



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

**INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOLÍPIDOS A
PARTIR DE RESIDUOS INDUSTRIALES
RICOS EN XILOSA EN *Ashbya gossypii***

DAVID DÍAZ FERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL 2020

El Dr. Alberto Jiménez García, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, y el Dr. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN: Que el licenciado Don David Díaz Fernández 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 BIOLÍPIDOS A PARTIR DE RESIDUOS INDUSTRIALES RICOS EN XILOSA EN *Ashbya gossypii*”** para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, y como directores del trabajo, expiden el presente certificado en:

Salamanca, 20 de Mayo de 2020

Fdo.: Dr. Alberto Jiménez García

Fdo.: Dr. José Luis Revuelta Doval

Agradecimientos

Los que me conocen, saben que nunca se me ha dado bien escribir agradecimientos y felicitaciones. Aun así, aquí estoy, ante una hoja en blanco y pensando en todos aquellos que me han acompañado a lo largo de todos estos años de doctorado. El camino hasta ahora no ha sido sencillo, y el trabajo y esfuerzo que supone realizar una Tesis Doctoral es difícil plasmarlo en unas pocas líneas. Sin embargo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí, he logrado alcanzar esta complicada meta. Quiero expresar mi agradecimiento especialmente a:

A los Drs. Alberto Jiménez y José Luis Revuelta, directores de mi Tesis Doctoral, por la orientación, conocimientos y ayuda sin los cuales no hubiese sido posible la realización de esta tesis.

A los Drs. M^a Ángeles Santos y Rubén Martínez por sus charlas amenas y sus enseñanzas. Siempre dispuestos a dar un buen consejo y despejar todas mis dudas.

A mis compañeros de laboratorio: Lola, Silvia, Marta y Fernando, que me ayudaron y apoyaron en todo momento a lo largo de estos años en el laboratorio. Sin vosotros, no habría sido posible. A David y Gloria, doctorandos como yo, aprovechad esta etapa de aprendizaje y ya veréis como pronto llegaréis a la meta.

Por supuesto, a la Dra. Victoria Isabel Martín, llegaste casi al final del recorrido y, sin embargo, no tendría espacio suficiente en estas líneas para describir todo lo que he aprendido contigo. Infinitas gracias por darme aliento, brindarme tus conocimientos y, evidentemente, por tu valiosa amistad.

A mis compañeros de Portugal, los Drs. Lucília Domingues, Tatiana Q. Aguiar, Aloia Romaní y Rui Silva, que me recibisteis con los brazos abiertos e hicisteis mucho más

agradable mi estancia en Braga. Gracias por todos vuestros consejos y enseñanzas en el campo de la Bioingeniería.

A mi familia, mis tíos y mis primos, siempre dispuestos a echarme una mano. A mis padres, mis abuelos y mi hermano, por ellos he llegado a ser quién soy y me ayudaron a tener la fuerza suficiente para alcanzar mis metas.

A mis amigos: Adán, Celia, Patricia, Tamara y Vanesa. Hemos compartido muchas penas y alegrías, y siempre habéis estado ahí cuando más os he necesitado. Sois mi familia, la familia que se elige. Quiero agradecerme especialmente a ti, Tamara, mi hermanita adoptiva, por echarme un capote cuando más me hizo falta, no sólo estos años de convivencia en Salamanca, sino todos los que hemos vivido y los que nos quedan por vivir juntos.

A Edgar, compañero de vida, tu fuerza, tu valor, tu apoyo incondicional, el refugio que me supones, ha sido el que me ha mantenido a flote. Sin ti no habría llegado hasta aquí, este proyecto también es tuyo.

ABREVIATURAS

AcCoA	Acetil-CoA
Ag	<i>Ashbya gossypii</i>
CCh	Hidrolizado de raquis de mazorca de maíz (Corn Cob Hydrolysate)
CCR	Represión catabólica por carbono (Carbon Catabolite Repression)
cDNA	DNA complementario
crRNA	RNA de direccionamiento CRISPR
dDNA	DNA donador
DSB	Rotura de doble cadena de DNA
FA	Ácido graso (Fatty Acid)
FAS	Sintasa de ácidos grasos (Fatty Acid Syntase)
F6P	Fructosa-6-fosfato
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
gRNA	RNA guía
G418	Geneticina
G6P	Glucosa-6-fosfato
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
HR	Recombinación homóloga
Hxt	Transportadores de hexosas
NHEJ	Unión no homóloga (Nonhomologous end joining)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	PCR cuantitativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR a tiempo real

R5P	Ribosa-5-fosfato
Ru5P	Ribulosa-5-fosfato
SCOs	Aceites unicelulares (Single-Cell Oils)
sgRNA	RNA guía sintético
TAG	Triacilgliceroles
tracrRNA	crRNA transactivador
XDH	Xilitol deshidrogenasa
XI	Xilosa isomerasa
XK	Xilulosa quinasa
XR	Xilosa reductasa
Xu5P	Xilulosa-5-fosfato

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	17
1. <i>Ashbya gossypii</i>	19
1.1. Biología de <i>A. gossypii</i>	19
1.2. Importancia biotecnológica de <i>A. gossypii</i>	21
1.3. Producción biotecnológica de lípidos microbianos	23
2. METABOLISMO LIPÍDICO	24
2.1. Biosíntesis de lípidos	24
2.2. Catabolismo lipídico	26
3. METABOLISMO DE XILOSA EN MICROORGANISMOS	28
3.1. Ruta de las pentosas fosfato	29
3.2. Ruta de la Fosfocetolasa	30
3.3. Estrategias biotecnológicas para la optimización del aprovechamiento de xilosa	30
3.4. Importancia de los transportadores de hexosas y pentosas en el co-transporte de azúcares	32
4. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. MATERIAL BIOLÓGICO	43
1.1. Cepas de <i>A. gossypii</i>	43
1.2. Cepas de <i>E. coli</i>	45
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	46
2.1. Medios y condiciones de cultivo de <i>A. gossypii</i>	46

2.1.1. Preparación y detoxificación de hidrolizados de residuos lignocelulósicos	47
2.1.2. Preparación y detoxificación del glicerol crudo	48
2.2. Medios y condiciones de cultivo de <i>E. coli</i>	48
3. OLIGONUCLEÓTIDOS Y VECTORES	49
3.1. Oligonucleótidos	49
3.2. Vectores y plásmidos	51
4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	55
4.1. Obtención de esporas de <i>A. gossypii</i>	55
4.2. Transformación de esporas de <i>A. gossypii</i>	55
4.3. Transformación de células de <i>E. coli</i>	56
4.4. Curva de crecimiento de <i>A. gossypii</i>	56
5. MANIPULACIÓN DEL DNA Y EL RNA	56
5.1. Obtención del DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	56
5.2. Obtención del DNA genómico de <i>A. gossypii</i>	56
5.3. Digestión enzimática y ligación	57
5.4. Electroforesis de DNA	57
5.5. Purificación de un fragmento de DNA en gel de agarosa	58
5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
5.7. Purificación de un fragmento de DNA procedente de una PCR	59
5.8. Secuenciación de DNA	59
5.9. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)	59
5.9.1. Obtención de RNA de <i>A. gossypii</i>	59
5.9.2. Síntesis de DNA copia (cDNA)	60
5.9.3. Q-RT-PCR	60
5.10. Sistema de clonación Golden Gate	60
5.11. Sistema de clonación NEbuilder	62

6. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y MÓDULOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE <i>Ashbya gossypii</i>	63
6.1. Módulos para la sobreexpresión génica	63
6.2. Módulos para la delección génica	64
6.3. Módulos para la expresión de genes heterólogos	65
6.4. Eliminación del marcador de resistencia al antibiótico de selección	66
6.5. Técnica CRISPR/Cas9 para la edición genómica en <i>A. gossypii</i>	68
7. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	69
7.1. Extracción de lípidos de la biomasa para análisis por cromatografía de gases y espectometría de masas (GC-MS)	69
7.2. Extracción de lípidos de la biomasa para análisis cuantitativo gravimétrico	71
7.3. Extracción de lípidos del medio extracelular para análisis por GC-MS	71
8. ANÁLISIS DE METABOLITOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)	71
9. DETECCIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
1. INGENIERÍA METABÓLICA PARA EL APROVECHAMIENTO DE XILOSA EN <i>Ashbya gossypii</i>	75
2. CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES DE AZÚCARES EN <i>Ashbya gossypii</i>	81
2.1. Caracterización de los homólogos de genes <i>HXT</i> en <i>A. gossypii</i>	81
2.2. Contribución de los homólogos <i>HXT</i> al transporte de xilosa en <i>A. gossypii</i>	83
2.3. Co-utilización de azúcares mixtos en <i>A. gossypii</i>	85
3. CANALIZACIÓN DE FLUJO METABÓLICO DE XILOSA HACIA LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS	88

3.1. Sobreexpresión heteróloga de los genes <i>pta</i> y <i>xpkA</i> (ruta de la fosfoacetolasa)	88
3.2. Bloqueo del catabolismo de ácidos grasos mediante la delección del gen <i>POX1</i>	89
4. DESREGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN <i>A. gossypii</i>	93
4.1 Desregulación de la expresión de los genes <i>OLE1/OLE2</i> de <i>A. gossypii</i>	94
4.2 Desregulación de la enzima <i>Acc1</i>	95
4.3 Sobreexpresión del gen <i>DGA1</i> de <i>A. gossypii</i>	97
4.4 Empleo de medios de cultivo con mezclas de distintas fuentes para la producción lipídica en <i>A. gossypii</i>	98
5. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN <i>Ashbya gossypii</i>	101
5.1. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos para producción de lípidos en <i>A. gossypii</i>	101
5.2. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos suplementados con melazas de caña de azúcar para producción de lípidos en <i>A. gossypii</i>	103
5.3. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos suplementados con glicerol crudo para producción de lípidos en <i>A. gossypii</i>	106
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	113
APÉNDICE	127

INTRODUCCIÓN

1. *Ashbya gossypii*

La sociedad actual es cada vez más exigente y está más concienciada en la necesidad de un cambio en el modelo económico y energético hacia un modelo de economía circular. Dentro de este contexto de transición ecológica y energética hacia un modelo de emisión cero de gases de efecto invernadero, el aprovechamiento de residuos industriales para bioprocesos de fermentación microbiana tiene una importancia cada vez mayor en la industria biotecnológica. Uno de los objetivos principales de la economía circular es el mantenimiento del valor añadido de los productos el mayor tiempo posible para una mayor sostenibilidad medioambiental (European Commission 2018).

Una industria biotecnológica orientada hacia una bioeconomía sostenible refleja el interés por el estudio de las capacidades de distintos microorganismos para producir metabolitos de alto valor añadido a partir de residuos industriales. Algunos de estos residuos industriales de bajo costo son los hidrolizados lignocelulósicos ricos en xilosa, las melazas de la industria azucarera y el glicerol crudo entre otros co-productos de desecho industrial (Ravindran and Jaiswal 2016; Qin et al. 2017; Hassan, Williams, and Jaiswal 2019).

En este trabajo se aborda la utilización del hongo filamentoso *A. gossypii* como chasis biotecnológico para la producción de lípidos microbianos mediante la valorización de formulaciones mixtas de hidrolizados lignocelulósicos ricos en xilosa, melazas de la industria azucarera y glicerol crudo.

1.1. Biología de *A. gossypii*

Ashbya (Eremothecium) gossypii (Fig. 1) es un hongo filamentoso de la familia Saccharomycetaceae que, desde el punto de vista evolutivo, está relacionado estrechamente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dietrich et al. 2004). *A. gossypii* fue aislado por Ashby y Nowell en 1926 como agente causante de estigmatomycosis en plantas del algodón. El vector de propagación de las esporas de *A. gossypii* son insectos hemípteros como *Dysdercus suturellus*, ya que el hongo no es capaz de penetrar las paredes celulares vegetales a menos que ocurra una lesión mecánica (Ashby and Nowell 1926). *A. gossypii* tiene un micelio cenocítico con núcleos haploides y posee uno de los genomas eucariotas más pequeños con $9,2 \times 10^6$ pb organizado en 7 cromosomas. Más del 90% de los genes de *A. gossypii* presentan ortólogos en el genoma de *S. cerevisiae*. Además, existen un patrón de conservación del orden de los genes (sintenia) en amplios segmentos genómicos de *A. gossypii* y *S. cerevisiae* (Dietrich et al. 2004).

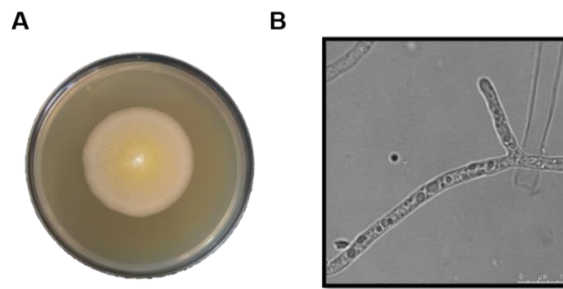


Figura 1. Morfología de *A. gossypii*. **A**, crecimiento de *A. gossypii* en medio sólido MA2; **B**, micrografía del micelio de *A. gossypii* crecido durante 5 días.

A. gossypii tiene un ciclo de vida haplobióntico que comienza con una espora filiforme, uninucleada (Fig. 2). Su reproducción es asexual mediante esporas haploides y se desconoce la existencia de un ciclo de vida sexual. La germinación de las esporas se inicia con una fase de crecimiento isotrópico desde la zona central donde se producirán hasta tres rondas de divisiones nucleares. A continuación, se produce un crecimiento dicotómico, bipolar y apical al cabo de 8 horas de cultivo en condiciones óptimas y coincidiendo con el momento idóneo para la transformación genética de *A. gossypii*. Posteriormente, se produce la elongación de las hifas y la aparición de ramificaciones laterales, surgiendo entonces el micelio joven. Este micelio joven tiene como característica destacable que sus hifas crecen apicalmente en forma de Y (Fig. 2). El crecimiento micelial continúa hasta el agotamiento de los nutrientes, momento en el cual se produce el proceso de esporulación: los extremos de las hifas se separan por septos en las zonas más viejas del micelio y se forman los sacos esporíferos que contienen las esporas haploides del hongo en un número variable entre 8 y 16 (Fig. 2). Finalmente, se liberan las esporas al medio mediante la autólisis de los sacos esporíferos, cerrando así el ciclo de vida asexual (Jürgen Wendland and Walther 2005).

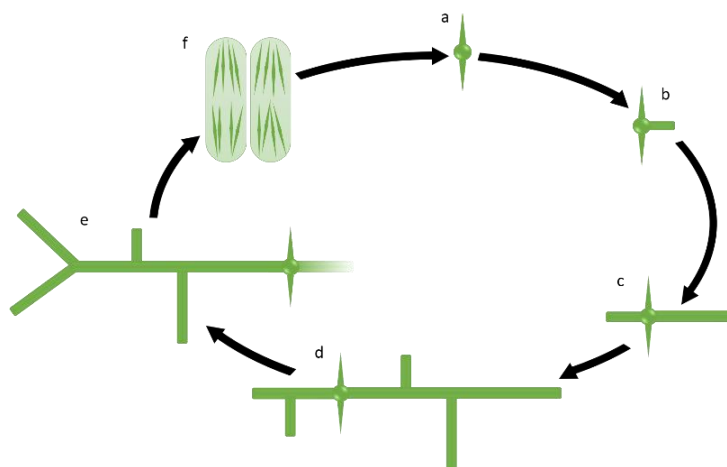


Figura 2. Ciclo de vida de *A. gossypii*. Los estadios de crecimiento que se indican son: (a) fase de crecimiento isotrópico durante la germinación, (b) formación del tubo germinal, (c) patrón de ramificación bipolar, (d) micelio joven con ramificaciones laterales, (e) ramificación dicotómica apical de las hifas y (f) formación de sacos esporíferos y esporulación.

1.2. Importancia biotecnológica de *A. gossypii*

A. gossypii es un microorganismo de gran interés industrial debido a su capacidad natural de producir elevadas cantidades de riboflavina (vitamina B₂). La superproducción de riboflavina causa la coloración amarilla-anaranjada típica del micelio de *A. gossypii* (Revuelta et al. 2017). La vitamina B₂ se emplea como aditivo y colorante para el consumo humano, así como suplemento en la alimentación animal. También es utilizada para el tratamiento de enfermedades producidas por un déficit de la misma, como: migrañas, anemia drepanocítica, cataratas, etc (Sperduto et al. 1993; Schoenen, Jacquy, and Lenaerts 1998; Powers and Thurnham 1981).

Durante el cultivo de *A. gossypii* se pueden distinguir dos fases que presentan características específicas en cuanto a la producción de biomasa, riboflavina y capacidad de esporulación: una fase trófica en la que la biomasa aumenta exponencialmente y la producción de riboflavina es mínima; y una fase productiva en la que la tasa de crecimiento disminuye debido al agotamiento de los nutrientes y se activa la esporulación y la superproducción de riboflavina (Stahmann et al. 2001).

En la actualidad se dispone de numerosas herramientas moleculares que hacen de *A. gossypii* un organismo genéticamente manipulable (Aguar, Silva, and Domingues 2017). Aunque en este microorganismo no existen plásmidos estables (J Wendland et al. 2000), se ha descrito un método de transformación eficiente mediante la integración genómica de DNA exógeno a través de mecanismos de recombinación homóloga (Steiner et al. 1995). Se dispone además de la secuencia genómica de *A. gossypii* (Dietrich et al. 2004), así como de un modelo metabólico a escala genómica (Ledesma-Amaro, Kerkhoven, et al. 2014). También se han desarrollado métodos de ensamblaje rápido de módulos de DNA y expresión heteróloga adaptados a *A. gossypii* (Ledesma-Amaro, Jiménez, and Revuelta 2018), así como un método CRISPR/Cas9 de edición del genoma de *A. gossypii* a partir de un solo vector (Jiménez et al. 2019) (Fig. 3).

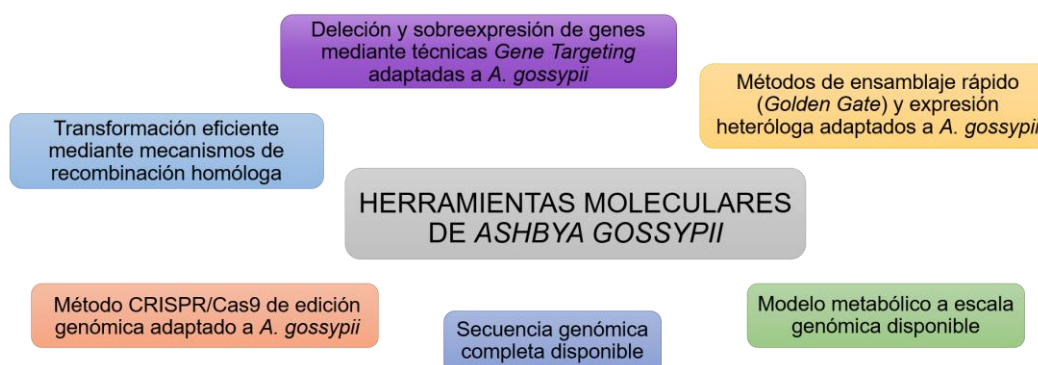


Figura 3. Herramientas moleculares disponibles para la manipulación de de *A. gossypii*

La superproducción de riboflavina en *A. gossypii* depende de un potente metabolismo purinogénico para la producción de GTP, que es el precursor inmediato de la vitamina B₂, motivo por el que *A. gossypii* se emplea en la producción industrial de riboflavina (Revuelta et al. 2017). Gracias a su potente metabolismo purinogénico, se han construido cepas de *A. gossypii* que producen otros metabolitos relacionados con la riboflavina como el ácido fólico, la guanosina y la inosina (Ledesma-Amaro, Buey, and Revuelta 2015; Serrano-Amatriain et al. 2016). El ácido fólico, también conocido como vitamina B₉, es esencial en el ser humano y es utilizado, por ejemplo, para evitar problemas neurológicos del feto en mujeres embarazadas (Duthie 1999; Hall and Solehdin 1998).

