante 3 días y en MA2 con acetato. Los valores se expresan como porcentaje con respecto al peso seco y como porcentaje de ácido ricinoleico y linoleico con respecto al total de ácidos grasos. Los resultados son la media de dos experimentos independientes junto con la desviación estándar.

Cepa	Total de ácidos grasos/peso seco (%)	Ácido ricinoleico/total de ácidos grasos (%)	Ácido linoleico/total de ácidos grasos (%)
A4 (WT)	4,9 ± 0,1	0	0,8 ± 0,0
A355 (<i>Δpox1</i>)	6,5 ± 0,2	0	0,5 ± 0,1
A570 (<i>GPDp-OLE1</i> , <i>GPDp-OLE2</i>)	6,4 ± 0,2	0	2,6 ± 0,0
A534 (<i>Δdga1</i>)	3,5 ± 0,1	0	1,6 ± 0,1
A549 (<i>Δpox1</i> , <i>GPDp-CpFAH12</i>)	6,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,0
A586 (<i>GPDp-OLE1</i> , <i>GPDp-OLE2</i> , <i>ICLp-CpFAH12</i>)	5,9 ± 0,6	0	20,0 ± 1,1
A588 (<i>Δdga1</i> , <i>ICLp-CpFAH12</i>)	4,6 ± 0,2	0	11,6 ± 3,2

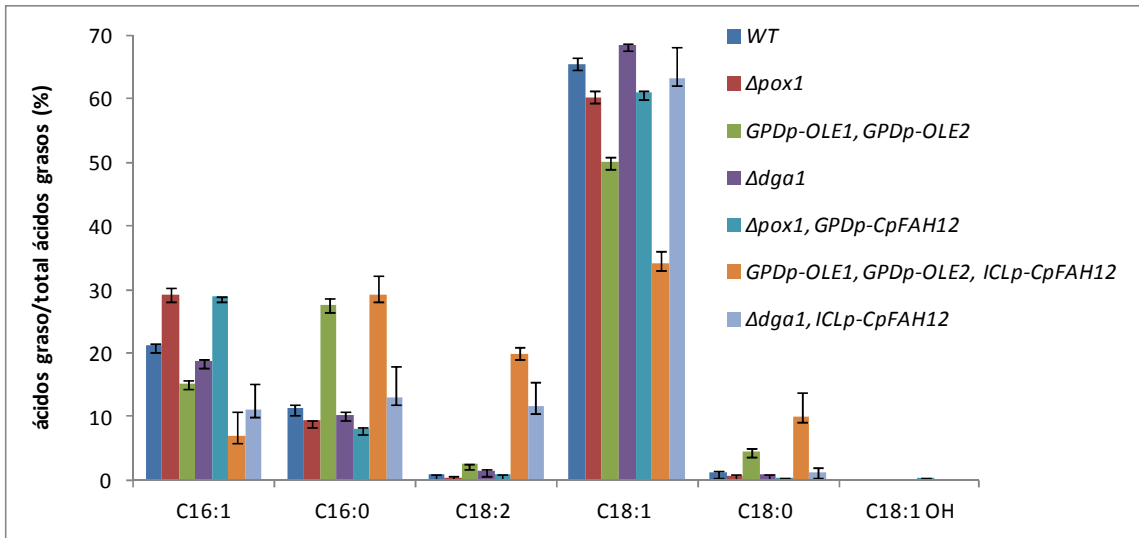


Figura 13. Total de ácidos grasos en las cepas de *A. gossypii* modificadas con la expresión del gen *CpFAH12* y cultivadas en MA2 8G durante 3 días y en MA2 con acetato. Los valores de cada especie de ácido grasos están expresados como porcentaje con respecto al peso seco. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. Los errores representan la desviación estándar.

Estos resultados demuestran que el ácido ricinoleico puede sintetizarse en *A. gossypii*, aunque las cantidades totales no son suficientes para un posible aprovechamiento industrial y serían necesarias mejoras en las cepas para llegar a un proceso económicamente viable. No obstante, los resultados obtenidos con respecto al incremento de la síntesis de ácido linoleico son muy prometedores. En especial, la cepa *GPDp-OLE1, GPDp-OLE2, ICLp-CpFAH12* acumula hasta un 20 % de este ácido graso, y un 20 % más de ácidos grasos totales que el tipo silvestre sugiriendo (de nuevo) que la introducción de la primera insaturación de ácidos grasos es un paso limitante en la síntesis de lípidos (Qiao et al., 2015). El aumento de ácido linoleico en esta cepa la convierten en un candidato ideal como punto de partida para la producción de los ácidos grasos omega-6 y omega-3, mediante la expresión de elongasas y desaturasas heterólogas que producen EPA y DHA en este fondo genético (Xue et al., 2013; Ledesma-Amaro, 2014c).

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, T., Sakuradani, E., Asano, T., Kanamaru, H., Shimizu, S., 2006. Functional characterization of $\Delta 9$ and $\omega 9$ desaturase genes in *Mortierella alpina* 1S-4 and its derivative mutants, *Appl Microbiol Biotechnol.* 79, 711-719.
- Aguiar, T.Q., Dinis, C., Domingues, L., 2014. Cre-loxP-based system for removal and reuse of selection markers in *Ashbya gossypii* targeted engineering, *Fungal Genet Biol.*
- Anamart, S., Tomita, T., Fukui, F., Fujimori, K., Harashima, S., Yamada, Y., Oshima, Y., 1997. The P-OLE1 gene of *Pichia angusta* encodes a D9-fatty acid desaturase and complements the ole1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* 184, 299.
- Arshad, M., Ahmed, S., Zia, M.A., Rajoka, M.I., 2014. Kinetics and Thermodynamics of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* MLD10 Using Molasses, *Appl Biochem Biotechnol.* 172, 2455-2464.
- Ashby, S.F., Nowell, W., 1926. The fungi of stigmatomycosis, *Ann Bot.*
- Athenstaedt, K., 2011. YALI0E32769g (DGA1) and YALI0E16797g (LRO1) encode major triacylglycerol synthases of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochim Biophys Acta.* 1811, 587-596.
- Athenstaedt, K., Daum, G., 2005. Tgl4p and Tgl5p, Two Triacylglycerol Lipases of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Are Localized to Lipid Particles, *J Biol Chem.* 280, 37301-37309.
- Auld, K.L., Brown, C.R., Casolari, J.M., Komili, S., Silver, P.A., 2006. Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates., *Mol Cell.* 21, 861-871.
- Bao, Z., Xiao, H., Liang, J., Zhang, L., Xiong, X., Sun, X., Si, T., Zhao, H., 2014. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*, *ACS Synth Biol.*
- Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T., Nicaud, J.M., 2008. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl Environ Microbiol.* 74, 7779-7789.
- Beopoulos, A., Verbeke, J., Bordes, F., Guicherd, M., Bressy, M., Marty, A., Nicaud, J.M., 2014. Metabolic engineering for ricinoleic acid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 98, 251-262.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, *Appl Microbiol Biotechnol.* 90, 1193-1206.
- Black, P.N., DiRusso, C.C., 2007. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation, *Biochim Biophys Acta.* 1771, 286-298.
- Blazeck, J., Hill, A., Liu, L., Knight, R., Miller, J., Pan, A., Otoupal, P., Alper, H.S., 2014. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production, *Nat Commun.* 5, 1-10.

Blazeck, J., Liu, L., Knight, R., Alper, H.S., 2013. Heterologous production of pentane in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *J Biotechnol.* 165, 184-194.

Bortz, W.M., Lynen, F., 1963. The inhibition of acetyl CoA carboxylase by long chain acyl CoA derivatives, *Biochem Z.* 337, 505-509.

Broadwater, J.A., Whittle, E., Shanklin, J., 2002. Desaturation and hydroxylation: Residues 148 and 324 of Arabidopsis FAD2, in addition to substrate chain length, exert a major influence in partitioning of catalytic specificity, *J Biol Chem.* 18, 15613-15620.

Cao, Y., Liu, W., Xiu, X., Zhang, H., Wang, J., Xian, M., 2014. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*, *Biotechnol Biofuels.* 7, 1-11.

Celinska, E., Grajek, W., 2013. A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*, *Microb Cell Fact.* 12, 1-16.

Certik M., Sakuradani E., Shimizu S., 1998. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids, *Trends Biotechnol.* 16, 500.

Chellappa, R., Kandasamy, P., Oh, C.S., Jiang, Y., Vemula, M., Martin, C.E., 2001. The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene expression. Fatty acid-mediated regulation of Mga2p activity is independent of its proteolytic processing into a soluble transcription activator., *J Biol Chem.* 276, 43548-43556.

Chen, L., Zhang, J., Lee, J., Chen, W.N., 2014. Enhancement of free fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by control of fatty acyl-CoA metabolism, *Appl Microbiol Biotechnol.* 98, 6739-6750.

Chen, X., Xu, G., Xu, N., Zou, W., Zhu, P., Liu, L., Chen, J., 2013. Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production, *Metab Eng.* 19, 10-16.

Chen, Y., Zhang, Y., Siewers, V., Nielsen, J., 2015. Ach1 is involved in shuttling mitochondrial acetyl units for cytosolic C2 provision in *Saccharomyces cerevisiae* lacking pyruvate decarboxylase, *FEMS Yeast Res.* 15,.

Choi, J., Stuckey, J.E., Huang, S., Martin, C.E., 1996. Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* ole1 gene, *J Biol Chem.* 271, 3581-3589.

Cook H.W., M.C.R., 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes, Anonymous .

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., Stymne, S., 2000. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants, *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 6487-6492.