A. gossypii también puede ser utilizado como chasis biotecnológico para la producción de proteínas recombinantes (Aguiar, Silva, and Domingues 2017), γ -lactonas (R. Silva et al. 2019) y lípidos microbianos (Ledesma-Amaro et al. 2015; Ledesma-Amaro, Jiménez, and Revuelta 2018). La selección de un chasis biotecnológico se basa en la capacidad biosintética de un microorganismo determinado, la disponibilidad de herramientas genéticas y la capacidad de ser procesado con facilidad en fermentaciones industriales. Por lo tanto, la selección de un organismo como chasis biotecnológico está determinada por la capacidad de producir un metabolito de forma natural, o bien de la existencia de una amplia gama de herramientas moleculares para su manipulación mediante ingeniería genética (Kim et al. 2012). Debido a la gran cantidad de herramientas genómicas, bioinformáticas y biotecnológicas disponibles en *A. gossypii* (Fig. 3), junto a su capacidad de ser empleado en fermentaciones industriales, se puede considerar como un microorganismo con características óptimas para su uso en procesos industriales, es decir, puede ser considerado un chasis biotecnológico adecuado (Wendland et al. 2000; Stahmann, Revuelta, and Seulberger 2000; Gattiker et al. 2007).

En cuanto a la producción de lípidos, *A. gossypii* no se puede considerar estrictamente un microorganismo oleaginoso porque de manera natural no alcanza un 20% de contenido lipídico respecto de la biomasa total; no obstante, se ha observado que *A. gossypii* es capaz de acumular cuerpos lipídicos en el interior de sus hifas (Stahmann et al. 1994). Se han descrito cepas de *A. gossypii* capaces de alcanzar niveles elevados de contenido lipídico mediante el bloqueo del catabolismo de los ácidos grasos y la adición de ácido oleico como principal fuente de carbono en el medio de cultivo (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014b). También se ha conseguido modificar los sistemas de elongación y desaturación de ácidos grasos hacia la obtención de aceites unicelulares (Single-Cell Oils, SCOs) con diversas aplicaciones potenciales, como la producción de biodiesel, esmaltes, cosméticos, lubricantes, etc (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a).

1.3. Producción biotecnológica de lípidos microbianos

Algunas de las aplicaciones de los SCOs o lípidos microbianos son la producción de biocombustibles, compuestos nutracéuticos y derivados de hidrocarburos (Shields-Menard et al. 2018; Lennen and Pfleger 2013). La utilización de microorganismos para la producción biotecnológica de lípidos es una alternativa más sostenible que el empleo de aceites vegetales o grasas animales debido a que el cultivo de microorganismos es independiente del clima y sus ciclos de vida son cortos. Además, el cultivo de microorganismos no requiere grandes terrenos de cultivo y, por lo tanto, no se produce competencia con la producción agrícola destinada al consumo humano o animal (Huang et al. 2013; R. Chen and Dou 2015). Por último, la sostenibilidad de la producción de lípidos microbianos está avalada por el empleo de fuentes de carbono renovables y de bajo costo, como las melazas de caña de azúcar, los hidrolizados de residuos lignocelulósicos o el glicerol (Ruan et al. 2012; Gong et al. 2016; Ganatsios et al. 2017; Chaiyaso et al. 2019).

2. METABOLISMO LIPÍDICO

Los lípidos se acumulan en la célula en forma de ácidos grasos neutros y no en su forma libre. Los microorganismos evitan así que sus membranas celulares se desestabilicen (Koch, Schmidt, and Daum 2014). Estos lípidos neutros se acumulan en compartimentos celulares denominados cuerpos lipídicos que son estructuras celulares formadas por una acumulación de triacilglicéridos (*TAG*) rodeadas a su vez por una monocapa de fosfolípidos (Ratledge and Wynn 2002; Beopoulos, Nicaud, and Gaillardin 2011).

2.1. Biosíntesis de lípidos

El precursor inmediato de la biosíntesis de ácidos grasos es el acetil-CoA (*AcCoA*) que se condensa para formar malonil-CoA mediante una reacción enzimática catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa, codificada por el gen *ACC1* (Fig. 4). La actividad de la enzima *Acc1* es un paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos y está regulada en dos niveles: mediante inhibición por producto final mediada por acil-CoA, y por fosforilación dependiente de la proteína quinasa *Snf1* (Qiao et al. 2015). En este sentido, se ha descrito que en la proteína *Snf1* de *S. cerevisiae*, la sustitución de los residuos de serina (*Ser*) *Ser659* y *Ser1157* por residuos no fosforilables da como resultado una mayor actividad de *Acc1* (Shi et al. 2014).

El complejo enzimático *FAS* (*Fatty Acid Syntase*) codificado por los genes *FAS1* y *FAS2*, cataliza la condensación cíclica del *AcCoA* y el malonil-CoA formando así una cadena saturada de 14 a 18 carbonos. En cada ciclo de condensación se requieren dos moléculas de *NADPH* en forma de poder reductor, poniendo de manifiesto la importancia del mantenimiento del equilibrio de cofactores en estrategias enfocadas al aumento de la biosíntesis de lípidos (Beopoulos, Nicaud, and Gaillardin 2011).

Una vez se han sintetizado las cadenas de ácidos grasos saturados (*C16:0*, ácido palmítico; *C18:0*, ácido esteárico), los sistemas de elongación de ácidos grasos catalizan la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (desde *C18:0* hasta *C26:0*) (Fig. 4). Además, los sistemas de desaturación de ácidos grasos catalizan la formación de dobles enlaces en la cadena para dar lugar a ácidos grasos insaturados (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a). Por lo tanto, la actividad de los sistemas de elongación y desaturación determinan el perfil de ácidos grasos de cada organismo.

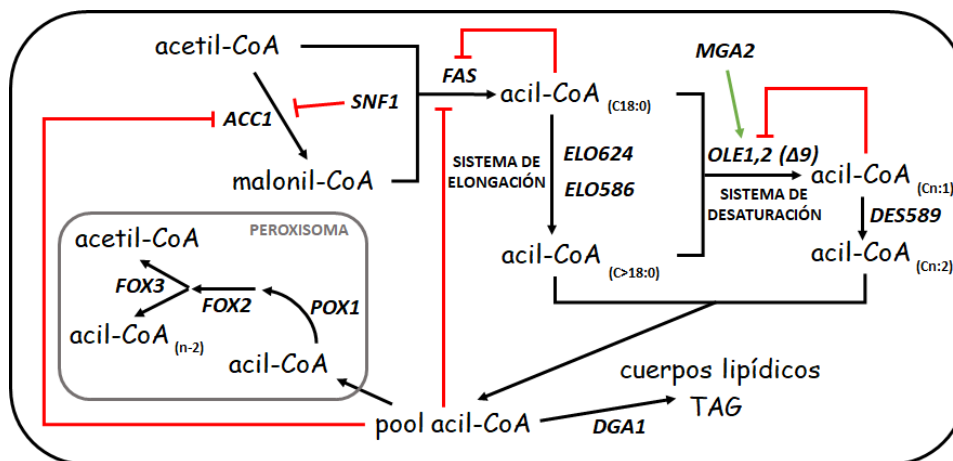


Figura 4. Representación esquemática del metabolismo lipídico en *A. gossypii*. Las líneas rojas indican puntos de regulación negativa; la línea verde indica activación transcripcional. Acc1, acetil-CoA carboxilasa; Snf1, proteína quinasa dependiente de AMP; FAS, Ácido Graso Sintasa; Elo624 y Elo586, elongasas de ácidos grasos; Ole1,2, desaturasa $\Delta 9$; MGA2, gen regulador de Ole1,2; Des589, desaturasa 589; Dga1, diacilglicerol aciltransferasa; Pox1, acil-CoA oxidasa; Fox2, enzima multifuncional: hidroxilacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa; Fox3, oxoacil tiolasa

En *A. gossypii* se han caracterizado los sistemas de elongación y desaturación de ácidos grasos. Se han descrito dos elongasas: Elo624 y Elo586, codificadas por los genes *AgELO624* (*AFR624W*) y *AgELO586* (*AFR586W*), respectivamente. La elongasa Elo624 añade hasta dos moléculas de AcCoA al ácido esteárico (C18:0) llegando a sintetizar ácido araquídico (C20:0) y ácido behénico (C22:0), mientras que la elongasa Elo586 puede añadir hasta cuatro moléculas de AcCoA al ácido esteárico (C18:0), sintetizando así los ácidos grasos araquídico (C20:0), behénico (C22:0), lignocérico (C24:0) y cerótico (C26:0) (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a) (Fig. 4).

Por otra parte, se han identificado dos desaturasas en *A. gossypii*: $\Delta 9$ y $\Delta 12$ que introducen un doble enlace en el noveno y duodécimo carbono de las cadenas de ácidos grasos, respectivamente. La desaturasa $\Delta 9$ introduce la primera insaturación en los ácidos grasos saturados, C16:0 y C18:0 mayoritariamente, aunque también es capaz de insaturar ácidos grasos de cadena larga (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a) (Fig. 4). La desaturasa $\Delta 12$ produce ácido linoleico (C18:2) a partir ácido oleico (C18:1) (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a). La desaturasa $\Delta 9$ está codificada por el gen *OLE1* en *S. cerevisiae* (Stukey, McDonough, and Martin 1990), mientras que *A. gossypii* posee dos genes que codifican enzimas con actividad desaturasa $\Delta 9$: *AgOLE1* (*AAR153C*) y *AgOLE2* (*AAR078C*) (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014a). La regulación transcripcional del gen *OLE1* se lleva a cabo por las proteínas codificadas por los genes *MGA2* y *SPT23* en *S. cerevisiae* (Shirong Zhang, Skalsky, and Garfinkel 1999), mientras que en *A. gossypii* únicamente la proteína Mga2 (*Acr165W*) es la que lleva a cabo esta función reguladora (Lozano-Martínez

et al. 2017). El gen *ACR165W* de *A. gossypii* es ortólogo de los genes *MGA2* y *SPT23* de *S. cerevisiae*. Estos dos genes de *S. cerevisiae* tienen una función redundante y son consecuencia de un evento de duplicación genómica (Dietrich et al. 2004). La proteína de membrana del retículo endoplasmático Mga2 es un regulador positivo de los genes *OLE1* y *OLE2* de *A. gossypii*, pero en su forma truncada en el extremo C-terminal (Mga2- Δ C-term) carece de la región de anclaje al retículo endoplasmático. Por tanto, Mga2- Δ C-term es una proteína soluble citoplasmática con transporte entre el núcleo y el citoplasma (Martin, Oh, and Jiang 2007; Liu et al. 2015). La proteína Mga2 es necesaria para la estabilización del mRNA de *OLE1* cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, mientras que en medios basados en ácido graso oleico como fuente de carbono dicha proteína desestabiliza el transcrito de *OLE1* (Martin, Oh, and Jiang 2007). En *A. gossypii*, la sobreexpresión de *MGA2* produce una hiperactivación de *OLE1* en un medio basado en glucosa como fuente de carbono y un 62% más de ácidos grasos totales que el tipo silvestre (Lozano-Martínez et al. 2017). Sin embargo, si se suplementa dicho medio de cultivo con ácido oleico, la sobreexpresión de *MGA2* desestabiliza el transcrito de *OLE1*, disminuyendo así la acumulación total de lípidos. Por otro lado, la expresión de la proteína Mga2- Δ C-term provoca un aumento del contenido total de ácidos grasos en *A. gossypii* en ambos tipos de medio de cultivo, alcanzando un 25% de contenido lipídico en medios de cultivo suplementados con un 2% de ácido oleico. Este dato coincide con los resultados observados en *S. cerevisiae*, donde la sobreexpresión de la forma truncada de Mga2 condujo a un aumento del contenido total de ácidos grasos (Kaliszewski et al. 2008).

Los TAGs se forman a partir de la condensación de una molécula de glicerol-3-fosfato con tres de acil-CoA. En primer lugar, dos moléculas de acil-CoA se unen secuencialmente por transesterificación a una molécula de glicerol-3-fosfato formando así el ácido fosfatídico. En segundo lugar, el ácido fosfatídico sufre una defosforilación para formar diacilglicerol, que es el sustrato de la enzima Dga1 (diacilglicerol aciltransferasa) y que cataliza el último paso de formación de los TAGs (Ratledge 2004) (Fig. 4). *DGA1* además influye de manera significativa en la acumulación total de lípidos tanto en *S. cerevisiae* (Sandager et al. 2002) como en *Yarrowia lipolytica* (Ledesma-Amaro and Nicaud 2016).

2.2. Catabolismo lipídico

El catabolismo lipídico proporciona energía a la célula mediante la degradación de los ácidos grasos a través de la β -oxidación (Poirier et al. 2006). Dichos ácidos grasos se movilizan desde los cuerpos lipídicos mediante lipasas (Beopoulos, Nicaud, and Gaillardin 2011). El proceso de β -oxidación es una secuencia cíclica de reacciones en las que se libera una molécula de AcCoA en cada ciclo.

El bloqueo de rutas de degradación de lípidos, como la β -oxidación, es una de las estrategias más comunes para aumentar la acumulación de lípidos en microorganismos. El primer paso de la β -oxidación está catalizado por la enzima acil-CoA oxidasa, codificada por el gen *AgPOX1* (*AER358C*) en *A. gossypii* (Fig. 4), cuya delección produce un incremento notable en la acumulación total de lípidos (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014b). La delección de homólogos de *POX1* para favorecer la acumulación de lípidos se ha descrito en otros organismos como *S. cerevisiae* o *Y. lipolytica* (Leber and Da Silva 2014; Beopoulos et al. 2009).

3. METABOLISMO DE XILOSA EN MICROORGANISMOS

La xilosa es el azúcar más común en la biomasa vegetal después de la glucosa. Por lo tanto, desde un punto de vista biotecnológico, resulta esencial conocer el metabolismo de la xilosa para implementar bioprocesos fermentativos que emplean xilosa como fuente de carbono.

Existen dos vías de utilización de la xilosa: la ruta XR-XDH-XK (xilosa reductasa-xilitol deshidrogenasa-xilulosa quinasa) y la ruta XI-XK (xilosa isomerasa-xilulosa quinasa) (Fig. 5). La ruta XR-XDH-XK es la más común en organismos eucariotas capaces de utilizar xilosa como la levadura *Scheffersomyces stipitis* (Eliasson et al. 2000). En esta vía se forma xilulosa-5-fosfato (Xu5P) desde xilosa a través de tres reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) y xilulosa quinasa (XK) (Fig. 5). Cabe destacar que las enzimas XR y XDH presentan un requerimiento diferencial de cofactores: mientras que la XR necesita NADPH, la XDH requiere NAD⁺. Por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio de cofactores es importante para evitar que se generen cuellos de botella metabólicos por saturación de actividades enzimáticas. Una vía alternativa de utilización de la xilosa es la ruta XI-XK, presente en bacterias como *Bacteroides* (Mert et al. 2017), o en algunos hongos anaeróbicos como *Piromyces sp.* (Son, Lee, and Kim 2018). En la ruta XI-XK, la enzima xilosa isomerasa (XI), que se ve inhibida por xilitol, cataliza la formación directa de xilulosa a partir de xilosa (Fig. 5) (Oreb et al. 2012). Una vez que se ha sintetizado Xu5P, el flujo metabólico de xilosa se dirige hacia la ruta de las pentosas fosfato y la glucólisis, produciendo así energía y poder reductor en forma de NADPH y NADH.

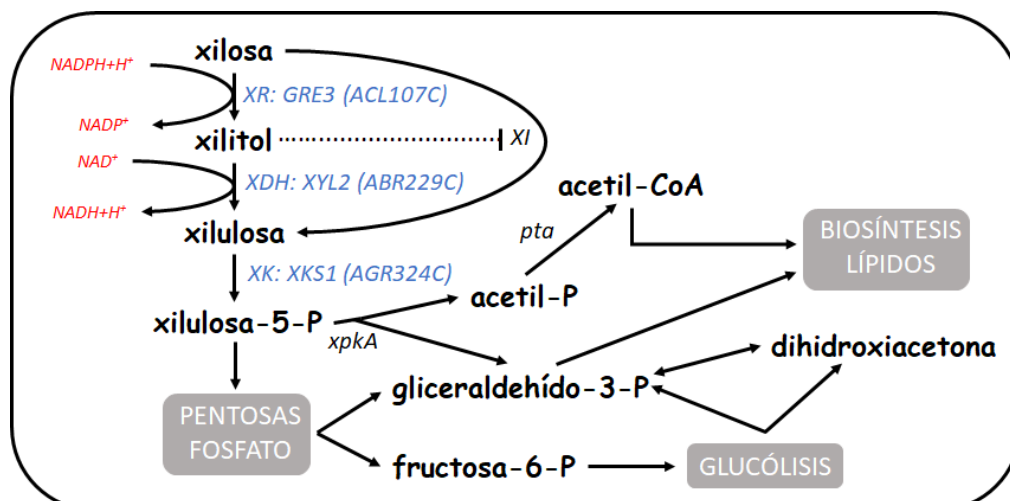


Figura 5. Metabolismo de xilosa en *Ashbya gossypii*. Gre3, xilosa reductasa (XR); Xyl2, xilitol deshidrogenasa (XDH); Xks1, xilulosa quinasa (XK); xpkA, fosfocetolasa; pta, fosfotransacetilasa

3.1. Ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato se divide en dos fases: la fase oxidativa y la fase no oxidativa. En la fase oxidativa se obtiene como producto final ribulosa-5-fosfato (Ru5P) a partir de glucosa-6-fosfato (G6P). Consta de tres reacciones enzimáticas, la primera de ellas dirigida por la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa (G6P DH), codificada por el gen *ZWF1* en *S. cerevisiae*, que cataliza el paso de G6P a 6-fosfogluconolactona y genera NADPH. La segunda enzima de la fase oxidativa es la 6-fosfogluconolactonasa, codificada por el gen *SOL3* en *S. cerevisiae*, que produce 6-fosfogluconato mediante la hidrólisis de la 6-fosfogluconolactona. El tercer y último paso de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato lo cataliza la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6-fosfogluconato DH*), codificada por el gen *GND1* en *S. cerevisiae*, y consiste en la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato hacia la producción de Ru5P, generando NADPH y CO₂ en el proceso (Stincone et al. 2015; Berg, Tymoczko, and Stryer 2002).

La fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato consiste en una serie de reacciones reversibles de interconversión de pentosas fosfato. La Ru5P generada en la fase oxidativa puede ser metabolizada hacia la síntesis de ribosa-5-fosfato (R5P) mediante la Ru5P isomerasa, o bien hacia la síntesis de Xu5P mediante la Ru5P epimerasa. Las siguientes reacciones llevadas a cabo por las enzimas transcetolasa y transaldolasa, codificadas por los genes *TKL1* y *TAL1* en *S. cerevisiae*, catalizan la interconversión de distintas pentosas fosfato para finalmente obtener fructosa-6-fosfato (F6P) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP), ambos intermediarios de la glucólisis, cerrando así la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 6). Esta ruta metabólica conecta los procesos metabólicos que producen NADPH con los que generan NADH y ATP (Stincone et al. 2015; Berg, Tymoczko, and Stryer 2002).