- de Kroon, A., Rijken, P.J., De Smet, C.H., 2013. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective, *Prog Lipid Res.* 52, 374-394.
- DiCarlo, J.E., Norville, J., Mali, P., Rios, X., Aach, J., Church, G.M., 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.* 41, 4336-4343.
- Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavier, A., Gaffney, T.D., Philippsen, P., 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome., *Science.* 9, 304-307.
- DiRusso, C.C., Connell, E.J., Færgeman, N.J., Knudsen, J., Hansen, J.K., Black, P.N., 2000. Murine FATP alleviates growth and biochemical deficiencies of yeast fat1D strains , *Eur J Biochem.* 267, 4422-4433.
- Dorval Courchesne N. M., Parisien A., Wang B., Lan C.Q., 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic an transcription factor engineering approaches. , *J Biotechnol.* 141, 31.
- Dulermo, R., Gamboa-Méndez, H., Dulermo, T., Thevenieau, F., Nicaud, J.M., 2014. The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Yeast Res.* 14, 883-896.
- Dulermo, R., Gamboa-Méndez, H., Ledesma-Amaro, R., Thevenieau, F., Nicaud, J.M., 2015. Unraveling fatty acid transport and activation mechanisms in *Yarrowia lipolytica*, *Biochim Biophys Acta.* 1851, 1202-1217.
- Dulermo, T., Nicaud, J.M., 2011. Involvement of G3P shuttle and β -oxidation pathway in the control of TAG synthesis and lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*, *Metab Eng.* 13, 482-491.
- Dulermo, T., Tréton, B., Beopoulos, A., Gnankon, A.P.K., Haddouche, R., Nicaud, J.M., 2013. Characterization of the two intracellular lipases of *Y. lipolytica* encoded by TGL3 and TGL4 genes: New insights into the role of intracellular lipases and lipid body organisation, *Biochim Biophys Acta.* 1831, 1486-1495.
- Enger, C., Kandzia, R., Marillonet, S., 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability, *PLoS One.* 3,.
- Færgeman, N.J., Black, P.N., Zhao, X., Knudsen, J., DiRusso, C.C., 2001. The acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *S. cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization, *J Biol Chem.* 276, 37051-37059.
- Færgeman, N.J., DiRusso, C.C., Elbergeri, A., Knudsen, J., Black, P.N., 1997. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* homologue to the murine fatty acid transport protein impairs uptake and growth on long-chain fatty acids, *J Biol Chem.* 272, 8531-8538.
- Færgeman, N.J., Knudsen, J., 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling, *Biochem J.* 323, 1-12.

- Fillet, S., Gibert, J., Suárez, B., Lara, A., Ronchel, C., Adrio, J.L., 2015. Very high fatty alcohols production by oleaginous yeast, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 42, 1463-1472.
- Friedlander, J., Tsakraklides, V., Kamineni, A., Greenhagen, E.H., Consiglio, A.L., MacEwen, K., Crabtree, D.V., Afshar, J., Nugent, R.L., Hamilton, M.A., Shaw, A.J., South, C.R., Stephanopoulos, G., Brevnova, E.E., 2016. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain, *Biotechnol Biofuels.* 9, 77.
- Gadjos, P., Nicaud, J.M., Rossignol, T., Certik, M., 2015. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy., *Appl Microbiol Biotechnol.* 99, 8065-8074.
- Gajdos, P., Nicaud, J.M., Rossignol, T., Certik, M., 2015. Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy, *Appl Microbiol Biotechnol.*
- Galdieri, L., Vancura, A., 2012. Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation, *J Biol Chem.* 287, 23865-23876.
- Gargano, S., Di Lallo, G., Kobayashi, G., Maresca, B., 1995. A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an Altered A9-fatty acid desaturase gene, *Lipids.* 30,.
- Gong, Y., Wan, X., Jiang, M., Hu, C., Hu, H., Huang, F., 2014. Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long chain polyunsaturated fatty acids, *Prog Lipid Res.* 56, 19-35.
- Graham, I.A., Larson, T., Napier, J.A., 2007. Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates, *Curr Opin Biotechnol.* 18, 142-147.
- Guerfal, M., Claes, K., Knittelfelder, O., De Rycke, R., Kohlwein, S.D., Callewaert, N., 2013. Enhanced membrane protein expression by engineering increased intracellular membrane production. *Microb Cell Fact.* 12,.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., Hegemann, J.H., 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.
- Hamilton, M.L., Haslam, R.P., Napier, J.A., Sayanova, O., 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids, *Metab Eng.* 22, 3-9.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., Kanehisa, M., 2008. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes, *J Lipid Res.* 49, 183-191.
- Hashizume, t., Higa, S., Sasaki, Y., Yamazaki, H., Iwamura, H., Matsuda, H., 1966. Constituents of cane molasses. Part I. Separation and identification of the nucleic acid derivatives, *Agr Biol Chem.* 30, 319-326.
- Hedbacker, K., Carlson, M., 2008. SNF1/AMPK pathways in yeast, *Front Biosci.* 13, 2408-2420.
- Henry, S.A., Kohlwein, S.D., Carman, G., 2012. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics.* 190, 317-349.

Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels, *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 11206-11210.

Hofbauer, H.F., Schopf, F.H., Schleifer, H., Knittelfelder, O., Pieber, B., Rechberger, G.N., Wolinski, H., Gaspar, M.L., Kappe, C.O., Stadlmann, J., Mechtler, K., Zenz, A., Lohner, K., Tehlivets, O., Henry, S.A., Kohlwein, S.D., 2014. Regulation of gene expression through a transcriptional repressor that senses acyl-chain length in membrane phospholipids, *Dev Cell*. 29, 729-739.