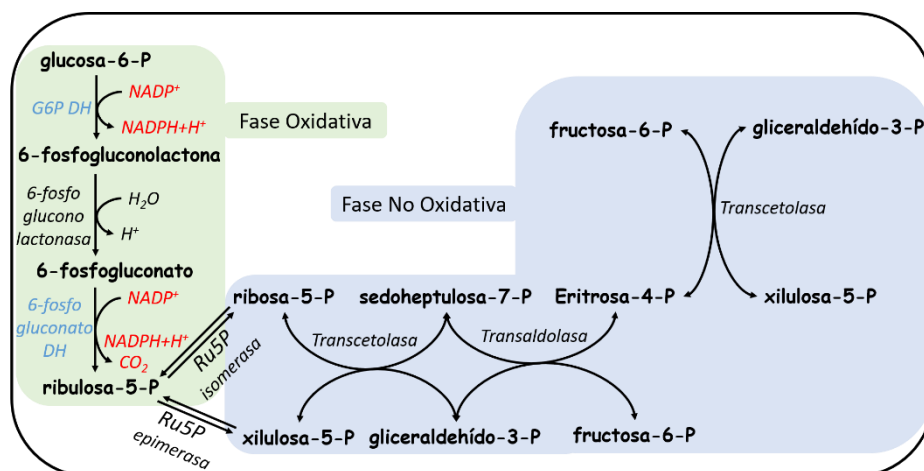


Figura 6. Ruta pentosas fosfato. La fase oxidativa está resaltada en fondo verde, mientras que en fondo azul se representa la fase no oxidativa. G6P DH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 6-fosfogluconato DH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; Ru5P, ribulosa 5-fosfato

3.2. Ruta de la Fosfocetolasa

En algunas bacterias y hongos filamentosos existe una ruta alternativa que dirige el flujo metabólico desde Xu5P hacia la síntesis de GAP y AcCoA, llamada ruta de la fosfocetolasa (De Jong et al. 2014). Se ha descrito que el aumento de precursores de la síntesis de lípidos, como el AcCoA o el malonil-CoA, provoca un incremento en la producción lipídica (J. Wang et al. 2016; Tang, Feng, and Chen 2013); por tanto, la sobreactivación de esta ruta permite canalizar flujo metabólico desde la fermentación de la xilosa hacia la biosíntesis de precursores lipídicos (De Jong et al. 2014) (Fig. 5). En esta vía metabólica participan tres enzimas: la Xu5P fosfocetolasa (*xpkA*) que cataliza la síntesis de GAP y acetil-fosfato a partir de Xu5P, la fosfotransacetilasa (*pta*) que produce AcCoA a partir de acetil-fosfato (Fig. 5) y la acetato quinasa (*ack*) que produce acetato a partir de acetil-fosfato (Papini et al. 2012).

En *Aspergillus nidulans*, la utilización de esta vía metabólica conduce a un aumento del flujo de carbono hacia acetato y AcCoA (Papini et al. 2012). De hecho, la sobreexpresión heteróloga en *S. cerevisiae* de los genes de *A. nidulans* y *Bacillus subtilis* que codifican para las enzimas *xpkA* y *pta* induce un aumento en el *pool* celular de AcCoA, que provoca un aumento de la producción de derivados lipídicos (De Jong et al. 2014).

3.3. Estrategias biotecnológicas para la optimización del aprovechamiento de xilosa

Se han descrito distintas modificaciones que posibilitan la fermentación de pentosas en algunos organismos, como la levadura *S. cerevisiae*. La identificación y optimización de transportadores eficientes de pentosas y la canalización del flujo metabólico hacia la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato son algunas de ellas. También se han descrito estrategias de optimización del uso de xilosa mediante la inhibición de rutas metabólicas competidoras y la expresión heteróloga de rutas alternativas de utilización de pentosas como la ruta de la fosfocetolasa (S. R. Kim et al. 2013; Demeke et al. 2013).

La expresión heteróloga de los genes *XYL1* y *XYL2* de *S. stipitis*, que codifican para las enzimas *XR* y *XDH* respectivamente, permite el crecimiento de *S. cerevisiae* en medios de cultivo con xilosa como fuente de carbono principal (Walfridsson et al. 1997). Una estrategia alternativa para optimizar el aprovechamiento de xilosa en *S. cerevisiae* consiste en la sobreexpresión del gen que codifica para la enzima *XI* de *Piromyces* sp. Esta cepa modificada de *S. cerevisiae* es capaz de utilizar xilosa como fuente de carbono en condiciones de anaerobiosis después de una adaptación evolutiva (Kuyper et al. 2003). Una comparación de las dos vías de utilización de la xilosa en *S. cerevisiae* ha puesto de

manifiesto que la tasa de consumo de xilosa, la productividad específica de etanol y la concentración final de etanol fueron significativamente más altas cuando se expresaba la vía XR-XDH-XK. Por tanto, la mejor alternativa para la optimización del aprovechamiento de xilosa en hongos y levaduras parece ser la vía XR-XDH-XK (Karhumaa et al. 2007).

En relación con la ruta de las pentosas fosfato, se ha descrito que la delección de los genes que codifican G6P DH y 6-fosfogluconato DH contribuye a equilibrar el ratio NADPH/NAD⁺ y, por tanto, produce un incremento de la tasa de crecimiento con xilosa como única fuente de carbono (Jeppsson and Gorwa-grauslund 2002). El equilibrio de cofactores podría reducir así la acumulación de xilitol como subproducto debido a que la enzima XDH requiere NAD⁺ como cofactor (Jeppsson and Gorwa-grauslund 2002) (Fig. 5). Sin embargo, esta situación podría resultar desventajosa para la producción biotecnológica de lípidos a partir de xilosa como fuente de carbono, ya que el incremento de la biosíntesis de lípidos depende de unos niveles de NADPH elevados (Qiao et al. 2017; Silverman et al. 2016). Por tanto, la manipulación de los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato podría resultar de gran importancia para la biosíntesis lipídica (H. Chen et al. 2015; Wasylenko, Ahn, and Stephanopoulos 2015). Se han llevado a cabo otras manipulaciones genéticas para incrementar la producción de NADPH, como la manipulación de la enzima málica en *S. cerevisiae*, que cataliza la formación de NADPH y piruvato a partir de malato y de NADP⁺ (Moreira Dos Santos et al. 2004). Asimismo, la sobreexpresión de los genes que codifican Ru5P epimerasa, Ru5P isomerasa, TKL y TAL conduce a un aumento de la tasa de crecimiento en xilosa (Johansson and Hahn-Hägerdal 2002). En este sentido, se ha descrito que la delección de *PHO13* en *S. cerevisiae* conduce a una mejora del aprovechamiento de xilosa como fuente de carbono principal. Esta mejora en la utilización de xilosa podría deberse a la sobreexpresión de genes de la ruta de las pentosas fosfato, como *GND1* y *ZWF1*, inducida por la delección de *PHO13* (*Pho13*, para-nitrofenil fosfatasa) (Bamba, Hasunuma, and Kondo 2016; S. R. Kim et al. 2015; Van Vleet, Jeffries, and Olsson 2008).

Otros trabajos previos han descrito diferentes manipulaciones de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos para mejorar la producción de lípidos a partir de xilosa. Por ejemplo, en la levadura oleaginosa *Y. lipolytica*, se ha demostrado que la combinación de la expresión heteróloga de la vía oxidorreductasa (XR-XDH) de *S. stipitis* junto a la sobreexpresión de la enzima XK endógena produce un aumento de la acumulación de lípidos a partir de xilosa (Ledesma-Amaro et al. 2016; Li and Alper 2016). En *Rhodospiridium toruloides*, la sobreexpresión simultánea de los genes *ACC1* y *DGA1* produce un aumento del 34% de la producción de lípidos a partir de xilosa como fuente de

carbono (Shuyan Zhang et al. 2016). Asimismo, la optimización de las condiciones de cultivo en *Mortierella isabellina* mejoró la acumulación lipídica hasta alcanzar un 64% de lípidos respecto a la biomasa total (Gao et al. 2013).

3.4. Importancia de los transportadores de hexosas y pentosas en el co-transporte de azúcares

La utilización de pentosas se ve inhibida por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Gancedo 1998). En consecuencia, el uso de mezclas de pentosas/hexosas como fuente de carbono puede verse obstaculizado por mecanismos que afectan a la utilización simultánea de glucosa y xilosa.

La mayoría de los organismos metabolizan azúcares mixtos secuencialmente y muestran preferencia por la glucosa. Esto se conoce como crecimiento diáuxico o bifásico, y está regulado por un mecanismo llamado represión catabólica por carbono (CCR). El mecanismo CCR está controlado por los reguladores *SNF1/MIG1* (Gancedo 1998), y se ve reforzado por la ausencia de transportadores de alta afinidad para los azúcares de pentosa como la xilosa y la arabinosa (Leandro, Fonseca, and Gonçalves 2009). En *S. cerevisiae*, el transporte de pentosas al interior celular se lleva a cabo a través de transportadores de hexosas (Hxt), convirtiéndose en un cuello de botella para la utilización de xilosa (Kwak and Jin 2017). Los transportadores de hexosas Hxt son capaces de realizar esta función gracias a dominios de unión a hexosas y/o pentosas (Young et al. 2014). Sin embargo, a pesar de estos motivos de unión tanto a hexosas como a pentosas, el co-transporte de azúcares se ve dificultado debido a que los transportadores están regulados a nivel de expresión génica y a una mayor afinidad por glucosa.

En este contexto, se han implementado diferentes estrategias para mejorar el transporte de pentosas para aplicaciones biotecnológicas, incluida la sobreexpresión de genes *HXT* nativos y modificados, la sobreexpresión heteróloga de transportadores de xilosa y la adaptación evolutiva de cepas que utilizan xilosa como fuente de carbono (G. Zhang et al. 2015; Li and Alper 2016). En *S. cerevisiae*, la sobreexpresión constitutiva de los transportadores de hexosa Hxt7 y Gal2 resultó en una mejora en el consumo de xilosa en presencia de glucosa (Subtil and Boles 2012). Además, la evolución dirigida de los transportadores de hexosa ha llevado a la identificación de residuos que son importantes para la selectividad del azúcar, como el residuo de arginina N376 de Gal2 en *S. cerevisiae* (Farwick et al. 2014). De hecho, se ha descrito que sustituciones del residuo N376 homólogo en diferentes transportadores mejoran el consumo de xilosa (M. Wang, Yu, and Zhao 2016; Farwick et al. 2014).

Por tanto, el desarrollo de microorganismos capaces de utilizar simultáneamente mezclas de pentosas/hexosas como fuente de carbono, es uno de los principales desafíos para lograr una producción sostenible de metabolitos de alto valor añadido

4. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES

La gran mayoría de los estudios de acumulación de lípidos en microorganismos se basan en el empleo de medios de cultivo con aceites sintéticos o con glucosa como fuente de carbono (Ratledge 2004). Sin embargo, la utilización de residuos industriales como fuente de carbono tiene un gran interés desde el punto de vista medioambiental y económico (G. Zhang et al. 2015). En consecuencia, numerosos estudios se han orientado hacia la valorización de sustratos de bajo costo, tales como hidrolizados lignocelulósicos, glicerol crudo, melazas, aceite de cocina usado y otros residuos orgánicos de origen animal o vegetal (Sarria, Kruyer, and Peralta-Yahya 2017; Ravindran and Jaiswal 2016; Qin et al. 2017).

Las melazas o “mieles finales” son residuos de la cristalización final del azúcar de la industria azucarera. Las melazas son una mezcla muy heterogénea de diferentes componentes que varían en función del origen de las melazas: la caña de azúcar, la remolacha, etc. El componente mayoritario de las melazas es la sacarosa, aunque también se encuentran en diferentes proporciones glucosa, fructosa y compuestos nitrogenados. Las melazas también contienen ácidos orgánicos y fenoles que pueden actuar como inhibidores del crecimiento microbiano (Converti et al. 1988). Las melazas se han empleado en la elaboración de medios de cultivo de microorganismos. Por ejemplo, la levadura *Y. lipolytica* y especies del género *Aspergillus* se han utilizado para producir biolípidos y xilitol, respectivamente, a partir de la fermentación industrial de melazas (Rakicka et al. 2015; Kamat et al. 2013). En *A. gossypii* se ha descrito una enzima invertasa, codificada por el gen *AgSUC2* (*AFR529W*), responsable de la asimilación de sacarosa (Aguiar et al. 2014). Esta enzima invertasa es secretada al medio extracelular y es capaz de hidrolizar la sacarosa de las melazas hasta formar glucosa y fructosa, que son transportadas al interior celular mediante transportadores de hexosas (Aguiar et al. 2014) (Fig. 7). *A. gossypii* es capaz de crecer utilizando melazas como fuente de carbono principal gracias a la actividad de esta enzima invertasa (Lozano-Martínez et al. 2017).

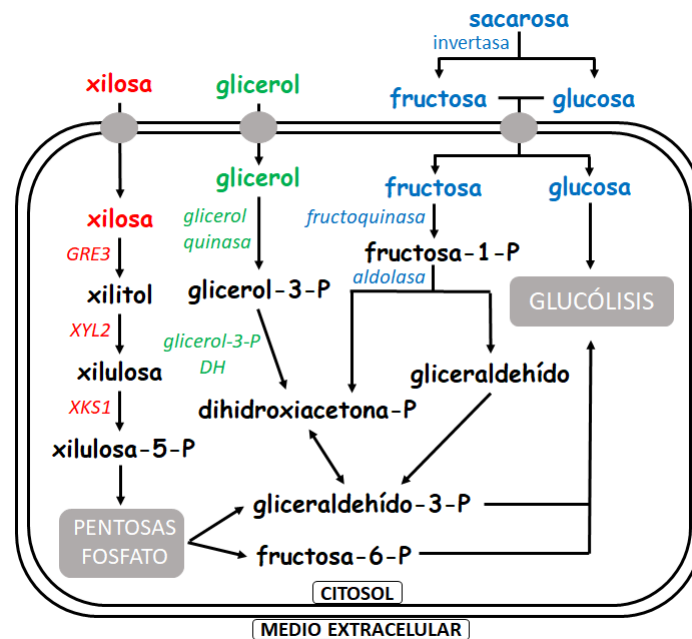


Figura 7. Utilización de los componentes mayoritarios (xilosa, glicerol y sacarosa) de diferentes residuos industriales (hidrolizados lignocelulósicos, glicerol crudo y melazas de cañas de azúcar) como fuentes de carbono en *Ashbya gossypii*. Las proteínas transportadoras están representadas como círculos grises en la membrana de la célula. *GRE3* codifica la xilosa reductasa (XR); *XYL2* codifica la xilitol deshidrogenasa (XDH); *XKS1* codifica la xilulosa quinasa (XK); glicerol-3-P DH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

En una sociedad cada vez más concienciada en la necesidad de evolucionar hacia un modelo energético sostenible, se produce una demanda cada vez mayor de la utilización de combustibles como el biodiesel en detrimento de otros más contaminantes, como los combustibles fósiles. Esta demanda creciente de biodiesel producirá un exceso de glicerol crudo como residuo industrial, ya que en la producción de biodiesel mediante la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales se genera glicerol crudo como subproducto, el cual podría ser utilizado como sustrato para fermentaciones microbianas (G. P. da Silva, Mack, and Contiero 2009). Algunos ejemplos de la bioconversión de glicerol en metabolitos de alto valor añadido son la producción de biolípidos, biosurfactantes, polihidroxicanoatos, pigmentos, etanol, 1,3-propanediol, dihidroxiacetona y ácidos orgánicos como el ácido succínico, propiónico y cítrico (Hao et al. 2015; G. P. da Silva, Mack, and Contiero 2009). En *S. cerevisiae*, la asimilación de glicerol se produce mediante las enzimas glicerol quinasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Fig. 7), generando dihidroxiacetona y NADH (G. P. da Silva, Mack, and Contiero 2009).

Los hidrolizados de residuos lignocelulósicos procedentes de biomasa vegetal son de gran importancia en la industria de biorrefinería lignocelulósica. Esta industria tiene un gran peso en la Unión Europea y puede representar un elemento importante de la futura bioeconomía

europaea (Hassan, Williams, and Jaiswal 2019). Los hidrolizados de residuos lignocelulósicos son ricos en xilanos, donde el 35% de sus componentes son pentosas, fundamentalmente xilosa, que algunos microorganismos son capaces de utilizar como fuente de carbono (Niehus et al. 2018; Parreiras et al. 2014; Sato et al. 2013). Este tipo de residuo industrial es generado en empresas especializadas en la producción de biocombustibles como el bioetanol, lo que provoca un abaratamiento en la utilización de este residuo como fuente de carbono frente a otros sustratos como la glucosa. Un ejemplo de microorganismo capaz de utilizar este residuo industrial como fuente de carbono es *Y. lipolytica*, capaz de producir biolípidos en un medio de cultivo con hidrolizados de residuos de agave como fuente de carbono (Huang et al. 2013; Niehus et al. 2018). También se han descrito cepas de *S. cerevisiae* capaces de producir etanol utilizando hidrolizados de residuos lignocelulósicos como fuente de carbono (R. Chen and Dou 2015; Sato et al. 2013).

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio consiste en la producción de biolípidos en *A. gossypii* mediante el aprovechamiento de residuos industriales, principalmente ricos en xilosa.

Para alcanzar este objetivo se han empleado técnicas de ingeniería metabólica que permiten canalizar el flujo metabólico desde la ruta de asimilación de xilosa hacia la síntesis de lípidos en *A. gossypii*.

Los objetivos específicos de este estudio son los siguientes:

1. Desarrollo de cepas de *A. gossypii* capaces de metabolizar xilosa
2. Caracterización y optimización del transporte de xilosa en *A. gossypii*
3. Redirección del flujo metabólico desde intermediarios del metabolismo de la xilosa hacia la biosíntesis de lípidos en *A. gossypii*
4. Utilización de residuos industriales como fuente de carbono para la producción de biolípidos en *A. gossypii*

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Cepas de *A. gossypii*

Tabla 1. Cepas *A. gossypii* utilizadas en este trabajo:

CEPA	GENOTIPO
A4	Silvestre ATCC 10895 (cepa wild-type, WT)
A625	<i>loxPMKan^R -P_{GPD1} -GRE3</i>
A626	<i>loxPMKan^R -P_{GPD1} -XKS1</i>
A627	<i>loxPMKan^R -P_{GPD1} -XYL2</i>
A630	<i>P_{GPD1} -GRE3</i>
A631	<i>P_{GPD1} -XKS1</i>
A632	<i>P_{GPD1} -XYL2</i>
A637	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -XKS1</i>
A644	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -XYL2</i>
A645	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1</i>
A659	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XYL2</i>
A660	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -XYL2</i>
A665	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 (cepa GXX)</i>
A669	<i>loxPMKan^R -P_{GPD1} -pta::ADR304W</i>
A673	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -pta::ADR304W</i>
A677	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; loxPMKan^R -POX1Δ</i>
A678	<i>P_{GPD1} -pta::ADR304W</i>
A695	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W</i>
A725	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -xpkA::AGL034C</i>
A726	<i>P_{GPD1} -pta::ADR304W ; loxPMKan^R -P_{GPD1} -xpkA::AGL034C</i>
A729	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA::AGL034C</i>
	(cepa GXX-PX)
A731	<i>loxPMKan^R -AFL204CΔ</i>
A732	<i>loxPMKan^R -AFL205CΔ</i>
A733	<i>loxPMKan^R -AFL207CΔ</i>
A734	<i>loxPMKan^R -AFR602WΔ</i>
A735	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; loxPMKan^R -ADR091WΔ</i>
A736	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; loxPMKan^R -AFL204CΔ</i>
A737	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; loxPMKan^R -AFL205CΔ</i>
A738	<i>P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA::AGL034C ; loxPMKan^R -POX1Δ</i>

A739	<i>loxPMKan^R-ADR091WΔ</i>
A740	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-AFR602WΔ</i>
A741	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ</i>
A742	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL204CΔ</i>
A743	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-AFL207CΔ</i>
A745	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; loxPMKan^R-AFL207CΔ</i>
A746	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-AFL205CΔ</i>
A747	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-AFL207CΔ</i>
A748	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-P_{GPD1}-AFL205C</i>
A752	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ</i>
A753	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL204CΔ ; AFL207CΔ</i>
A757	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; loxPMKan^R-AFL204CΔ</i>
A763	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL204CΔ ; AFL207CΔ ; loxPMKan^R-AFR602WΔ</i>
A764	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ</i>
A765	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-AFL205C</i>
A766	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-ADR091WΔ</i>
A772	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-ABR223CΔ</i>
A773	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-AEL042CΔ</i>
A778	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ ; ADR091WΔ</i>
A784	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-MGA2-ΔC-term</i>
A785	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-pta::ADR304W ; P_{GPD1}-xpkA::AGL034C ; loxPMKan^R-MGA2-ΔC-term</i>
A786	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-ABR223CΔ</i>
A788	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; MGA2-ΔC-term</i>
A789	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-pta::ADR304W ; P_{GPD1}-xpkA::AGL034C ; MGA2-ΔC-term</i>
A799	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-AFR602WΔ</i>
A800	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; AFL205CΔ ; AFL207CΔ ; AFL204CΔ ; loxPMKan^R-AEL042CΔ</i>
A805	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-AFL205C*(N355V)</i>
A824	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-AFL205C*(N355V) ; loxPMKan^R-P_{GPD1}-AFL204C</i>
A825	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; P_{GPD1}-AFL205C*(N355V) ; loxPMKan^R-P_{GPD1}-AFL207C</i>
A828	<i>P_{GPD1}-GRE3 ; P_{GPD1}-XKS1 ; P_{GPD1}-XYL2 ; loxPMKan^R-P_{GPD1}-ACC1*(S659A;S1155A)</i>

A829	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA:: Δ AGL034C ; MGA2- Δ C-term ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -ACC1*(S659A;S1155A)
A830	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C*(N355V) ; P_{GPD1} -AFL204C
A831	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C*(N355V) ; P_{GPD1} -AFL207C
A834	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -AFL204C
A835	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -AFL207C
A836	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C*(N355V) ; P_{GPD1} -AFL204C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -AFL207C
A837	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C*(N355V) ; P_{GPD1} -AFL207C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -AFL204C
A839	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C ; P_{GPD1} -AFL204C
A842	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA::AGL034C ; MGA2- Δ C-term ; P_{GPD1} -ACC1*(S659A;S1155A)
A843	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C ; P_{GPD1} -AFL204C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -AFL207C
A844	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C*(N355V) ; P_{GPD1} -AFL207C ; P_{GPD1} -AFL204C
A847	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -AFL205C ; P_{GPD1} -AFL204C ; P_{GPD1} -AFL207C
A862	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA::AGL034C ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -ACC1*(S659A;S1155A)
A863	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; MGA2- Δ C-term ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -ACC1*(S659A;S1155A)
A877	P_{GPD1} -GRE3 ; P_{GPD1} -XKS1 ; P_{GPD1} -XYL2 ; P_{GPD1} -pta::ADR304W ; P_{GPD1} -xpkA::AGL034C ; MGA2- Δ C-term ; P_{GPD1} -ACC1*(S659A;S1155A) ; loxPMKan ^R - P_{GPD1} -DGA1::AFR171W

1.2. Cepas de *E. coli*

Tabla 2. Cepas *E. coli* utilizadas en este trabajo:

CEPA	GENOTIPO
DH5α (Hanahan 1983)	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (F80 <i>lacZ</i> EM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Medios y condiciones de cultivo de *A. gossypii*

Los medios de cultivo líquido de *A. gossypii* fueron ajustados a un pH de 6,8 con NaOH 10N y HCl 10N. Las condiciones de incubación de *A. gossypii* fueron las siguientes: 28-30°C de temperatura con agitación a 200 r.p.m.

Todos los medios sólidos contenían agar al 2%. Cuando se utilizaron como medio de selección se añadió geneticina (G418) o higromicina a una concentración de 50 µg/mL.

Las distintas fuentes de carbono (xilosa, glucosa e hidrolizados lignocelulósicos Corn Cob) se filtraron y añadieron a todos los medios de cultivo previamente autoclavados para evitar la caramelización de la xilosa y la glucosa.

Tabla 3. Medios de cultivo de *A. gossypii* utilizados en este trabajo:

MEDIO	COMPOSICIÓN
MA2 (medio rico)	2 % glucosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MA2 4G	4 % glucosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MA2 8G	8 % glucosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MA2 2OLE	2 % glucosa, 2% ácido oleico ¹ 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 (medio rico)	2 % xilosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 4X	4 % xilosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 8X	8 % xilosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 0.2G	2 % xilosa, 0,2% glucosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 2G	2 % xilosa, 2% glucosa, 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol
MX2 2OLE	2 % xilosa, 2% ácido oleico 2 % bactopectona, 0,2 % extracto de levadura, 0,06 % mio-inositol

SPA (medio esporulación)	1 % glucosa, 0,3 % soytona (soybean meal), 0,3 % extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 2 % corn step liquor
AFM 2X (medio rico)	2 % xilosa, 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol
AFM XG	1 % xilosa, 1% glucosa, 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol
AFM XGOH	1 % xilosa, 1% glicerol, 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol
AFM 100CCh+4M	100 % hidrolizados Corn Cob (CCh) ² , 4% melazas caña azúcar ³ , 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol
AFM 50CCh+4M	50 % hidrolizados Corn Cob (CCh), 4% melazas caña azúcar, 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol
AFM 50CCh+1GOHcr	50 % hidrolizados Corn Cob (CCh), 1% glicerol crudo ⁴ , 1 % triptona, 1 % extracto de levadura, 0,1 % mio-inositol

¹el ácido oleico se somete a sonicación para preparar una emulsión y se añade al medio previamente autoclavado (20% de ácido oleico, 0,5% de Tween 40 y 79,5% de agua estéril)

²los hidrolizados de residuos lignocelulósicos (*Corn Cob*, CCh) fueron preparados como se indica en el apartado “2.1.1. Preparación y detoxificación de hidrolizados de residuos lignocelulósicos” de este trabajo

³las melazas provenientes de la caña de azúcar fueron proporcionadas por “Refinarias de Açucar Reunidas, S.A. (Porto, Portugal)

⁴el glicerol crudo fue preparado como se indica en el apartado “2.1.2 Preparación y detoxificación del glicerol crudo” de este trabajo

2.1.1. Preparación y detoxificación de hidrolizados de residuos lignocelulósicos

El raquis de mazorca de maíz (*Corn cob*) se mezcló con agua en una proporción de líquido/sólido de 8 g/g y se sometió a un tratamiento hidrotérmico en condiciones no isotérmicas (T_{max} de 205°C), siguiendo las condiciones operativas descritas anteriormente (Garrote et al. 2008), en un reactor de acero inoxidable de 2 L de capacidad (*Parr Instruments Company*) equipado con controlador de temperatura *Parr PDI (modelo 4848)*. Después del tratamiento, el líquido de autohidrólisis se recuperó por filtración y se sometió a un tratamiento con ácido diluido al 0,5% p/p de H₂SO₄ durante 165 min a 125°C, como se ha descrito anteriormente (Rivas et al. 2006). El hidrolizado de raquis de mazorca de maíz (CCh) se neutralizó con CaCO₃ hasta pH 5.

Los compuestos inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y compuestos fenólicos) se eliminaron utilizando carbón activado y resinas de intercambio iónico (Cunha et al. 2019). El CCh se mezcló con carbón activado (10 g de hidrolizado / g de carbón activado) durante 60 minutos en agitación para la eliminación de compuestos fenólicos. Después de eso, el hidrolizado se sometió a un tratamiento de resinas de intercambio iónico. El hidrolizado se mezcló con la resina *Amberlite IR-120* (forma H⁺) en una proporción de 10 g de resina / g de hidrolizado durante 60 minutos en agitación. Luego, la resina catiónica se eliminó por filtración y el hidrolizado se mezcló con resina aniónica *Mto-Dowex* (forma OH) en una proporción de 20 g de resina / g de ácido acético.

Finalmente, el pH del CCh detoxificado se ajustó a 6,8 con KOH (5 M) antes de la esterilización por filtración y luego se agregó el CCh a los medios a una concentración final de 100% v/v o 50% v/v.

2.1.2. Preparación y detoxificación del glicerol crudo

El glicerol crudo fue proporcionado por el Centro de Valorización de Residuos (CVR de Guimarães, Portugal) y, antes de su uso, se preparó como se describió anteriormente (Ruhel, Aggarwal, and Choudhury 2011) con ligeras modificaciones. La materia prima se diluyó primero en agua destilada (1:4 v/v) para reducir su viscosidad. Luego, el pH de la mezcla se ajustó a 3 con HCl (6 M) para convertir el jabón en FA libre. Los precipitados formados se separaron de la mezcla por centrifugación a 7000 r.p.m. durante 10 min. A continuación, el pH se ajustó a 12 con KOH (5 M) y la suspensión se filtró para eliminar los residuos suspendidos. Posteriormente, el pH del filtrado se ajustó a 6,8-7,0. Finalmente, el metanol contenido en la solución se eliminó mediante autoclave y la concentración de glicerol se cuantificó por HPLC. Luego se añadió glicerol crudo al medio a una concentración final de 1% p/v.

2.2. Medios y condiciones de cultivo de *E. coli*

Los medios de cultivo líquido de *E. coli* se realizaron a 37°C con agitación a 200 r.p.m. y fueron ajustados a un pH de 7,2 con NaOH 10N y HCl 10N. Todos los medios sólidos contenían un 1,5% de agar.

La composición del medio de cultivo LB para *E. coli* es la siguiente: 0,5% de extracto de levadura, 1 % de triptona y 1% de NaCl. Cuando se empleó como medio de selección se añadió ampicilina (100 µg/L), kanamicina (50 µg/L), higromicina (100 µg/L) o espectinomomicina (100 µg/L).

3. OLIGONUCLEÓTIDOS Y VECTORES

3.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por biomers.net (Ulm, Alemania) y por Invitrogen (Thermo Fisher Scientific):

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo:

PRIMER	SECUENCIA	FUNCIÓN
<i>loxPMK-P_{GPD}-GRE3-fw</i>	5'-GGC GCT TTC GAA TAC CCT ATT TGC TTT GCA TTC CCC TTC TAG AGC ATG TTC ATG CAC GGC TGA CCG TGT CAA CCT GCT GAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	GRE3 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-GRE3-rv</i>	5'-ACC ATT GCG ATG TCC TGG CCT GTA ATG CAC CTT GAT AAA TCT GGT GGT GTT CCA CGC ATA TAC AAC TGC TTA TAT ACC ATT GTG CGG TGT GTA TGT GTG G-3'	GRE3 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-XYL2-fw</i>	5'-GGT TGC ACT TGG CAT ATG CCG AAG CGT CAT CTA CAA ACA CCG GCG TAT TTA GCA CAC TGT CAC ACT AGC ATC AAT AAG TAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	XYL2 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-XYL2-rv</i>	5'-ATA ACT GGG ACG GGC CTG TGT TCA TAC ACT ATA GCC CCC TTC TCG CGG AGG ACA ACC GCC TGC TGC ATA CTT GAT GAC ATT GTG CGG TGT GTA TGT GTG G-3'	XYL2 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-XKS1-fw</i>	5'-TAG GCA GTG CCG CCG CGA CCA CCA AAG ATT TAT AGT GCA GTA TGT AAT TCA CTC GGT ATA AAA TTA AGG AGA TGC CAG GGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	XKS1 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-XKS1-rv</i>	5'-GCC AGG TCC TCG ATG GCA AGG CAC TTC AAC TGT TGC GTT GAC AGA TCG AAC CCC AAG TAC AGC TTG CTT TCC GCC ATT GTG CGG TGT GTA TGT GTG G-3'	XKS1 sobrexpresión
<i>(GATG)-pta-fw</i>	5'-TTT GGT CTC GGA TGG CAG ATT TAT TTT CAA CAG TGC A-3'	pta sobrexpresión
<i>(TAGT)-pta-rv</i>	5'-TTT GGT CTC TAC AGT GCT TGC GCC GCT-3'	pta sobrexpresión
<i>(GATG)-xpkA-fw</i>	5'-TTT GGT CTC AGA TGC CGC GGG AAG TGA TT-3'	xpkA sobrexpresión
<i>(CTAA)-xpkA-rv</i>	5'-TTT GGT CTC ATT AGT TAA ACG ACG GCA TGT TAT AGG- 3'	xpkA sobrexpresión
<i>POX1Δ-fw</i>	5'-GGC AGC TAG CGG TGG CTA TAA AGA GCG GGA AAA AGC AGA GCG TAG CAG CAG CCA AGG ATC GAC AAG ATG CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3'	POX1 delección
<i>POX1Δ-rv</i>	5'-GTA ATA TCA GCG AGC AGA GAT AGA CTC AAC TAC TTG CCA AGG TTC TTG AAG GAG GTC TCG CTG ATG TTC AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC-3'	POX1 delección
<i>GRE3-a</i>	5'-ACA TAC TGC GTG TCC GTG TT-3'	PCR analítica
<i>XYL2-a</i>	5'-ATT GCC AGT ACG CTC AGG AC-3'	PCR analítica
<i>XKS1-a</i>	5'-GAA CCC AAT GTA CCC TGC CA-3'	PCR analítica
<i>AGL034C-a</i>	5'-CAG CTC ATC ACA ACG CTT ATC CA-3'	PCR analítica
<i>ADR304W-a</i>	5'-TGT CGG TGC TCA AGA CAG AC-3'	PCR analítica
<i>POX1-a3</i>	5'-GCC CGG GTA ACC AAA CCT TA-3'	PCR analítica
<i>KanB1</i>	5'-CTG CAG CGA GGA GCC GTA AT-3'	PCR analítica
<i>MGA2-ΔC-term-fw</i>	5'-CTT TAC AAC AAA TCA TCG TCG GGA TGA CAG GAT GTA CAA GCT CTA TTT CGA TGA GAT GAT GGA CGT GCT GGA TGC AGC GTG ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA-3'	MGA2- Δ C-term delección
<i>MGA2-ΔC-term-rv</i>	5'-TTG TCA TTT GTA TAT ATA CAT TGA AGC ATA AGC AAA GGT GGT TGT AAA GAG CAA AGT GTA AAA ATC ACG ATA AGG TAT CAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	MGA2- Δ C-term delección
<i>MGA2-ΔC-term-a</i>	5'-TCT GGT CAC TGT CAC AAG CC-3'	PCR analítica
<i>loxPMK-P_{GPD}-ACC1-fw</i>	5'-ATC TTT CTC CAG CGA ACG CCA CTA TAT CGC CTG ACC TGG CCA GTG ATC AGA CGG ACA CGG GAG CCT TTG CGA GTA CTT ACA CTA GTG AAA AGA CTG AGA ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA-3'	ACC1 sobrexpresión
<i>loxPMK-P_{GPD}-ACC1-rv</i>	5'-CGA TGA AGT GAG GCG CTA GCC GGG CGT GCT TGG CCG AGT AGT CTG TGA ACT CGT ACC GTT TCT GTG ACT CCA TGG CCT CTG TAA AAC TCC CTT CGC TCA TTG TGC GGT GTG TAT GTG TGG-3'	ACC1 sobrexpresión

<i>ACC1-flank5'-fw</i>	5'-CCG GCC GCC ATG GCG GCC GCG GGA ATT CGA TGT GTG ATG CCT TAT ACC G-3'	PCR amplificación
<i>ACC1-flank3'-rv</i>	5'-CGG CCG CGA ATT CAC TAG TGA TGT AAT GCG TCT GAT TGC TGA A-3'	PCR amplificación
<i>ACC1-S1155A-fw</i>	5'-ACA GAG CTA TTG CCA TCT CAG ATT TGA CAT ACG-3'	PCR mutación puntual
<i>ACC1-S1155A-rv</i>	5'-ATC TGA GAT GGC AAT AGC TCT GTT CAC ACC CAG-3'	PCR mutación puntual
<i>ACC1-S659A-fw</i>	5'-AAG TTG GTC TTC GGA AAT TGG CAG ATG GCG GGC TAT TGA T-3'	PCR mutación puntual
<i>ACC1-S659A-rv</i>	5'-ATC AAT AGC CCG CCA TCT GCC AAT TTC CGA AGA CCA ACT T-3'	PCR mutación puntual
<i>ACC1-S659A-ver-fw</i>	5'-AGG CAG GCA TCG AGG AAA CAC A-3'	PCR analítica
<i>ACC1-S659A-ver-rv</i>	5'-GCA GGA CAC CGC TCT CCT GG-3'	PCR analítica
<i>ACC1-S1155A-ver-fw</i>	5'-TCA GTT GGA ATC CAA AGC AAC-3'	PCR analítica
<i>ACC1-S1155A-ver-rv</i>	5'-GTA ATG CGT CTG ATT GCT GAA-3'	PCR analítica
<i>GATG-DGA1-fw</i>	5'-TTT TGG TCT CAG ATG CAG GAC AGC ATG GAT GA-3'	DGA1 sobreexpresión
<i>TAGT-DGA1-rv</i>	5'-AAA AGG TCT CAA CTA CTC TAC TAT TTT AAG TTC CTT CCC-3'	DGA1 sobreexpresión
<i>AFR171W-a</i>	5'-GAT CGC TAC GAA GAC GAG AG-3'	PCR analítica
<i>AGL347C-a</i>	5'-GCG CCT ACT ACA CAC TCT TAG TAC-3'	PCR analítica
<i>ADR091WΔ-fw</i>	5'-TAG AAA CCA ATA GAA TAC AGG TAA TAT ATT GAA AAT ATC ATA ACT GCA AGG CTT TCT AAG GTG TGA AAC CCA TTC CAA TGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	ADR091W delección
<i>ADR091WΔ-rv</i>	5'-CCT TGG AGG CTC CAC GGT CAC ATG ACT TGG TGA AGT TCG CAG AGT AAA GTA TAT AAC GTG CGG AAA GAC AGT AGA GTC TAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	ADR091W delección
<i>AFR602WΔ-fw</i>	5'-TCC AGC CGC GTC ACG CCA ATT CTC AGA AAG GCG CTC TAT CGC TGC GCA GAA TCA ACG TTC AGA TAA CGG CGG GGG ATA TGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	AFR602W delección
<i>AFR602WΔ-rv</i>	5'-AGT AAT TTA TTA GGG ACA TGA ACC GTA GTT CAG CAT AAG TAT ATT CTA GTG GTA TTA TCT ACC GGG CAT TAT CAT TAT TAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	AFR602W delección
<i>AFL204CΔ-fw</i>	5'-ATG ACA AGT ATC GTT ATC ACC TCA CCC ATT TCA GGT AGA CCG ACT ATT TGA GAC TGC TGT GGG AAA AAC ACG TTC AAA TGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	AFL204C delección
<i>AFL204CΔ-rv</i>	5'-GAT ATG CAA GCG GTT GAC CCA GCA GCT GAC GGT CAC CCC ACA CCT CTG CAT ACC TTT CTG CAC AAG GCA TGC AGT TAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	AFL204C delección
<i>AFL205CΔ-fw</i>	5'-GTT ATA ATA AAC CAT CGT TCA GAA TAT TTG CCG TTA AGA CTT CCA TTG AGG AAT AAT AAC TAA TAC TTG TCG GTA CAA TGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	AFL205C delección
<i>AFL205CΔ-rv</i>	5'-AAT ATT AAT GAA CAT AGA TTA GGT TTA GGT TTT AAC CCG ATG ATT AGC AGA ACA AAA AAG TTT GTA GTT TAA AGT TTT TAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	AFL205C delección
<i>AFL207CΔ-fw</i>	5'-CCA ACT GTT CAC CGG TCA TCA GTT TGC AGT GTC GAG GAA ACT GTT TCT ATC ATA TTT TAG ACG CAG TCG CCT TCT CAA TGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	AFL207C delección
<i>AFL207CΔ-rv</i>	5'-GAA CAG ACC GTC TGC TAC TAG GCC GAA AGG GTA AAG CAG TTG TCA GTC AGT ACT TGC TGT TGC TTA TGG AAT GCC TGT CAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3'	AFL207C delección
<i>loxPMK-PGPD-AFL204C-fw</i>	5'-TTC GTA AAA TAA TCA AAT TTT TAT AAA AGT CGA AGA CGA CCG TTG GTC TCG TAA ATG ACA AGT ATC GTT ATC ACC TCA CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3'	AFL204C sobreexpresión
<i>loxPMK-PGPD-AFL204C-rv</i>	5'-TTG CTC TCA ATG GGA TGC GAA TTC GAA CCA TCT CCC GAG AGC TCG CTT TTA GAC GGC GTC ATA CCT TCA GAA ACG GTC ATT GTG CGG TGT GTA TGT GTG G-3'	AFL204C sobreexpresión
<i>loxPMK-PGPD-AFL205C-fw</i>	5'-AAG AGT ATA TAA GGA CAG CCT CGA CAC GCT TTC GTA GAT CTG ATA TGT TTA ATG TTA TAA TAA ACC ATC GTT CAG AAT ATC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A-3'	AFL205C sobreexpresión
<i>loxPMK-PGPD-AFL205C-rv</i>	5'-TTC GAA GGC TTG TTC GAT GCT GTA GAC GAA TGT GTG CTC ATC ACG GAG CGG TTG TCA GGT TGT GCA ATT GCT GCA GAC ATT GTG CGG TGT GTA TGT GTG G-3'	AFL205C sobreexpresión
<i>loxPMK-PGPD-AFL207C-fw</i>	5'-AAC CTA ACA ACA TCT ACA GTA TAT AAG GAT AGA TGA GAT AGA TTA ACC CTC TTT CCA ACT GTT CAC CGG TCA TCA GTT CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3'	AFL207C sobreexpresión
<i>loxPMK-PGPD-AFL207C-rv</i>	5'-CAA ATA CTT CTT TTG CGA TGC CGC GGA TAC CTC TGT ACC CAC GGA CCG CAT ATC ACT GTG TAA AAC CTG ACG GCT CAT TGT GCG GTG TGT ATG TGT GG-3'	AFL207C sobreexpresión
<i>AFL205C(N355V)ver-fw</i>	5'-TCG TTC CAG AGT CTC CTC GT-3'	PCR analítica