Holic, R., Yazawa, H., Kumagai, H., Uemura, H., 2012. Engineered high content of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Appl Microbiol Biotechnol*. 95, 179-187.

Horvath, S.E., Wagner, A., Steyrer, E., Daum, G., 2011. Metabolic link between phosphatidylethanolamine and triacylglycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta*. 1811, 1030-1037.

Huang, Y., Wang, L., Zheng, M., Zheng, L., Tong, Y., Li, Y., 2013. Overexpression of NgAUREO1, the gene coding for aureochrome 1 from *Nannochloropsis gaditana*, into *Saccharomyces cerevisiae* leads to a 1.6-fold increase in lipid accumulation, *Biotechnol Lett*.

Jackson F. M., Fraser T. C. M., Smith M.A., Lazarus C., Stobart A. K., Griffiths G., 1998. Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem*. 252, 513.

Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., Schneider, R., 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Sci*. 124, 2424-2437.

James, A.W., Nacchiapan, V., 2014. Phosphate transporter mediated lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* under phosphate starvation conditions, *Bioresour Technol*. 151, 100-105.

Jiang, H., Zhang, Y., Sun, J., Wang, W., Gu, Z., 2008. Differential selection on gene translation efficiency between the filamentous fungus *Ashbya gossypii* and yeasts. *BMC Evol Biol*. 8, 343.

Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Gilooly, L., McDaid, K., Oh, C.S., Martin, C.E., Godberg M.A., 2002. Mga2p processing by hypoxia and unsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: impact on LORE-dependent gene expression, *Eukariot Cell*. 3, 481-490.

Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., Godberg M.A., 2001. MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol*. 18, 6161-6169.

Jones, J.M., Gould, S.J., 2000. Identification of PTE2, a Human Peroxisomal Long-Chain Acyl-CoA Thioesterase, *Biochem Biophys Res Commun*. 275, 233-240.

Jump, D.B., Torres-Gonzalez, M., Olson, L.K., 2011. Soraphen A, an inhibitor of acetyl CoA carboxylase activity, interferes with fatty acid elongation, *Biochem Pharmacol*. 81, 660.

Kalervo Hiltunen, J., Schonauer, M.S., Autio, K.J., Mittelmeier, T.M., Kastaniotis, A.J., Dieckmann, C.L., 2009. Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids, *J Biol Chem.* 284, 9011-9015.

Kaliszewski, P., Szkopińska, A., Ferreira, T., Swiezewska, E., Berges, T., Zoładek, T., 2008. Rsp5p ubiquitin ligase and the transcriptional activators Spt23p and Mga2p are involved in co-regulation of biosynthesis of end products of the mevalonate pathway and triacylglycerol in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta.* 1781, 627-634.

Kamiryo, T., Parthasarathy, S., Numa, S., Evidence that acyl coenzyme A synthetase activity is required for repression of yeast acetyl coenzyme A carboxylase by exogenous fatty acids, *Proc Natl Acad Sci USA.* 73, 386-390.

Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H., Yamaoka, M., 2013. Overexpression of the active diacylglycerol acyltransferase variant transforms *Saccharomyces cerevisiae* into an oleaginous yeast, *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 7345-7355.

Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H., Yamaoka, M., 2014. Addition of methionine and low cultivation temperatures increase palmitoleic acid production by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Microbiol Biotechnol.*

Kamisaka, Y., Tomita, N., Kimura, K., Kainou, K., Uemura, H., DGA1 (diacylglycerol acyltransferase gene) overexpression and leucine biosynthesis significantly increase lipid accumulation in the delta-snf2 disruptant of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem J.* 408, 61-68.

Kamisaka, Y., Yokochi, T., Nakahara, T., Suzuki, O., 1990. Incorporation of linoleic acid and its conversion to gamma-linolenic acid in fungi, *Lipids.* 25, 54-60.

Kandasamy, P., Vemula, M., Oh, C.S., Chellappa, R., Martin, C.E., 2004. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces*, *J Biol Chem.* 279, 36586-36592.

Kato, T., Park, E.Y., 2012. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*, *Biotechnol Lett.* 34, 611.

Kavšček, M., Bhutada, G., Madl, T., Natter, K., 2015. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*, *BMC Syst Biol.* 9, 72.

Kayikci, O., Nielsen, J., 2015. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 15, 1-8.

Kikukawa, H., Sakuradani, E., Kishino, S., Park, S., Ando, A., Shima, J., Ochiai, M., Shimizu, S., Ogawa, J., 2013. Characterization of a trifunctional fatty acid desaturase from oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 using a yeast expression system, *J Biosci Bioeng.* 116, 672-676.

Kim, I., Roldao, A., Siewers, V., Nielsen, J., 2012. A systems-level approach for metabolic engineering of yeast cell factories, *FEMS Yeast Res.* 12, 228-248.

Koch, B., Schmidt, C., Daum, G., 2014. Storage lipids of yeasts: a survey of nonpolar lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol Rev.* 1-24.

Kohlwein, S.D., Veenhuis, M., J. van der Klei, I., 2013. Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat- store 'em up or burn 'em down, *Genetics*. 193, 1-50.

Kozak, B.U., van Rossum, H.M., Luttik, M.A.H., Akeroyd, M., Benjamin, K.R., Wu, L., de Vries, S., Daran, J., Pronk, J.T., van Maris, A.J.A., 2014. Engineering Acetyl Coenzyme A Supply: Functional Expression of a Bacterial Pyruvate Dehydrogenase Complex in the Cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*, *MBio*. 5, 1-11.

Laoteng, K., Anjard, C., Rachadawong, S., Tanticharoen, M., Maresca, B., Cheedvadhanarak, S., 1999. *Mucor roxii* $\Delta 9$ -desaturase gene is transcriptionally regulated during cell growth and by low temperature, *Mol Cell Biol Res Commun*. 1, 36-43.

Leber, C., Polson, B., Fernandez-Moya, R., da Silva, M.A.N., 2014. Overproduction and secretion of free fatty acids through disrupted neutral lipid recycle in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab Eng*. 28, 54-62.

Ledesma-Amaro, R., Kerkhoven, E.J., Revuelta, J.L., Nielsen, J., 2013. Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*, *Biotechnol Bioeng*. 9999, 1-9.

Ledesma-Amaro, R., Santos, M.A., Jimenez, A., Revuelta, J.L., 2014a. Strain design of *Ashbya gossypii* for single-cell oil production, *Appl Environ Microbiol*. 80, 1237-1244.

Ledesma-Amaro, R., Santos, M.A., Jimenez, A., Revuelta, J.L., 2014b. Turning single-cell oil production in *Ashbya gossypii* by engineering the elongation and desaturation systems, *Biotechnol Bioeng*. 111, 1782-1791.

Ledesma-Amaro, R., 2014c. Systems metabolic engineering in the industrial fungus *Ashbya gossypii*: boosting production of riboflavin, lipids and nucleosides, Tesis doctoral.

Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martínez, P., Jimenez, A., Revuelta, J.L., 2015a. Engineering *Ashbya gossypii* for efficient biolipid production., *Bioengineered*. 6, 119-123.

Ledesma-Amaro, R., Buey, R.M., Revuelta, J.L., 2015b. Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*, *Microb Cell Fact*. 14-58.

Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S., 2005. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*, *J Biotechnol*. 123, 273-280.

Li, X., Guo, D., Cheng, Y., Zhu, F., Deng, Z., Liu, T., 2014. Overproduction of fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Bioeng*. 9999, 1-12.

Liu, B., Zhao, Z., 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass, *J Chem Technol Biotechnol*. 82, 775-780.

Liu, L., Markham, K., Blazeck, J., Zhou, N., Leon, D., Otoupal, P., Alper, H.S., 2015. Surveying the lipogenesis landscape in *Yarrowia lipolytica* through understanding the function of a Mga2p regulatory protein mutant, *Metab Eng*. 31, 102-111.

- Liu, Y., Zhang, C., Shen, X., Zhang, X., Cichello, S., Guan, H., Liu, P., 2013. Microorganism lipid droplets and biofuel development, *BMB Rep.* 46, 575-581.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCT method, *Methods.* 25, 402-408.
- Lounds, C., Eagles, J., Carter, A.T., Mackenzie, D.A., Archer, D.B., 2007. Spore germination in *Mortierella alpina* is associated with transient depletion of arachidonic acid and induction of fatty acid desaturase gene expression, *Arch Microbiol.* 188, 299-305.
- Lozano-Martínez, P., Ledesma-Amaro, R., Revuelta, J.L., 2016. Engineering *Ashbya gossypii* for ricinoleic and linoleic acid production, *Chem Eng Trans.* 49, 253-258.
- Mackenzie, D.A., Carter, A.T., Wongwathanarat, P., Eagles, J., Salt, J., Archer, D.B., 2002. A third fatty acid D9 desaturase from *Mortierella alpina* with a different substrate specificity to ole1p and ole2p. *Microbiology.* 148, 1725.
- Maeda, I., Delessert, S., Hasegawa, S., Seto, Y., Zuber, S., Poirier, Y., 2006. The peroxisomal Acyl-CoA thioesterase Pte1p from *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient degradation of short straight chain and branched chain fatty acids., *J Biol Chem.* 281, 11729-11735.
- Maeda, Y., Oku, M., Sakai, Y., 2015. A defect of the vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis, *Autophagy.*
- Magalhes, F., Aguiar, T.Q., Oliveira, C., Domingues, L., 2014. High-level expression of *Aspergillus niger* b-galactosidase in *Ashbya gossypii*, *Biotechnol Prog.* 30, 261-268.
- Malanovic, N., Streith, I., Wolinski, H., Rechberger, G., Kohlwein, S., Tehlivets, O., 2008. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, key enzyme of methylation metabolism, regulates phosphatidylcholine synthesis and triacylglycerol homeostasis in yeast, *J Biol Chem.* 283, 23989-23999.
- Martin, C.E., Oh, C.S., Jiang, Y., 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast, *Biochim Biophys Acta.* 1771, 271-285.
- Mavraganis, I., Meesapyodsuk, D., Vrinten, P., Smith, M., Qiu, X., 2010. Type II diacylglycerol acyltransferase from *Claviceps purpurea* with ricinoleic acid, a hydroxyl fatty acid of industrial importance, as preferred substrate, *Appl Environ Microbiol.* 76, 1135-1142.
- McDonough, V.M., Stucky, J.E., Martin, C.E., 1992. Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene, *J Biol Chem.* 267, 5931-5936.
- McMahon, M.D., Prather, K.L.J., 2014. Functional Screening and In Vitro Analysis Reveal Thioesterases with Enhanced Substrate Specificity Profiles That Improve Short-Chain Fatty Acid Production in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol.* 80, 1042-1050.
- Meesapyodsuk, D., Qiu, X., 2008. An oleate hydroxylase from the fungus *Claviceps purpurea*: cloning, functional analysis, and expression in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 147, 1325-1333.