<i>AFL205C(N355V)ver-rv</i>	5'-CCC CGT TAG GCC ACA ACT TA-3'	PCR analítica
<i>ADR091W-a</i>	5'-TTA CGC CAC TAG TCC CTC CA-3'	PCR analítica
<i>AFR602W-a</i>	5'-TTT GCC GAT GGA TAG GGC TC-3'	PCR analítica
<i>AFL204C-a</i>	5'-GTA TCG GCC CCT CAC TTA GC-3'	PCR analítica
<i>AFL205C-a</i>	5'-CGT GAT GGC AGT ATA GCG GT-3'	PCR analítica
<i>AFL207C-a</i>	5'-GCT TCT GTG TTC CCT CGT GA-3'	PCR analítica
<i>GRE3-RT-fw</i>	5'-GGC TCG GGT GCT GGA AGA TT-3'	GRE3 qRT-PCR
<i>GRE3-RT-rv</i>	5'-CAG CGG GAA GTG GAT GTA GAA C-3'	GRE3 qRT-PCR
<i>XYL2-RT-fw</i>	5'-TCG GGC TGG GCT GCT TTT AGT-3'	XYL2 qRT-PCR
<i>XYL2-RT-rv</i>	5'-AGC GTG CCC TCC AGT GTC AGA TA-3'	XYL2 qRT-PCR
<i>XKS1-RT-fw</i>	5'-ACA CAG GCC CGT CCC AGT TA-3'	XKS1 qRT-PCR
<i>XKS1-RT-rv</i>	5'-GCA TCT CGC GAC ACA GGT TG-3'	XKS1 qRT-PCR
<i>pta-RT-fw</i>	5'-CCC GGC TCT TCA AAT CAT CAA AA-3'	pta qRT-PCR
<i>pta-RT-rv</i>	5'-AAT TCG CCG TCA AGT GTC AGT TCA-3'	pta qRT-PCR
<i>xpkA-RT-fw</i>	5'-GCA CGC CGA AAG GTT GGA GT-3'	xpkA qRT-PCR
<i>xpkA-RT-rv</i>	5'-CAC GGT ATG CGG GTT TTT CAC A-3'	xpkA qRT-PCR
<i>ADR091W-RT-fw</i>	5'-GCA TGG AAC CGG CGT ATC AAA-3'	ADR091W qRT-PCR
<i>ADR091W-RT-rv</i>	5'-GTG CCT GCT GCG GGA GTA GAA T-3'	ADR091W qRT-PCR
<i>AFR602W-RT-fw</i>	5'-GAT TGG GTT TAC CGT TCT TCT CT-3'	AFR602W qRT-PCR
<i>AFR602W-RT-rv</i>	5'-AGG CAT CTT CAA TAC CCA CAA ATC-3'	AFR602W qRT-PCR
<i>AFL204C-RT-fw</i>	5'-CTA CCC AAG GCC CGG ATG TCT AT-3'	AFL204C qRT-PCR
<i>AFL204C-RT-rv</i>	5'-TCT GCC AAA TTT GTC AAC GGT GTA-3'	AFL204C qRT-PCR
<i>AFL205C-RT-fw</i>	5'-CAG CGT GTT ATT ATG GGT GTT ATG-3'	AFL205C qRT-PCR
<i>AFL205C-RT-rv</i>	5'-AGT CGC GAA GCA GAA AAT GTA GAT-3'	AFL205C qRT-PCR
<i>AFL207C-RT-fw</i>	5'-GGG CCC CAA TTG CGT ATG TCA-3'	AFL207C qRT-PCR
<i>AFL207C-RT-rv</i>	5'-TAT GCC GGC AGC TTG TTT GTC ACT-3'	AFL207C qRT-PCR
<i>UBC6-fw</i>	5'-CAA CGA TAC TGA CTG GGC TGC TAA-3'	UBC6 qRT-PCR
<i>UBC6-rv</i>	5'-GGC GCG TAT CCT ATC CTC TGG-3'	UBC6 qRT-PCR
<i>ACT1-fw</i>	5'-TTT CGC CGG TGA CGA CGC TC-3'	ACT1 qRT-PCR
<i>ACT1-rv</i>	5'-CGT GTG GCA ACG AGA AAC CAG C-3'	ACT1 qRT-PCR

3.2. Vectores y plásmidos

pGEM-Teasy (Promega): Es un vector de 3 kb empleado para la clonación de fragmentos de DNA que han sido amplificados por PCR con polimerasas que añaden un desoxinucleótido de adenina a los extremos 5'. Este vector contiene un desoxinucleótido de timina en los extremos 3' de cada cadena. Contiene el origen de replicación del fago filamentoso *f1*, el gen de resistencia a ampicilina (Sigma) y los promotores de la RNA polimerasa de los fagos *T7* y *SP6* flanqueando una región de clonación múltiple que se encuentra en la secuencia codificante de la enzima β -galactosidasa

pBlueScript II SK⁺ (Stratagene): plásmido autorreplicativo de 2,9 kb para la clonación de fragmentos de DNA de extremos romos funcional en bacteria. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (Sigma), el origen de replicación *ColE1* y un fragmento del operón *lac* de *E. coli* que codifica la enzima β -galactosidasa. También contiene una secuencia de clonación múltiple con 21 sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que permite la selección de clones recombinantes por α -complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección *lacZ M15*.

JR3014: deriva del plásmido pJR1742, que a su vez deriva del vector pBlueScript II SK⁺. Contiene el marcador Hyg^R y el gen que codifica para la recombinasa Cre.

JR3651: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el promotor del *AgGPD1* (GGTC-*P_{GPD}*-GATG)

JR3652: vector de destino con dos sitios de corte para *SapI* (ACAC-*SapI*-CTTG) y el marcador de resistencia a espectinomicina (Sigma)

JR3657: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el terminador *PGK1_t* (TAGT-*PGK1_t*-ACGC)

JR3681: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el módulo *loxP-KanMX-loxP*

JR3684: vector de destino JR3652 que contiene el módulo *loxP-KanMX-loxP-P_{GPD}*

JR3686: plásmido que contiene el marcador de selección *loxP-KanMX-loxP* (ATCA-*loxPKS*-GGTC). El marcador KanMX está compuesto por la secuencia codificante del gen que confiere resistencia a kanamicina del transposón bacteriano Tn903. Las secuencias *loxP* están constituidas por dos secuencias repetidas e invertidas de 8 pares de bases (ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT). Estas secuencias son reconocidas por la recombinasa Cre

JR3719: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 3' para la inserción del gen de interés en el locus *ADR304W* (ACGC-*ADR304W-R*-CTTG)

JR3720: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 5' para la inserción del gen de interés en el locus *ADR304W* (ACGC-*ADR304W-L*-CTTG)

JR3747: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 5' para la inserción del gen de interés en el locus *AGL034C* (ACGC-*AGL034C-L-CTTG*)

JR3748: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 3' para la inserción del gen de interés en el locus *AGL034C* (ACGC-*AGL034C-R-CTTG*)

JR3760: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 3' para la inserción del gen de interés en el locus *AGL347C* (ACGC-*AGL347C-R-CTTG*)

JR3776: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 5' para la inserción del gen de interés en el locus *AGL347C* (ACGC-*AGL347C-L-CTTG*)

JR3779: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 3' para la inserción del gen de interés en el locus *AFR171W* (ACGC-*AFR171W-R-CTTG*)

JR3780: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 5' para la inserción del gen de interés en el locus *AFR171W* (ACGC-*AFR171W-L-CTTG*)

JR3862: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el terminador *ENO2_t* (*CTAA-PGK1_t-CTTG*)

JR3882: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el gen sintético *pta* de *Bacillus subtilis* flanqueado por sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *BsaI*

JR3888: plásmido pMPA (Nielsen) que contiene el gen de resistencia a ampicilina (Sigma) y el gen sintético *xpkA* de *Aspergillus nidulans*

JR3892: vector de destino JR3652 con dos flancos para la inserción en el locus *ADR304W*, el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias *loxP*, el promotor *P_{GPD}* de *A. gossypii*, el gen sintético *pta* de *Bacillus subtilis* y el terminador *PGK1_t* de *A. gossypii*.

JR3960: vector de destino JR3652 con dos flancos para la inserción en el locus *AGL034C*, el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias *loxP*, el promotor *P_{GPD}* de *A. gossypii*, el gen *xpkA* de *Aspergillus nidulans* y el terminador *ENO2_t* de *A. gossypii*

JR3986: plásmido pCRISPR-22 que contiene el gen que codifica para la nucleasa Cas9, genes de resistencia a ampicilina (Sigma) y a geneticina/kanamicina (G418), orígenes de replicación pUC ori de *E. coli* y 2 μ origin de *S. cerevisiae*, y el promotor P_{SNR52} del gen *SNR52* de *A. gossypii*

JR3991: proviene del vector comercial pBlueScript II SK⁺ y contiene el fragmento sintético de DNA gAFL205C-V

JR3992: proviene del pCRISPR-22 y contiene el fragmento sintético gAFL205C-V para realizar la modificación N355V en el locus *AFL205C* mediante la técnica *CRISPR-Cas9*

JR4017: proviene del vector pBlueScript II SK⁺ y contiene el gen *AgACC1* de *A. gossypii* con las mutaciones S659A y S1155A introducidas mediante PCR inversa. Este gen está flanqueado por sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *NotI*.

JR4021: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 3' para la inserción del gen de interés en el locus *AgPOX1* (ACGC-*AgPOX1-R-CTTG*)

JR4022: proviene del vector comercial pGEM-Teasy y contiene el flanco 5' para la inserción del gen de interés en el locus *AgPOX1* (ACAC- *AgPOX1-L-ATCA*)

JR4039: proviene del vector comercial pBlueScript II SK⁺ y contiene el fragmento sintético de DNA gAFL205C-F

JR4083: proviene del vector comercial pBlueScript II SK⁺ y contiene el gen *AgDGA1* de *A. gossypii* flanqueado por sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *BsaI*

JR4084: vector de destino JR3652 con dos flancos para la inserción en el locus *AgPOX1*, el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias *loxP*, el promotor P_{GPD} de *A. gossypii*, el gen *AgDGA1* de *A. gossypii* y el terminador $PGK1_t$ de *A. gossypii*.

JR4094: vector de destino JR3652 con dos flancos para la inserción en el locus *AFR171W*, el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias *loxP*, el promotor P_{GPD} de *A. gossypii*, el gen *AgDGA1* de *A. gossypii* y el terminador $PGK1_t$ de *A. gossypii*.

JR4095: vector de destino JR3652 con dos flancos para la inserción en el locus *AGL347C*, el marcador *KanMX* flanqueado por las secuencias *loxP*, el promotor P_{GPD} de *A. gossypii*, el gen *AgDGA1* de *A. gossypii* y el terminador $PGK1_t$ de *A. gossypii*.

4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

4.1. Obtención de esporas de *A. gossypii*

El micelio se siembra en placas de medio de esporulación (SPA) y se incuba a 28°C durante 2-3 días. El micelio se recoge con espátula estéril y se transfiere a un matraz Erlenmeyer. Las esporas se liberan del micelio por tratamiento con solución acuosa de Zymolyase (Zymolyase-20T Seikagaku Kogyo), en concentración 1 mg/mL, utilizando unos 10 mL por placa Petri. La muestra se incuba a 37°C con agitación (200 r.p.m.) durante 30-60 minutos. Las esporas en suspensión se recogen por centrifugación a 4400 r.p.m. y se lavan 2-3 veces con Tritón X-100 al 0,03 %. Se resuspenden en medio rico líquido (MA2) y se guardan a 4°C hasta su utilización o a -80°C en glicerol al 25 % para su conservación.

4.2. Transformación de esporas de *A. gossypii*

Se inoculan 100 mL de medio rico líquido (MA2) con 500 µL de esporas (10^6 esporas/mL). Se incuba durante 12-13 horas a 28 °C en agitación a 200 r.p.m. Las esporas germinadas se recogen por filtración en vacío. Se resuspenden en 20 mL de solución al 5% de tampón fosfato potásico (1 M pH 7.5), 2.5 % de DTT y 92.5 % de agua estéril. Se incuban en esta disolución a 28°C durante 30 minutos en agitación a 200 r.p.m. A continuación, se recogen por centrifugación a 12000 r.p.m. Se lavan 2 veces con tampón STM (270 mM de sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl₂) y se recogen por centrifugación a 12000 r.p.m. Se resuspenden en 1 mL de esa misma solución. Se dispensan en cubetas de electroporación 0,4 cm³ (Bio-Rad) unos 180-200 µL de esporas, y se añade el DNA (15-20 µL). La muestra se somete a electroporación a 1500 V, 200 W y 25 mF en un electroporador Gene-Pulser (Bio-Rad). Se recoge la muestra de la cubeta, resuspendiendo en 1 mL de MA2 líquido y se centrifuga a 12000 r.p.m. durante 1-2 minutos. A continuación, se elimina el sobrenadante y las esporas se resuspenden en 200 µL de MA2 líquido. Finalmente, se siembra en medio rico sólido (MA2). Tras 5-6 horas de regeneración a 28°C se añade la cobertera, que consiste en 5 mL de solución acuosa de agarosa fundida al 0,4 % que contiene el antibiótico de selección a la concentración adecuada. Se dejan a 28°C durante 2-3 días para obtener transformantes.

A partir de la transformación de esporas de *A. gossypii*, se obtienen transformantes primarios heterocariontes. Para obtener y aislar los transformantes secundarios homocariontes se crecen los heterocariontes en MA2 sólido con el antibiótico de selección. Una vez crecidos, se pasan a medio de esporulación SPA sólido con el mismo antibiótico de selección. Ahora se preparan esporas de nuevo y se siembran en MA2 con dicho antibiótico, de donde ya podremos aislar las colonias de homocariontes. Para comprobar

que la nueva cepa de *A. gossypii* se ha transformado correctamente se realiza una PCR analítica y después una secuenciación del fragmento amplificado.

4.3. Transformación de células de *E. coli*

Las células competentes DH5 α (ThermoFisher Scientific) se almacenan a -80°C en glicerol al 25% hasta su utilización. A continuación, se mezclan 100 μ L de células competentes DH5 α descongeladas en hielo con 5-10 μ L de DNA. Se incuba 20 minutos en hielo, se da un choque térmico a 42°C durante 2 minutos y se incuba de nuevo en hielo otros 2 minutos. Después, se añaden 400 μ L de medio líquido LB y se incuba la mezcla a 37°C con agitación durante 50 minutos. La mezcla de transformación se recoge por centrifugación a 13300 r.p.m. y se siembra en el medio de selección adecuado (LB con antibiótico).

4.4. Curva de crecimiento de *A. gossypii*

La curva de crecimiento de *A. gossypii* se realizó en distintos medios de cultivo líquidos a 28°C y en agitación a 200 r.p.m. Dichos cultivos pueden iniciarse a partir de esporas a una concentración de 10⁶ esporas/mL o de micelio parcialmente lisado con enzimas líticas. Se recogen 5-20 mL de micelio por muestra por filtración en vacío. Los filtros Whatmann no.1 previamente tarados se dejan secar durante 24 horas a 65°C y se pesan en una balanza analítica.

Complementario a este método, se puede realizar una curva de crecimiento basada en la cuantificación de la biomasa mediante la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀). Se recogen 100-500 μ L de muestra y se mide la absorbancia de la misma a 600 nm realizando las diluciones que sean necesarias. Con los datos de ambos métodos, se puede extrapolar la cantidad de biomasa en más puntos de los que se podrían obtener sólo con el peso seco, además de obtener datos inmediatos de la biomasa de cultivo durante la realización del experimento.

5. MANIPULACIÓN DEL DNA Y EL RNA

5.1. Obtención del DNA plasmídico de *E. coli*

Se empleó el kit comercial “Prep Plasmid DNA Extraction Mini Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Favorgen).

5.2. Obtención del DNA genómico de *A. gossypii*

Se inocula un matraz de 50 mL de medio líquido MA2 con 1 cm² de micelio de una placa Petri y se incuba a 28°C y a 200 rpm durante 24 horas. Transcurrido el periodo de cultivo, se recoge todo el micelio de *A. gossypii* por filtración en vacío. Se lava con H₂O destilada y se resuspende en 15 mL de una solución 1 M sorbitol, 20 mM EDTA y 20 mg Zymolyase (Zymolyase-20T Seikagaku Kogyo). A continuación, se incuba a 37°C hasta la formación de protoplastos a partir del micelio durante 30-60 minutos. Posteriormente, se añaden 5 mL de una solución 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA y 0,5 % SDS, y se incuba 20 minutos a 65°C para inactivar la DNAsa. La muestra se extrae dos veces con fenol-cloroformo y se precipitan los ácidos nucleicos por la adición de 1 mL de etanol 80%. Ahora, el etanol es desechado y el precipitado se resuspende en 150 µL de H₂O destilada y es tratado con RNasa (2 mg/mL) durante 15 minutos a 37°C para la eliminación del RNA de la muestra. Por último, el DNA se precipita añadiendo un volumen de AcNa 0,3 M pH 7 y 0,6 volúmenes de isopropanol. Se lava con 1 mL de etanol al 80%, se seca y se resuspende en 50-100 µL de H₂O destilada.

5.3. Digestión enzimática y ligación

Las diferentes enzimas de restricción que se emplearon en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Fermentas, Promega, New England Biolabs y ThermoFisher Scientific se utilizaron de acuerdo a las especificaciones dadas por los diferentes proveedores. La ligación entre fragmentos de DNA con extremos compatibles se realizó con la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Además, en el caso de la ligación de extremos romos se añadió PEG 4000 al 50% que favorece la cohesión de los mismos. El vector con el fragmento DNA de interés se seleccionó por transformación de células competentes de *E. coli DH5α* con la mezcla de ligación y su posterior selección en medio rico sólido (LB) con el antibiótico correspondiente.

5.4. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se realiza en geles de 0,8-2% de agarosa con bromuro de etidio en tampón TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA) sometidos a un voltaje constante de 125 V. Las distintas bandas de DNA se observan sobre un transiluminador de luz ultravioleta (254 nm) acoplado a un sistema de fotografía digital Gel Doc 2000 Bio-Rad.

5.5. Purificación de un fragmento de DNA en gel de agarosa

El fragmento de interés se recorta del gel de agarosa con un bisturí tras ser identificado con luz ultravioleta (360 nm). El DNA se purifica con el kit GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen).

5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las amplificaciones de DNA se utilizaron las polimerasas Expand High Fidelity PCR System (Roche), Dreamtaq Master Mix (Thermo Scientific), GO-taq Master Mix (Fermentas), o Phusion® (Thermo Scientific). En todos los casos se prepararon las reacciones de acuerdo a las especificaciones de los proveedores.