- Meesters, P., Eggink, G., 1996. Isolation and characterization of a A-9 fatty acid desaturase gene from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* CBS 570, *Yeast*. 12, 723-730.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., Compagno, C., 2007. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex, *FEBS J*. 274, 976.
- Michal, G., Schomburg, D., 2012. *Biochemical pathways: An atlas on biochemistry and molecular biology*, Anonymous John Wiley & Sons, .
- Muto, M., Kubota, C., Tanaka, M., Satoh, A., Matsumoto, M., Yoshino, T., Tanaka, T., 2013. Identification and functional analysis of Delta-9 desaturase, a key enzyme in PUFA synthesis, isolated from the oleaginous diatom *Fistulifera*, *PLoS One*. 8, .
- Najjar, A., Robert, S., Guérin, C., Violet-Asther, M., Carrière, F., 2011. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans, *Appl Microbiol Biotechnol*. 89, 1947-1962.
- Nambou, K., Zhao, C., Wei, L., Chen, H., Imanaka, T., Hua, Q., 2014. Designing of a “cheap to run” fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for biodiesel, *Bioresour Technol*. 173, 324-333.
- Napier, J.A., Sayanova, O., Stobart, K., Shewry, P.R., 1997. A new class of cytochrome b5 fusion proteins, *Biochem J*. 328, 717.
- Natter, K., Kohlwein, S.D., 2013. Yeast and cancer cells- common principles in lipid metabolism, *Biochim Biophys Acta*. 1831, 314-326.
- Ni, Y., Wang, Y., Sun, Z., 2012. Butanol Production from Cane Molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and Semicontinuous Fermentation, *Appl Biochem Biotechnol*. 166, 1896-1907.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J.T., Sturley, S.L., 2002. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast, *J Biol Chem*. 277, 8877-8881.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production, *Eur J Lipid Sci Technol*. 113, 1031-1051.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications, *Eur J Biochem*. 113, 1052-1053.
- Papanikolaou, S., Beopoulos, A., Koletti, A., Thevenieau, F., Koutinas, A.A., Nicaud, J.M., Aggelis, G., 2013. Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J Biotechnol*. 168, 303-314.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I., 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing cocoa-butter substitute from industrial fats, *Antonie van Leeuwenhoek*. 80, 215-224.

- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures, *Appl Microbiol Biotechnol.* 58, 3008-3012.
- Park, E.Y., Zhang, J.H., Tajima, S., Dwiarti, L., 2007. Isolation of *Ashbya gossypii* mutant for an improved riboflavin production targeting for biorefinery technology, *J Appl Microbiol.* 103, 468-476.
- Peralta-Yahya, P.P., Zhang, F., Cardayre, S.B., Keasling, J.D., 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels, *Nature.* 488, 320-326.
- Poli, J.S., da Silva, M.A.N., Siqueira, E.P., Pasa, V.M.D., Rosa, C.A., Valente, P., 2014. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production, *Bioresour Technol.* 161, 320-326.
- Pomraning, K., Wei, S., Karagiosis, S., Kim, Y., Dohnalkova, A., Arey, B., Bredeweg, E., Orr, G., Metz, T., Baker, S., 2015. Comprehensive metabolomic, lipidomic and microscopic profiling of *Yarrowia lipolytica* during lipid accumulation identifies targets for increased lipogenesis, *PLoS One.* 1-17.
- Pridham, T.G., Raper, K.B., 1950. *Ashbya gossypii*: its significance in nature and in the laboratory, *Mycologia.* 42, 603-623.
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, K., Lazarus, C.M., 2004. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants, *Nat Biotechnol.* 22, 739-745.
- Qiao, K., Abidi, S.H., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N., Ajikumar, P.K., Stephanopoulos, G., 2015. Engineering lipid production in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, *Metab Eng.* 29, 56-65.
- Radulovic, M., Knittelfelder, O., Cristobal-Sarramian, A., Kolb, D., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., 2013. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches, *Curr Genet.* 59, 231-242.
- Rajakumari, S., Rajasekaran, R., Daum, G., 2010. Triacylglycerol lipolysis is linked to sphingolipid and phospholipid metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta.* 1801, 1314-1322.
- Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P., Nicaud, J.M., 2015. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions, *Biotechnol Biofuels.* 1-10.
- Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, A., 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties, *Bioresour Technol.* 100, 261-268.
- Ratledge, C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, *Biochem Soc Trans.* 30, 1047-1050.
- Ratledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, *Biochimie.* 86, 807.