Para las polimerasas Dreamtaq Master Mix y Go-taq Master Mix se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación dividida en tres etapas: desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, amplificación de 30 ciclos de repetición y elongación de 72°C durante 10 minutos. Estos 30 ciclos de amplificación incluyen 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento de los primers (depende de la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos) y un minuto por kb a sintetizar a 72°C de tiempo de extensión en cada ciclo. Respecto a las otras dos polimerasas de alta fidelidad el proceso de amplificación es el siguiente: desnaturalización a 98°C durante 1 minuto, una amplificación también de 30 ciclos y una elongación también a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de los 30 ciclos de amplificación también varían respecto a las otras dos polimerasas, siendo una primera etapa a 98°C durante 10 segundos, 30 segundos de amplificación a la temperatura de anillamiento de los primers como segunda etapa, y por último, una tercera etapa a 72°C con 30 segundos de tiempo de extensión por kb a sintetizar. Cuando el tamaño de los oligonucleótidos excedía las 20 pb, la temperatura de anillamiento era 3°C superior a la T_m del oligonucleótido con menor temperatura de fusión.

La integración genómica de los módulos de transformación se verificó mediante PCR analítica. Esta PCR analítica incluye un paso previo de lisis celular y desnaturalización del DNA sometiendo una parte del micelio de *A. gossypii* diluida en buffer de reacción (Universal Extraction Buffer, Yeastern Biotech Co.) a 100 °C durante 10 minutos. Este DNA genómico será utilizado como molde en dicha PCR analítica. El primer 5' anilla en el DNA genómico próximo al locus donde se ha integrado el módulo de sobreexpresión; si el módulo de sobreexpresión no se inserta en el locus adecuado, no se obtiene producto PCR (Fig. 8).

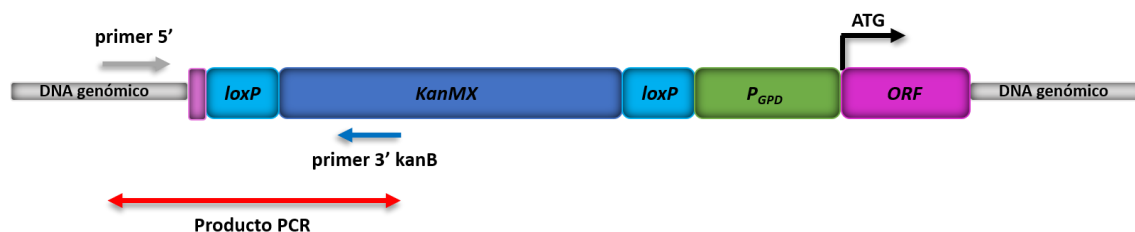


Figura 8. Estrategia empleada en las PCR analíticas de *A. gossypii*. La obtención de producto PCR (flecha en rojo) con los primers adecuados (flechas en azul y gris) indica que el transformante ha insertado el módulo de sobreexpresión *loxP-KanMX-loxP-P_{GPD1}-ORF* en el locus adecuado.

5.7. Purificación de un fragmento de DNA procedente de una PCR

El producto de la reacción de PCR se purifica con el kit GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen).

5.8. Secuenciación de DNA

Todas las muestras fueron secuenciadas en el Servicio Nucleus de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 314, Edificio Departamental. Salamanca, España. Email: serv.sadn@usal.es) mediante el método de Sanger en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) y el kit “ABI PRISMR BigDye™ Primer v.30 Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaqR DNA Polymerase, FS” (Applied Biosystems).

5.9. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

5.9.1. Obtención de RNA de *A. gossypii*

Se inoculan 100 μ L de esporas (10^6 esporas/mL) de *A. gossypii* en un matraz con 50 mL de medio rico líquido (MA2) y se incuba a 28°C en agitación a 200 r.p.m. durante 24-48 horas. Transcurrido el tiempo de cultivo el micelio se recoge por filtración en vacío y se conserva a -80 °C. A continuación, el micelio previamente congelado con N₂ líquido, se pulveriza con un mortero y se resuspende en 1 mL de TRIzol® Reagen (Invitrogen) y es tratado según las especificaciones dadas por el proveedor. El RNA obtenido se puede conservar a -80 °C hasta que se necesite, momento en el cual el RNA se trata con 20 μ L de DNasa I libre de RNasas (Roche). El RNA se precipita de nuevo y se cuantifica con un espectrofotómetro a 260 nm.

5.9.2. Síntesis de DNA copia (cDNA)

Se utiliza 1 µg del RNA purificado y libre de DNA obtenido anteriormente. Se sintetiza el cDNA a partir de este RNA en una reacción de transcripción reversa empleando el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche). La reacción se realizó utilizando el cebador olido-dT (18 mer) contenido en el kit y siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.9.3. Q-RT-PCR

Para la PCR cuantitativa a tiempo real se empleó 1 µL de cDNA (1 µg/µL) sintetizado de cada una de las muestras a analizar y se amplificó en un termociclador LightCycler® 480 System (Roche) usando oligonucleótidos específicos para los genes diana a una concentración final de 0.5 µM cada uno. Para la amplificación se utilizó el kit “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” (Roche) de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor. La reacción se realizó en placas de PCR de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White (Roche).

Las condiciones empleadas para la amplificación fueron las siguientes: activación de la DNA polimerasa durante 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos (95 °C durante 10 segundos, T_m de los oligonucleótidos (en nuestro caso, 50 °C) durante 20 segundos, 72° C durante 25 segundos), un ciclo (95 °C durante 5 segundos, T_m + 10 °C durante 1 minuto, 97 °C) y, por último, una incubación a 40 °C durante 10 segundos.

La cuantificación de transcrito se determinó de acuerdo al ciclo (Ct) en el que la señal de fluorescencia se comienza a incrementar de manera exponencial, por encima de la señal de fluorescencia de fondo. Los niveles de mRNA de cada gen fueron normalizados frente al gen *AgACT1* o el gen *AgUBC6* de la misma muestra mediante el método del incremento $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{AgACT1/AgUBC6}}$. Para realizar la cuantificación relativa de cada muestra frente a la muestra control, después de la normalización de cada muestra, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$. A partir de estos valores, se calculó la media y la desviación estándar.

5.10. Sistema de clonación Golden Gate

El sistema de clonación Golden Gate consiste en la unión de dos o más fragmentos, procedentes cada uno de un plásmido, y su clonación posterior en un vector de destino (Engler et al. 2009). Cada fragmento de DNA cuenta en sus extremos con una diana de restricción para la enzima tipo II *BsaI*. Esta enzima corta fuera de la secuencia de

reconocimiento GGTCTC, dejando extremos cohesivos de cuatro nucleótidos. Esto permite la introducción de la diana de *Bsal* en el diseño de los oligonucleótidos, además de la introducción de una secuencia determinada de cuatro nucleótidos donde corta la enzima. Esta secuencia será complementaria a la secuencia del fragmento al que se quiere unir, de manera que al ligarse estos dos fragmentos se elimina la diana de restricción. El orden de unión de los distintos fragmentos se determina en el diseño de los oligonucleótidos por medio de la secuencia de cuatro nucleótidos complementaria que se añade a la diana de restricción. En consecuencia, el ensamblaje de los módulos solo puede ocurrir en un orden y orientación controlados en un vector de destino que contiene un marcador de resistencia a la espectinomicina (Sigma-Aldrich) y extremos adhesivos compatibles de 4 nt flanqueados por sitios de reconocimiento de *SapI*.

Los distintos fragmentos se amplifican por PCR con oligonucleótidos específicos que contienen una diana para *Bsal* en los extremos y las secuencias de cuatro nucleótidos específicos para que los extremos de los fragmentos sean cohesivos. Estos fragmentos de DNA amplificados se clonan en el vector pGEM-Teasy (Promega) o en el vector pBlueScript II SK⁺ (Stratagene). El vector de destino es el JR3652, que contiene dianas de restricción para *Bsal*. Este plásmido se obtuvo mediante la amplificación por PCR del fragmento *lacZ* empleando los oligonucleótidos C12B-fw y C12B-rv, que contienen en los extremos 5' dianas de restricción para *Bsal*, y su ligación al vector pDGB\C12B mediante el sistema de clonación In-Fusion (Clontech Laboratories, Inc.) (Fig. 9).

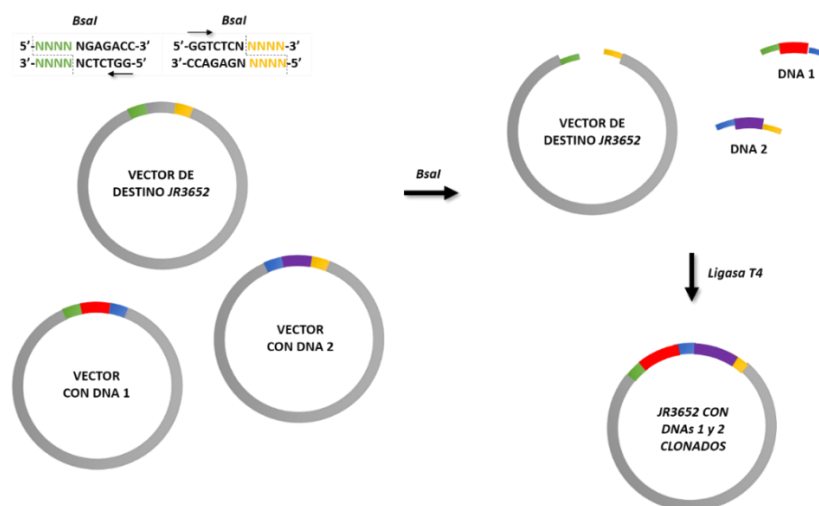


Figura 9. Sistema de clonación Golden Gate. En esta representación esquemática, los DNAs 1 y 2 se encuentran ya ensamblados en sus respectivos vectores, previamente habrían sido amplificados por PCR con oligonucleótidos específicos que contienen una diana para *Bsal* en los extremos y las secuencias de cuatro nucleótidos específicos (NNNN) para que los extremos de los fragmentos sean cohesivos. La digestión de los vectores con la enzima de restricción tipo II *Bsal* y la ligación de los fragmentos al vector de destino con la ligasa *T4* se realizan simultáneamente en una misma reacción

En un tubo eppendorf de 0,2 mL se añaden: 100 ng del vector de destino previamente digerido con *Bsa*I; cantidades equimolares de cada uno de los plásmidos que contienen los fragmentos de DNA a clonar; 1X buffer T4 DNA ligasa, 1 μ L *Bsa*I (New England Biolabs Inc), 0,75 μ L ligasa NEB T4 2000000 u/mL; y agua hasta volumen final de 20 μ L. La reacción se lleva a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: 35-50 ciclos de 37°C durante 3 min y 16°C durante 4 min, y un ciclo de 50°C durante 5 min y 80°C durante 5 min. Por último, 10-20 μ L del producto obtenido se transforma en *E. coli Dh5a* y se seleccionan los transformantes en medio rico sólido (LB) con espectinomina y kanamicina (Fluka). Una vez comprobado que el plásmido contiene los fragmentos requeridos mediante digestión con distintas enzimas de restricción, se digiere con la enzima *Sap*I y se procede a la transformación de esporas de *A. gossypii*.

5.11. Sistema de clonación NEbuilder

El sistema de clonación NEBuilder (New England Biolabs) consiste en la unión en un solo paso de dos o más fragmentos procedentes cada uno de diferentes reacciones de PCR y su clonación en un vector para la posterior transformación de *E. coli*. El orden de unión de los distintos fragmentos se determina en el diseño de los oligonucleótidos por medio de la secuencia de nucleótidos complementaria entre fragmentos adyacentes. Este método mejora la eficacia y la precisión del sistema Gibson Assembly (New England Biolabs) utilizando los mismos principios para la unión de varios fragmentos de DNA. Con respecto a la metodología Golden Gate, la principal diferencia es que este sistema permite la unión de secuencias de DNA que se solapan más largas que las que se utilizan con el sistema Golden Gate.

Los distintos fragmentos de DNA se amplifican por PCR con oligonucleótidos diseñados para añadir la secuencia de nucleótidos específicos para que los fragmentos sean cohesivos. El Master Mix de NEBuilderR High-Fidelity contiene varias enzimas que actúan conjuntamente: una exonucleasa que facilita la unión de los fragmentos que comparten secuencias complementarias mediante el corte del extremo 5' dejando saliente el extremo 3' de DNA de cadena simple, una DNA ligasa que une los distintos fragmentos y una DNA polimerasa que rellena los huecos entre los fragmentos ligados.

En un tubo eppendorf de 0,2 mL se añaden: cantidades equimolares de cada uno de los fragmentos de DNA amplificados por PCR: 100 ng del vector pGEM-Teasy (Promega), 4 μ L de NEBuilderR High-Fidelity Master Mix y agua hasta volumen final de 50 μ L. La reacción se lleva a cabo en un termociclador durante un ciclo de 90 min a 50°C. Con un volumen de 10-20 μ L del producto obtenido se transforma *E. coli Dh5a* y se seleccionan los

transformantes en medio rico sólido (LB) con ampicilina (Sigma) y kanamicina (Fluka). El plásmido resultante es digerido con la enzima de restricción *NotI* y utilizado para transformar esporas de *A. gossypii*.

6. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y MÓDULOS PARA LA TRANSFORMACIÓN DE *Ashbya gossypii*

A. gossypii es un microorganismo fácilmente modificable genéticamente con un producto de PCR, puesto que la recombinación homóloga de fragmentos de DNA en su genoma es altamente efectiva (J Wendland et al. 2000). Tanto las deleciones como las sobreexpresiones de los distintos genes diana se realizaron utilizando un producto de PCR o la fusión de varios productos de PCR mediante el sistema de clonación NEbuilder. Los fragmentos para la expresión de genes heterólogos se prepararon utilizando la metodología Golden Gate a partir de la fusión de varios fragmentos contenidos en varios plásmidos y la amplificación del vector final en *E. coli*.

6.1. Módulos para la sobreexpresión génica

La sobreexpresión de genes endógenos en *A. gossypii* se lleva a cabo mediante la sustitución de los promotores endógenos por un promotor constitutivo fuerte como, por ejemplo, el promotor del gen *AgGPD1* que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. El módulo de sobreexpresión empleado consta de un marcador de selección de resistencia a G418 (*loxP-KanMX-loxP*), la secuencia del promotor P_{GPD1} y secuencias recombinogénicas del sitio de integración. La integración genómica del módulo de sobreexpresión (*loxP-KanMX-loxP-P_{GPD1}*) en los sitios diana se produce gracias a la presencia de las secuencias recombinogénicas flanqueantes (40-100pb). Estas secuencias se añaden a los módulos de sobreexpresión mediante la amplificación del módulo *loxP-KanMX-loxP-P_{GPD1}* contenido en el vector JR3684 empleando oligonucleótidos específicos para cada gen (Fig. 10). Mientras que el marcador *loxP-KanMX-loxP* permitirá la selección de los transformantes en el antibiótico geneticina (G418), la presencia de secuencias *loxP* flanqueando este marcador de selección permitirá la eliminación de dicho marcador por la acción de la recombinasa *Cre* (Güldener et al. 1996) (figura eliminación del marcador de resistencia).

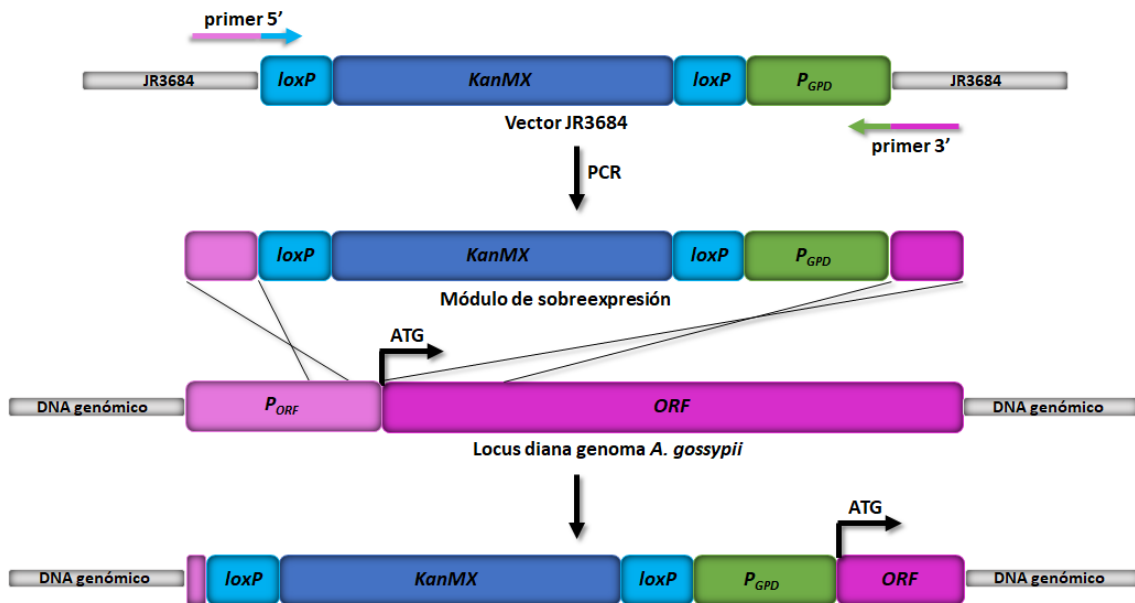


Figura 10. Sobreexpresión de genes endógenos en *A. gossypii* mediante la sustitución de los promotores endógenos por el promotor constitutivo fuerte *P_{GPD}*. El módulo de sobreexpresión empleado consta de un marcador de selección de resistencia a G418 (*loxP-KanMX-loxP*)

6.2. Módulos para la delección génica

La delección de genes endógenos en *A. gossypii* se lleva a cabo mediante la sustitución completa del ORF diana por el módulo *loxP-KanMX-loxP* contenido en el vector JR3681. La integración genómica de este módulo de delección (*loxP-KanMX-loxP*) en los sitios diana se produce gracias a la presencia de las secuencias recombinogénicas flanqueantes (40-100pb). Este módulo se amplifica empleando oligonucleótidos específicos para cada gen que contienen dichas secuencias recombinogénicas (Fig. 11). Al igual que en el módulo de sobreexpresión la presencia del marcador *loxP-KanMX-loxP* permitirá la selección de los transformantes en el antibiótico geneticina (G418). Las secuencias *loxP* flanqueando este marcador de selección permitirán la eliminación de dicho marcador por la acción de la recombinasa *Cre* (Güldener et al. 1996) (Fig. 12).