Ratledge, C., 2014. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems, *Biotechnol Lett.* 36, 1557-1568.

Ratledge, C., Wynn, J.P., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, *Adv Appl Microbiol.* 51, 1-51.

Ribeiro, O., Domingues, L., Penttilä, M., Wiebe, M.G., 2012. Nutritional requirements and strain heterogeneity in *Ashbya gossypii*, *Journal of Basic Microbiology.* 51, 1-8.

Rim Kim, S., Park, Y., Hin, Y., Seo, J., 2013. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose fermentation, *Biotechnol Adv.* 31, 851-861.

Rossi, M.e.a., 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts, *FEMS Microbiol Ecol.* 69, 363-372.

Rude, M.A., Schirmer, A., 2009. New microbial fuels: a biotech perspective, *Curr Opin Microbiol.* 12, 274-281.

Runguphan, W., Keasling, J.D., 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals, *Metab Eng.* 21, 103-113.

Rutter, C.D., Zhang, S., Rao, C.V., 2015. Engineering *Yarrowia lipolytica* for production of medium-chain fatty acids, *Appl Microbiol Biotechnol.*

Sabirova, J.S., Haddouche, R., Van Bogaert, I.N., Mulaa, F., Verstraete, W., Timmis, K.N., Schmidt-Dannert, C., Nicaud, J.M., Soetaert, W., 2001. The 'LipoYeasts' project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products, *Microb Biotechnol.* 4, 47-54.

Sakuradani, E., 2010. Advances in the production of various polyunsaturated fatty acids through oleaginous fungus *Mortierella alpina* breeding, *Biosci Biotechnol Biochem.* 74, 908-917.

Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T., Shimizu, S., 1999. Identification of D12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*, *Eur J Biochem.* 261, 812-820.

Sandager, L., et al, 2002. Storage Lipid Synthesis Is Non-essential in Yeast, *J Biol Chem.* 277, 6478-6482.

Santos, M.A., Mateos, L., Stahmann, K.P., Revuelta, J.L., 2005. Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*, *Microbial Processes and Products.* 18, 283-300.

Schwechheimer, S.K., Park, E.Y., Revuelta, J.L., Becker, J., Wittmann C., 2016. Biotechnology of riboflavin, *Appl Microbiol Biotechnol.* 100, 2107-2119.

Schweizer, E., Hofmann, J., 2004. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems, *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 501-517.

- Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q., Hong, S.P., 2013. Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*, *Appl Environ Microbiol.* 1-47.
- Sheng, J., Feng, X., 201. Metabolic engineering of yeast to produce fatty acid-derived biofuels: bottlenecks and solutions, *Front Microbiol.* 6, 1-11.
- Shiba, Y., Paradise, E.M., Kirby, J., Ro, D.K., Keasling, J.D., 2007. Engineering the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high level production of isoprenoids. *Metab Eng.* 9, 160-168.
- Sijtsma, L., de Swaaf, M.E., 2004. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid, *Appl Microbiol Biotechnol.* 64, 146-153.
- Sorger, D., Daum, G., 2003. Triacylglycerol biosynthesis in yeast, *Appl Microbiol Biotechnol.* 61, 289.
- Stahmann, K.P., Boddecker, T., Sahm, H., 1997. Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles, or droplets of lipid or fatty acid, *Eur J Biochem.* 244, 220-225.
- Stahmann, K.P., Kupp, C., Feldmann, S.D., Sahm, H., 1994. Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin-producing fungus *Ashbya gossypii*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 42, 121-127.
- Stahmann, K.P., Revuelta, J.L., Seulberger, H., 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Appl Microbiol Biotechnol.* 53, 509.
- Steiner, S., Philippsen, P., 1994. Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, *Mol Gen Genet.* 242, 263-271.
- Steiner, S., Wendland, J., Wright, M.C., Philippsen, P., 1995. Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*, *Genetics.* 140, 973-987.
- Stephanopoulos, G., 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metab Eng.* 1, 1-11.
- Stephanopoulos, G., 2007. Challenges in engineering microbes for biofuels production, *Science.* 315, 801-804.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., Martin, C.E., 1989. Isolation and Characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem.* 264, 16535.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., Martin, C.E., 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the D9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene, *J Biol Chem.* 265, 20144.
- Sumper, M., Träuble, H., 1973. Membranes as acceptors for palmitoyl CoA in fatty acid biosynthesis, *FEBS Letters.* 30, 29-34.

- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review, *Int J Mol Sci.* 9, 1621-1651.
- Tai, M., Stephanopoulos, G., 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production, *Metab Eng.* 15, 1-9.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D., 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast, *Biochim Biophys Acta.* 1771, 255-270.
- Thorpe, R.F., Ratledge, C., 1973. Fatty acids of triglycerides and phospholipids from a thermotolerant strain of *Candida tropicalis* grown on n-alkanes at 30 and 40 degrees C., *J Gen Microbiol.* 78, 203-206.
- Uemura, H., 2012. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol.* 95, 1-12.
- Uttaro, A.D., 2006. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes, *IUBM Life.* 58, 563.
- van de Loo, F.J., Broun, P., Turner, S., Somerville, C., 1995. An oleate 12-hydroxylases from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 6743-6747.
- Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Chhevadhanarak, 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.
- Wan, X., Liang, Z., Gong, Y., Zhang, Y., Jiang, H., 2013. Characterization of three $\Delta 9$ -fatty acid desaturases with distinct substrate specificity from an oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*, *Mol Biol Rep.* 40, 4483-4489.
- Wang, H., Ji, G., Bi, S., Zhou, P., Chen, L., Liu, T., 2014. Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. *Bioresour Technol.* 172, 169-173.
- Wang, J., Zhang, B., Chen, S., 2011. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid, *Process Biochem.* 46, 1436-1441.
- Wang, Z., Gersteon, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat Rev Genet.* 10, 57-63.
- Wang, Z.P., Xu, H.M., Wang, G.Y., Chi, Z., Chi, Z.M., 2013. Disruption of the MIG1 gen enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109, *Biochim Biophys Acta.* 1831, 675-682.
- Weimar, J.D., DiRusso, C.C., Delio, R., Black, P.N., 2002. Functional role of fatty acyl-Coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids, *J Biol Chem.* 277, 29369-29376.
- Wendland, J., Ayad-Durieux, Y., Knechtle, P., Rebischung, C., Philippsen, P., 200. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, *Gene.* 242, 381-391.

- Wendland, J., Walther, A., 2005. *Ashbya gossypii*: a model for fungal developmental biology., Nat Rev Microbiol. 5, 421.
- Westin, M.A., Alexon, S.E., Hunt, M.C., 2004. Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases., J Biol Chem. 279, 21841-21848.
- Wilson, R.A., Chang, P.K., Dobrzyn, A., Ntambi, J.M., Zarnowsky, R., Keller, N.P., 2004. Two Δ^9 -stearic acid desaturases are required for *Aspergillus nidulus* growth and development, Fungal Genet Biol. 41, 501-509.
- Witters, L.A., Watts, T.D., Yeast acetyl-CoA carboxylase: In vitro phosphorylation by mammalian and yeast protein kinases, Biochem Biophys Res Commun. 169, 369-376.
- Wongwathanarat, P., Mackenzie, D.A., 1999. Two fatty acid D9 desaturase genes, *ole1* and *ole*, from *Mortierella alpina* complement the yeast *ole1* mutation. Microbiology. 145, 2939.
- Wright, M.C., Philippsen, P., 1991. Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccharomyces cerevisiae* ARS elements, Gene. 109, 99-105.
- Xie, D., Jackson, E.N., Zhu, Q., 2015. Sustainable source of omega-3 eicosapentanoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production, Appl Microbiol Biotechnol. 99, 1599-1610.
- Xue, Z., et al., 2013. Production of omega-3 eicosapentanoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*, Nat Biotechnol. 31, 734-741.
- Xue, Z., He, H., Hollerbach, D., Macool, D.J., Yadav, N.S., Zhang, H., Szostek, B., Zhu, Q., 2013. Identification and characterization of new Δ -17 fatty acid desaturases, Appl Microbiol Biotechnol. 97, 1973-1985.
- Yazawa, H., Holic, R., Kumagai, H., Uemura, H., 2013. Toxicity of ricinoleic acid production in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is suppressed by the overexpression of *plg7*, a phospholipase A2 of a platelet-activating factor (PAF) family homolog, Appl Microbiol Biotechnol. 97, 8193-8203.
- Yazawa, H., Kumagai, H., Uemura, H., 2012. Characterization of triglyceride lipase genes of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Appl Microbiol Biotechnol. 96, 981-986.
- Yazawa, H., Kumagai, H., Uemura, H., 2013. Secretory production of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Appl Microbiol Biotechnol. 97, 8663-8671.
- Zhang, S., Skalsky, Y., Garfinkel, D.J., 1999. MGA2 or SPT23 is required for transcription of the D9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, Genetics. 151, 473-483.
- Zhang, S., Skerker, J.M., Rutter, C.D., Maurer, M.J., Arkin, A.P., Rao, C.V., 2016. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production, Biotechnol Bioeng. 113, 1056-1066.

Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R.D., Drogui, P., Surampallii, R., 2014. Ultrasonication assisted lipid extraction from oleaginous microorganisms, *Bioresour Technol.* 158, 253-261.

Zhang, Y., Adams, I.P., Ratledge, C., Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation, *Microbiology.* 153, 2013-2025.

Zhao, C., Gu, Z., Nambou, K., Wei, L., Chen, I., Imanaka, T., Hua, Q., 2015. Metabolome analysis and pathway abundance profiling of *Yarrowia lipolytica* cultivated on different carbon sources, *J Biotechnol.* 206, 42-51.

Zheng, Y., Yu, X., Zeng, J., Chen, S., 2012. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw, *Biotechnol Biofuels.* 5, 50.