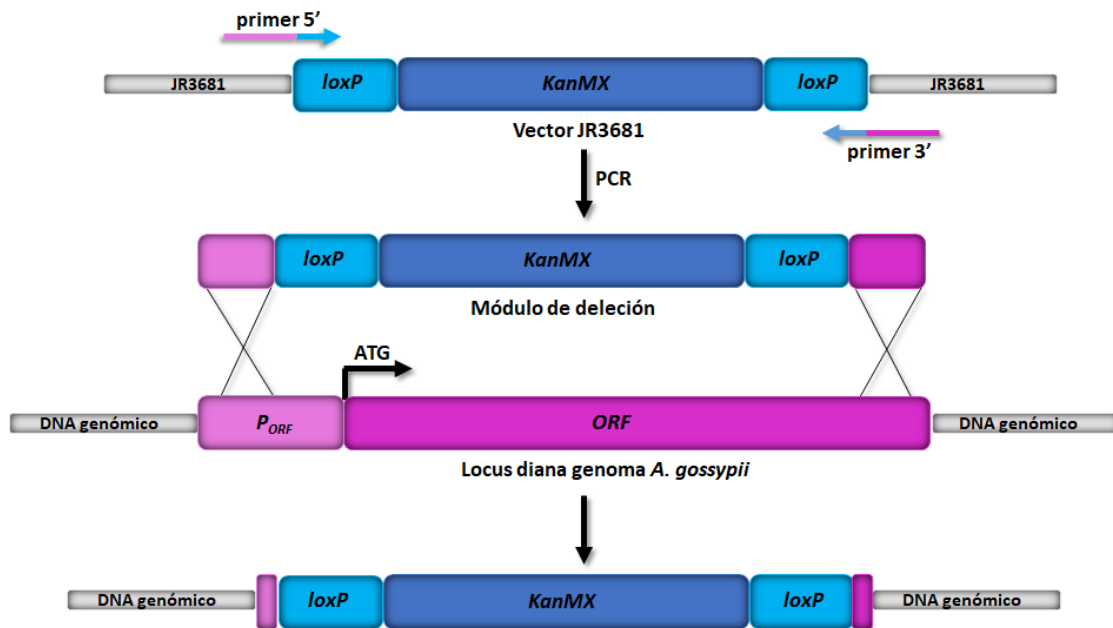


Figura 11. Deleción de genes endógenos en *A. gossypii* mediante la sustitución completa del ORF diana por el módulo *loxP-KanMX-loxP* contenido en el vector JR3681. La integración genómica de este módulo de deleción (*loxP-KanMX-loxP*) en los sitios diana se produce gracias a la presencia de las secuencias recombinogénicas flanqueantes

6.3. Módulos para la expresión de genes heterólogos

Los distintos módulos de expresión heteróloga de genes utilizados en este estudio se construyeron utilizando el método Golden Gate descrito anteriormente. Se utilizaron vectores previamente construidos con el DNA flanqueado por dianas de restricción para la enzima *BsaI*. Estos plásmidos contienen distintos módulos: el *loxP-KanMX-loxP*, el promotor P_{GPD} , el gen de interés que queremos introducir en el genoma de *A. gossypii*, el terminador $PGK1/ENO2_t$ y dos fragmentos de DNA homólogos a la región del genoma donde se insertará el módulo.

Los genes que se expresaron de forma heteróloga en *A. gossypii* en este trabajo fueron *pta* de *Bacillus subtilis* en el locus *ADR304W* que se corresponde al gen *STE12* de *A. gossypii*, *xpkA* de *Aspergillus nidulans* en el locus *AGL034C*, una copia adicional del gen endógeno *AgDGA1* de *A. gossypii* en el locus *AFR171W* y el *gxf1* de *Candida intermedia* en distintos locus (*AFR171W* y *AGL347C*) (Fig. 12). La interrupción de estos genes no afecta al crecimiento de *A. gossypii* (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014b; 2014a).

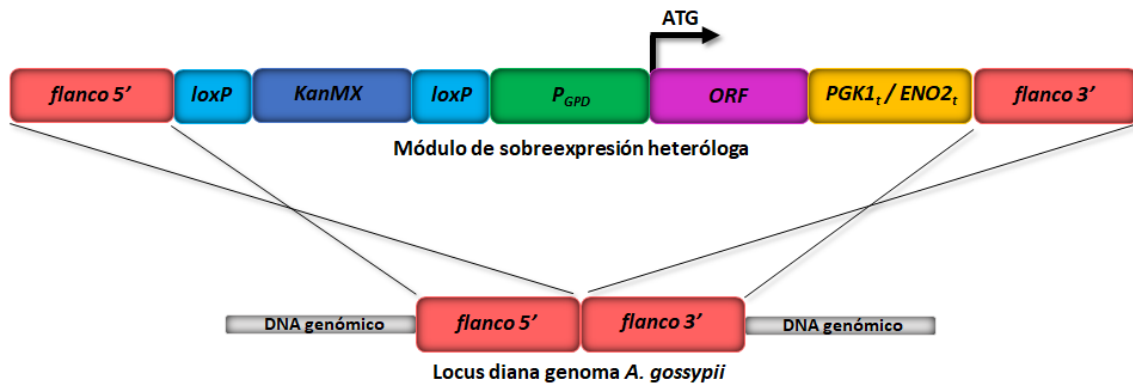


Figura 12. Integración genómica a través de las secuencias recombinogénicas flanqueantes de módulos de sobreexpresión de genes heterólogos construidos mediante el método Golden Gate. Este módulo se obtiene previa digestión del vector de destino JR3652 con la enzima de restricción *SapI*

Los vectores utilizados para la construcción de estos módulos están descritos en la sección 3.2. del apartado Materiales y Métodos de este trabajo. Los codones de todos los genes introducidos de manera heteróloga en el genoma de *A. gossypii* fueron optimizados según el código genético de este hongo filamentoso. Todos los genes sintéticos provienen de GenScript.

6.4. Eliminación del marcador de resistencia al antibiótico de selección

Se sigue el mismo proceso de transformación descrito anteriormente. El DNA con el que transformamos a *A. gossypii* es el plásmido JR3014, que contiene el gen que codifica para la recombinasa *Cre* y el gen que otorga resistencia a higromicina, un antibiótico de selección para aislar los transformantes que contengan dicho plásmido. La recombinasa *Cre* escinde el gen de resistencia al antibiótico de selección con el que hayamos transformado al hongo, en este caso, geneticina. El marcador *loxP-KanMX-loxP* se escinde gracias a las secuencias *loxP* que lo flanquean. La recombinasa *Cre* corta en estos sitios *loxP* y forma un “loop” con el gen *Kan^R*. Únicamente permanece uno de los sitios *loxP* en el DNA insertado en el hongo, perdiéndose así la resistencia a geneticina (Güldener et al. 1996). También se pierde la resistencia a higromicina debido a la poca estabilidad de los plásmidos en *A. gossypii*, que acaban desapareciendo al cabo de unas cuantas divisiones.

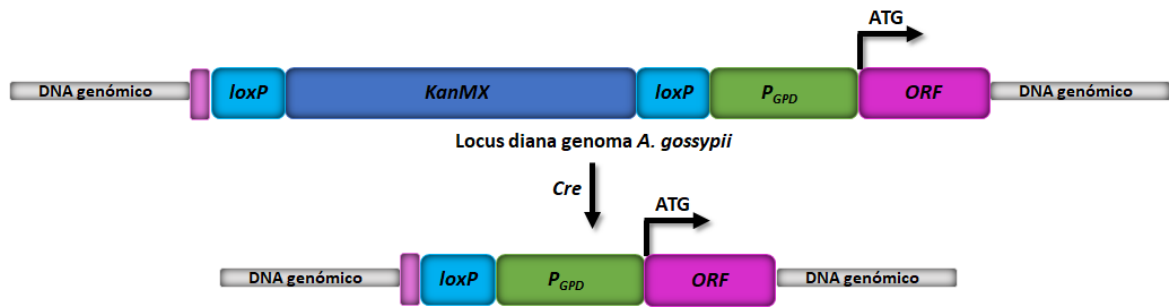


Figura 13. Eliminación del marcador de selección. La recombinasa *Cre* corta en los sitios *loxP* y escinde el gen que otorga resistencia al antibiótico de selección kanamicina (*loxP-KanMX-loxP*). En su lugar sólo permanece una de las secuencias *loxP*. El promotor P_{GPD1} permanece intacto en el genoma de *A. gossypii*.

Una vez seleccionados y aislados los homocariotes puros, se comprueba que hayan perdido tanto el marcador de resistencia a geneticina como a higromicina. Para ello los transformantes homocariotes se siembran en medios MA2, MA2 + geneticina y MA2 + higromicina (Fig. 14). De esta manera se pueden introducir nuevas transformaciones en una misma cepa, obteniendo así cepas de *A. gossypii* con sobreexpresiones y/o deleciones simultáneas de varios genes.



Figura 14. Comprobación de la eliminación del marcador de resistencia al antibiótico de selección en *A. gossypii*. Medios de cultivo rico sólido (MA2) con y sin los antibióticos geneticina (G418) e higromicina para comprobar que cepas de *A. gossypii* hayan perdido la resistencia a ambos antibióticos. Aquellas cepas que únicamente sean capaces de crecer en medio MA2 sin antibiótico habrán perdido la resistencia a ambos antibióticos y podrán ser nuevamente transformadas

6.5. Técnica CRISPR/Cas9 para la edición genómica en *A. gossypii*

La modificación del genoma de *A. gossypii* mediante la técnica CRISPR/Cas9 a partir de un solo vector (JR3986) ha sido descrita anteriormente por nuestro grupo de investigación (Jiménez et al. 2019). En un sistema CRISPR/Cas9, un RNA guía (gRNA) dirige la endonucleasa Cas9 a loci genómicos específicos para producir roturas de doble cadena (DSB) (Brouns et al. 2008). Hay dos vías para reparar DSB en el DNA: recombinación homóloga (HR) y unión final no homóloga (NHEJ). El sistema CRISPR/Cas9 se basa en la capacidad de reparar un DSB dirigido con un DNA donante sintético por HR (Raschmanová et al. 2018). A este respecto, en contraste con otros hongos filamentosos, la integración de DNA exógeno homólogo por HR es muy frecuente en *A. gossypii* (Steiner et al. 1995). Como se mencionó anteriormente, el sistema CRISPR/Cas9 comprende una endonucleasa de DNA guiada por RNA (Cas9) y un RNA guía (gRNA), que es complementario a la región objetivo genómica (Jinek et al. 2012). La nucleasa Cas9 requiere un motivo adyacente protospacer 50-NGG-30 (PAM) para generar un DSB en el objetivo genómico. Para formar el complejo catalítico activo con Cas9 (Jinek et al. 2012), se requiere un RNA de direccionamiento CRISPR (crRNA) y un crRNA transactivador (tracrRNA). El crRNA y el tracrRNA se pueden unir en un RNA guía sintético (sgRNA) que puede unirse y guiar a la Cas9 (Jinek et al. 2012). Por lo tanto, el sgRNA comprende una secuencia estructural para la unión de Cas9 y una secuencia variable de 20 pb para que coincida con la secuencia diana genómica. Además, debe proporcionarse un DNA donante (dDNA) que contenga el objetivo genómico diseñado con flancos de homología para la reparación de DSB mediante HR (Raschmanová et al. 2018; Jinek et al. 2012).

En este proyecto el sistema CRISPR/Cas9 se utilizó para introducir una modificación puntual en el gen *AFL205C* de *A. gossypii*. Se obtuvo así una cepa de *A. gossypii* en la que se mutaron dos adeninas (A) a una guanina (G) y una timina (T), lo que se traduce en el cambio de la asparagina (N) 355 en una valina (V). La técnica CRISPR/Cas9 se llevó a cabo mediante la transformación de esporas de *A. gossypii* con el plásmido JR3992, que proviene de la modificación del vector JR3986 (Jiménez et al. 2019). Este plásmido contiene la secuencia mutante específica para el gen *AFL205C*, introduciéndose así la modificación puntual. Además, también se modificó el sitio PAM en el mismo proceso, evitando así que la nucleasa Cas9 continuase modificando indefinidamente ese lugar concreto del genoma, ya que dicho sitio PAM es necesario para la unión de la nucleasa Cas9 al DNA.

Los transformantes heterocarióticos se seleccionaron en medios MA2 que contienen geneticina (G418). Los clones resistentes a G418 se aislaron y se cultivaron en medio

G418-MA2 durante 2 días. A continuación, se logró la pérdida del vector CRISPR/Cas9 durante la esporulación de los clones heterocarióticos en medios SPA que carecen de G418. Los clones homocarióticos se aislaron en medios MA2 que carecían de G418. La pérdida del plásmido CRISPR/Cas9 se confirmó en medios G418-MA2. El cribado de las mutaciones CRISPR/Cas9 se realizó mediante PCR analítica. Las ediciones genómicas fueron confirmadas por secuenciación de DNA.

7. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

7.1. Extracción de lípidos de la biomasa para análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)

La extracción de lípidos de las distintas cepas de *A. gossypii* se realizó a partir de distintos medios de cultivo líquidos. Dichos cultivos fueron iniciados a partir de preinóculos con esporas (10^6 esporas/mL) o con micelio lisado crecido en medio rico sólido, durante 24 horas de incubación a 28°C a 200 rpm. Una vez iniciados los cultivos se recogieron distintas muestras durante los 3-9 días de duración de dichos experimentos. Los 1-5 mL de micelio recogido por filtración o centrifugación se secaron por liofilización (la muestra congelada a -80 °C se sometió a una presión de vacío que elimina el agua por sublimación). Se partió de una biomasa liofilizada de 10 mg, que se resuspendió en 1 ml de una solución al 97,5% de metanol y 2,5% de ácido sulfúrico. Después, se incubó el vial con el micelio liofilizado a 80°C durante 1,5 horas para una transesterificación de los triglicéridos de la muestra con el metanol de la solución en presencia del catalizador ácido. Esta reacción fue necesaria para la posterior detección de los ésteres metílicos de ácidos grasos en el cromatógrafo de gases. Dicha reacción se detuvo por la adición de 1 mL de una solución 1M de NaCl. Se añadieron 0,5 mL de una solución de hexano, se agitó vigorosamente la mezcla y se centrifugó 5 minutos a 2500 r.p.m. Se obtienen así distintas fases, donde la superior se corresponde con la fase lipídica disuelta en hexano. La solución de hexano contiene un patrón interno consistente en 50 µg/mL de heptadecanoato (ácido margárico C17:0), que es un ácido graso saturado no presente en *A. gossypii*. Este ácido graso se puede utilizar metilado para que no sea necesaria la transesterificación, pero también podría utilizarse sin metilar. En este último caso, se añade la disolución de hexano con el patrón interno antes de que tenga lugar la reacción de transesterificación y pudiendo así calcular la eficiencia de dicha reacción. Se analizó una muestra extra, la cual consta únicamente de 100 µL de disolución de hexano con el patrón interno. Dicha muestra extra nos permitió conocer el rendimiento de la extracción.

Una vez extraída la fase lipídica disuelta en hexano se deshidrató completamente dicha fase con Na_2SO_4 anhidro, se filtró con embudo alemán y se depositó en viales de vidrio adecuados para el posterior análisis.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos disueltos en hexano se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS, *Servicio de Espectrometría de Masas, USAL*). El análisis se llevó a cabo utilizando el cromatógrafo de gases *Shimadzu GC17* y el espectrómetro de masas *Shimadzu QP5000*. Se utilizó una columna *DB-5* (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 25 μm de película). Las condiciones para el análisis fueron las siguientes: se utilizó helio con un flujo de 1,3 mL/minuto como gas portador, con un Split-ratio 60:1. La temperatura del inyector fue de 270°C y la temperatura de la interfase 290 °C. El horno siguió el siguiente programa: temperatura inicial de 90°C durante 5 minutos, una rampa de 12°C/minuto hasta 190°C, y una rampa de 4°C/minuto hasta 290°C. Los ácidos grasos se identificaron por comparación con los ésteres metílicos de ácidos grasos de una muestra estándar comercial (*FAME32; Supelco*) y la cuantificación total de ácidos grasos se realizó siguiendo el método del patrón estándar interno utilizando 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido heptadecanoico C17:0 (*Sigma*).

Durante la colaboración de nuestro grupo con el grupo de investigación de la Dra. Lucília Domingues en la Universidad do Minho en Braga (Portugal) los extractos lipídicos se analizaron por un cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas diferente. El análisis se realizó mediante el GC-MS Scion SQ™ 436 (Bruker), utilizando una columna SLB-IL 100 de (Supelco, 30 m de largo 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de película). Para el análisis se utilizó helio con un flujo de 1 mL/min como gas portador. Se inyectó 1 μL de muestra automáticamente siguiendo el siguiente programa de Split-ratio: Split-ratio inicial de 1:20 durante 0,01 min, el cual se apagó durante 0,49 min, para a continuación iniciar un Split-ratio de 1:100 durante 0,5 min, y, por último, se pasó a un Split-ratio de 1:20 indefinidamente. La temperatura del inyector fue de 250°C y la de la interfase de 200°C. El horno siguió el siguiente programa: temperatura inicial de 90°C durante 5 min, rampa de 12°C/min hasta 190°C y rampa de 4°C/min hasta 230°C. La detección del espectrómetro de masas fue desde 50 hasta 500 Da. Los ácidos grasos se identificaron por comparación con los ésteres metílicos de ácidos grasos de una muestra estándar comercial (*FAME32; Supelco*) y la cuantificación total de ácidos grasos se realizó siguiendo el método del patrón estándar interno utilizando 50 μg de ácido heptadecanoico C17:0 (*Sigma*).

7.2. Extracción de lípidos de la biomasa para análisis cuantitativo gravimétrico

Las muestras se recogieron a partir de cultivos líquidos de la misma manera que en el caso del análisis por GC-MS. En este caso se partió de una biomasa liofilizada de 10-20 mg. A continuación, se realizó una extracción con cloroformo/metanol, aplicando una modificación del método de Folch (Schneiter and Daum 2006; Folch, Lees, and Stanley 1987).

Se añadieron 2,5 mL de metanol y 2,5 mL de cloroformo y se mezclaron dando vórtex vigorosamente. Posteriormente, se añadió 1 mL de una solución salina de 1M NaCl y se mezcló de nuevo. Se realizaron un mínimo de tres extracciones más con 1mL de cloroformo en cada extracción, añadiendo 0,1 mL de solución salina sólo en el caso de que no se produzca separación de fases. Se añade NaCl para favorecer la separación de fases y la protonación de los lípidos que pudieran estar desprotonados para forzarlos a pasar a la fase orgánica (Folch, Lees, and Stanley 1987).

Una vez se obtuvo la fase inferior con los lípidos disueltos en cloroformo mediante un embudo de decantación, se añadió Na₂SO₄ anhidro para deshidratar complemente la fase orgánica. Por último, se filtró con algodón en embudo alemán y se evaporó en rotavapor en tubos previamente tarados. Una vez completamente evaporado el cloroformo, se pesó el contenido lipídico total.

7.3. Extracción de lípidos del medio extracelular para análisis por GC-MS

El análisis de lípidos secretados al medio de cultivo se realizó mediante una extracción con cloroformo/metanol partiendo de 5 mL cultivo. Se filtran para separar el micelio del sobrenadante y se añaden 5 mL de metanol, otros 5 mL de cloroformo y se agita vigorosamente dando vortex. Se centrifuga durante 5 minutos a 2500 r.p.m. y se recoge la fase orgánica inferior donde se encuentran los lípidos disueltos en cloroformo. Se evapora mediante rotavapor dicha fase orgánica y a continuación se transesterifican los ácidos grasos extraídos del medio de cultivo tal y como se describe en el apartado “Extracción de lípidos de la biomasa para análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)”.

8. ANÁLISIS DE DISTINTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

El análisis del consumo y/o producción de glucosa, xilosa, xilitol y etanol en las distintas cepas de *A. gossypii* se realizó en distintos medios de cultivo líquidos. Dichos cultivos

fueron iniciados a partir de esporas (10^6 esporas/mL) o con micelio lisado crecido en medio rico sólido. Se recogieron distintas muestras cada 12 horas durante los 3-9 días de duración de dichos experimentos. Cada muestra fue sometida a filtración y/o centrifugación para separar el sobrenadante de la biomasa del cultivo. Con la biomasa recogida se obtuvieron datos del crecimiento del cultivo y/o se cuantificaron los lípidos producidos, mientras que el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación del consumo y/o producción de dichos metabolitos.

La glucosa, la xilosa, el xilitol y el etanol fueron analizados con un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (*Waters Alliance 2795 High*) equipado con una columna *REZEX ROA Organic acid H⁺ (8%)* de 25 cm de largo y 4,6 mm de diámetro interno. Dicha columna se encuentra acoplada a un detector RI (*Waters 410*). La fase móvil fue de 0,005N H₂SO₄ y el caudal de 0,6 mL/seg a 50°C de temperatura. Todas las muestras se filtraron con filtros de 0,45 µm y se inyectaron 25 µL de cada muestra.

El sistema HPLC durante nuestra colaboración en el grupo de investigación de Lucília Domingues en la Universidad do Minho en Braga (Portugal) fue utilizado para la determinación de xilosa, xilitol, glucosa, fructosa, sacarosa y glicerol. La xilosa, el xilitol y el glicerol se cuantificaron utilizando un detector de índice de refracción (*Jasco Aminex HPLC-87 (BioRad, EEUU)*). Se eluyeron con una velocidad de flujo de 0,005 M H₂SO₄ de 0,6 mL/min a 60°C. La sacarosa, la xilosa, la glucosa y la fructosa se cuantificaron utilizando un detector de índice de refracción (*Jasco*) y una columna *Prevail Carbohydrate ES*. Se utilizó una fase de acetonitrilo: agua (75:25 v/v) bombeada a 0,9 mL/min como fase móvil a 30°C.

9. DETECCIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se utilizó la microscopía de fluorescencia para la correcta visualización de los cuerpos lipídicos en las hifas de *A. gossypii*. Dichos cuerpos lipídicos se tiñieron con *Bodipy* (Invitrogen) o *Nile Red* (Sigma). Ambos se prepararon en una disolución de etanol a una concentración de 1 mg/mL.

El micelio de *A. gossypii* se recogió por filtración y se lavó con agua estéril varias veces. Una vez el micelio se encuentra resuspendido en agua, se añade 1 µL de *Bodipy* o *Nile Red* por cada 100 µL de micelio disuelto en agua. Finalmente se procede a la detección de los cuerpos lipídicos mediante un microscopio de fluorescencia con objetivos desde 4x a 100x.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados recogidos en los apartados 1 y 3 han sido publicados en el artículo Díaz-Fernández et al. 2017 (se incluye copia en el Apéndice).

Los resultados recogidos en el apartado 2 forman parte de un manuscrito enviado a revisión en la revista Journal of Biotechnology, “Characterization of sugar transport for xylose utilization in *Ashbya gossypii*”: JBIOTEC-D-20-00540.

Los resultados recogidos en los apartados 4 y 5 han sido publicados en el artículo (se incluye copia en el Apéndice).

1. INGENIERÍA METABÓLICA PARA EL APROVECHAMIENTO DE XILOSA EN *Ashbya gossypii*

A. gossypii no puede usar xilosa como única fuente de carbono para generar biomasa; sin embargo es capaz de producir xilitol cuando crece en un medio de cultivo que contiene xilosa (Ribeiro et al. 2012). Por tanto, el genoma de *A. gossypii* debe contener un gen que codifique la actividad XR para producir xilitol a partir de xilosa. Con esta premisa, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos genómica de *A. gossypii* (<http://agd.unibas.ch/index.html>) de homólogos de los genes *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* de *S. cerevisiae*, que codifican XR, XDH y XK, respectivamente. Se identificaron los genes de *A. gossypii* *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* como homólogos de los genes *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* de *S. cerevisiae*, respectivamente (Fig. 15).

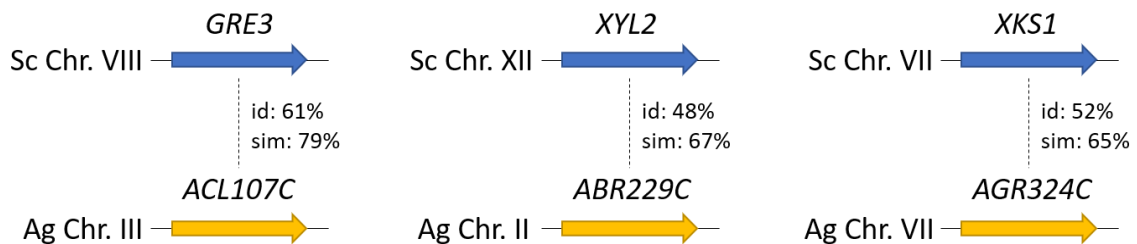


Figura 15. Genes del metabolismo de xilosa en *A. gossypii*. Los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* son homólogos sinténicos de los genes *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* de *S. cerevisiae*. Se indica el porcentaje de identidad y similitud a nivel de secuencia de aminoácidos entre los homólogos.

Se analizó la expresión de los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* en la cepa tipo silvestre de *A. gossypii* mediante PCR cuantitativa (qPCR) y se comprobó el escaso nivel de expresión de cada uno de ellos, siendo, por ejemplo, la expresión de *ACL107C* 0,75 veces el nivel de expresión de *ACT1*. Estos bajos niveles de expresión de los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* podrían explicar la incapacidad de *A. gossypii* de metabolizar xilosa (Fig. 17). La vía de asimilación de xilosa XR-XDH-XK ha sido utilizada con éxito para generar cepas de diferentes bacterias y levaduras capaces de metabolizar

la xilosa (G. Zhang et al. 2015); por tanto, asumiendo que *Acl107c*, *Abr229c* y *Agr324c* pueden participar en el metabolismo de la xilosa en *A. gossypii*, se planteó como punto de partida la sobreexpresión de los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* de *A. gossypii* (de ahora en adelante *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* respectivamente) para permitir el aprovechamiento de xilosa en *A. gossypii*.

La generación de una cepa de triple sobreexpresión (*GRE3*, *XYL2*, *XKS1*) se logró después de tres rondas de transformación sobre la cepa silvestre de *A. gossypii* (Fig. 16). La sobreexpresión de genes endógenos en *A. gossypii* se lleva a cabo mediante la sustitución de los promotores endógenos por el promotor constitutivo fuerte *P_{GPD1}*. El módulo de sobreexpresión empleado consta de un marcador de selección de resistencia a G418 (*loxP-kanMX-loxP*), la secuencia del promotor *P_{GPD1}* y secuencias recombinogénicas del sitio de integración (Materiales y Métodos: Módulos para la sobreexpresión de genes).

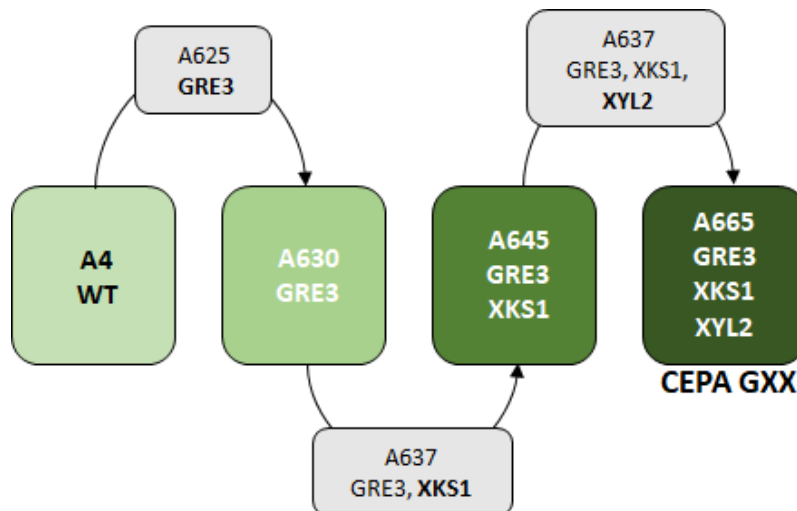


Figura 16. Diagrama de la construcción de la cepa GXX. La expresión transitoria de la recombinasa Cre permite eliminar el marcador *loxP-kanMX-loxP* (cepas color gris) para su reutilización en las siguientes rondas de transformación. En las cepas de color gris se resalta en negrita el gen manipulado en cada ronda de transformación.

La integración correcta de los módulos de sobreexpresión en la cepa triple mutante (A665-GXX, Tabla 1) fue confirmada mediante PCR analítica y secuenciación de DNA. La funcionalidad de los módulos de sobreexpresión fue verificada mediante qPCR. Los tres genes mostraron niveles de mRNA entre 30-50 veces superiores en la cepa GXX respecto a la de la cepa de tipo silvestre (A4-WT) (Fig. 17).

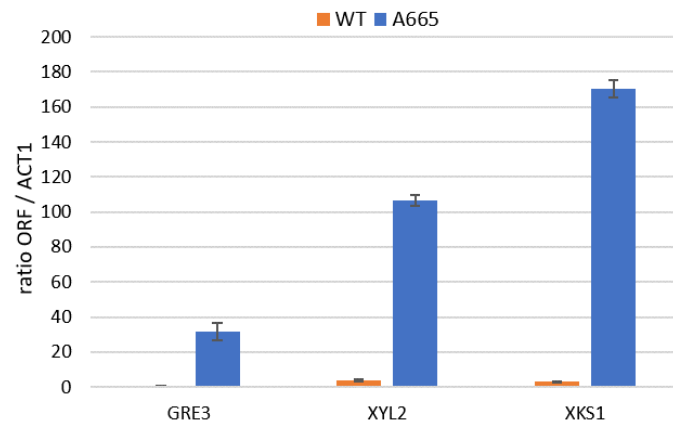


Figura 17. PCR cuantitativa a tiempo real de los genes *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* en las cepas *WT* y *GXX* de *A. gossypii*. Los niveles de transcripción relativa fueron cuantificados a las 48 horas de cultivo en medio líquido rico MA2, y normalizados usando el gen *AgACT1* de *A. gossypii* como referencia.

A continuación, se analizó la capacidad de las cepas construidas para utilizar xilosa como única fuente de carbono en cultivos líquidos durante 12 días. Las cepas intermedias A630 y A645 (Fig. 16) fueron incapaces de crecer usando xilosa como única fuente de carbono; sin embargo, la cepa *GXX* mostró un crecimiento exponencial durante las primeras 72 horas de cultivo con una tasa de crecimiento específico (μ_{xyl}) de $0,0537 \text{ h}^{-1}$. Por el contrario, la cepa *WT* fue incapaz de crecer en este mismo medio con xilosa como única fuente de carbono (Figs. 16).

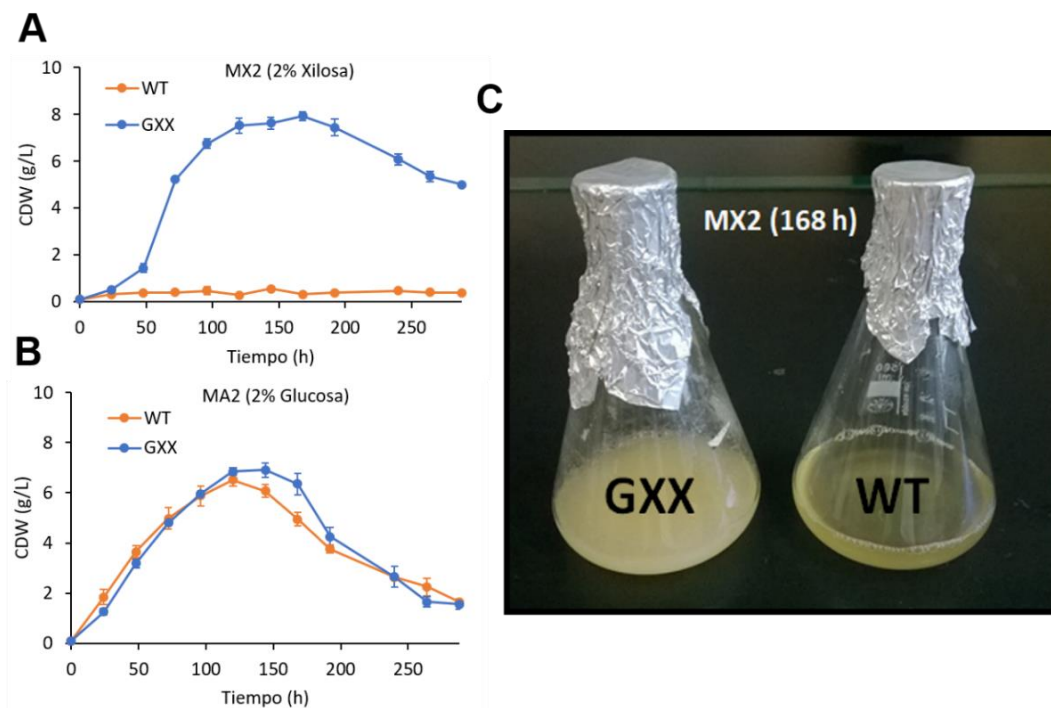


Figura 18. Análisis del crecimiento de la cepa *GXX*. **A**, Crecimiento de las cepas *WT* y *GXX* en medio líquido rico MX2 al 2% de xilosa. **B**, Crecimiento de las cepas *WT* y *GXX* en medio líquido rico MA2 con 2% de glucosa. **C**, Cultivos de las cepas *GXX* y *WT* de *A. gossypii* en medios MX2 con 2% de xilosa a las 168h

La cepa GXX alcanzó 7-8 g/L de biomasa en medios con xilosa como única fuente de carbono. Asimismo, la cepa GXX presentó un nivel de crecimiento superior al de la cepa WT en medios con glucosa como única fuente de carbono (6 g/L de biomasa; CDW: "Cell Dry Weight") (Fig. 18A-B). El análisis del medio de cultivo durante el crecimiento de la cepa GXX mostró una tasa de consumo de xilosa de 0,226 mmol/g/h durante la fase de crecimiento exponencial (Fig. 19). Además, a las 72h de cultivo se midió un incremento de xilitol excretado al medio de cultivo (6 g/L), coincidiendo con la fase de mayor consumo de xilosa.

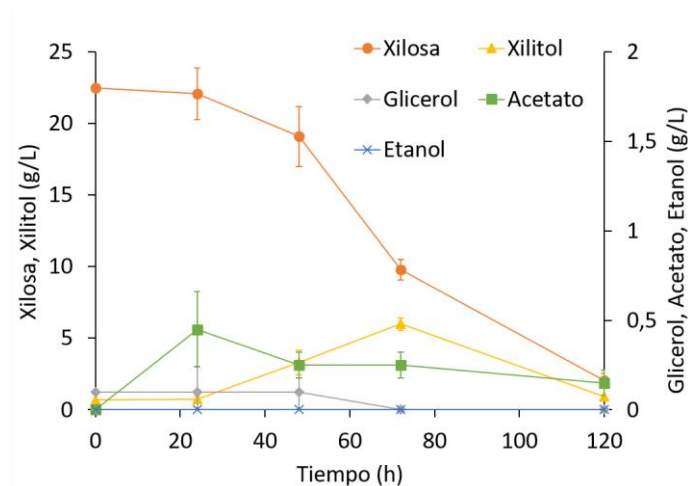


Figura 19. Consumo de xilosa y producción de distintos metabolitos de la cepa GXX en medio MX2 con 2% de xilosa

Al contrario que en el medio MA2 (2% glucosa), se observó un retraso en la germinación de las esporas de la cepa GXX en el medio con xilosa como única fuente de carbono (Fig. 18A). Este hecho provocó que la fase exponencial de crecimiento no se iniciase hasta las 48h de cultivo. En consecuencia, el consumo de xilosa fue mínimo hasta que se alcanzó suficiente biomasa en el cultivo (Fig. 18A, 17). La adición de glucosa (2-5 g/L) al medio de cultivo previno el retraso de la germinación de las esporas (Fig. 20A). No obstante, el consumo de xilosa no se inició hasta el agotamiento de la mayor parte de la glucosa añadida (Fig. 20B-C). Al igual que en los experimentos anteriores, se produjo una excreción de xilitol al medio de cultivo poco después de que la xilosa comenzara a consumirse, alcanzándose una concentración de xilitol de unos 8 g/L que fue consumido posteriormente (Fig. 20B-C).

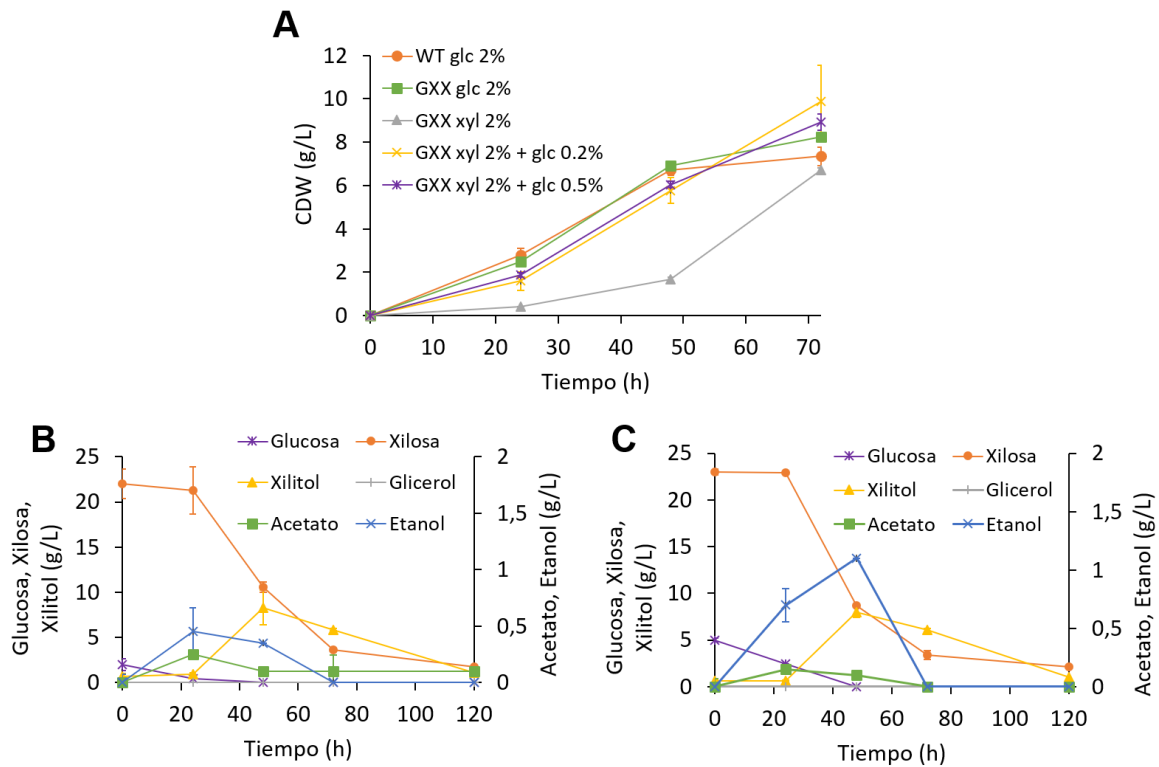


Figura 20. Cinéticas de crecimiento y utilización de mezclas de azúcares de la cepa GXX. **A**, Producción de biomasa de las cepas WT y GXX usando distintas formulaciones de azúcares. **B**, **C**, Consumo de azúcares y producción de distintos metabolitos de la cepa GXX en medio MX2 al 2% de xilosa más 0,2% de glucosa (**B**) y en medio MX2 al 2% de xilosa más 0,5% de glucosa (**C**)

La excreción de xilitol a los medios de cultivo indica una alta tasa de conversión de xilosa a xilitol y un mecanismo activo de excreción/captación de xilitol en *A. gossypii*. Se puede deducir que la acumulación transitoria de xilitol se debe a que la actividad de la enzima XDH es un paso limitante en la vía de asimilación de la xilosa. Una explicación a este hecho es que la actividad de la enzima XDH podría verse afectada por una baja oxigenación del cultivo cuando la concentración de biomasa es alta, ya que se ha demostrado que la disponibilidad de oxígeno y las condiciones de aireación afectan a la actividad XR en diferentes microorganismos capaces de metabolizar xilosa (Branco et al. 2009; S.-Y. Kim, Kim, and Oh 1997; Jin and Jeffries 2004). Otra posible explicación a la acumulación de xilitol podría ser la saturación de la enzima XDH por exceso de sustrato o por un desequilibrio de cofactores debido al requerimiento diferencial (NADPH/NAD^+) entre las enzimas XR y XDH (Fig. 5).

Para realizar un análisis más exhaustivo de la cepa GXX se analizó su capacidad de crecimiento en medios de cultivo con concentraciones crecientes de xilosa como única fuente de carbono (2%, 4% y 8%). La producción de biomasa aumentó significativamente en los medios ricos MX2 con 4% y 8% de xilosa, siendo máxima en este último medio

después de 264h de cultivo (12 g/L). Sin embargo, a diferencia de los medios MX2 con 2 y 4% de xilosa, en el medio de cultivo con 8% de xilosa el inicio de la fase de crecimiento exponencial sufrió un retraso significativo, dando lugar a una fase trófica extendida hasta las 264h (Fig.21C). Este retraso en el inicio de la fase exponencial se explica por un bajo consumo de xilosa durante las primeras 72h de cultivo. La excreción de xilitol al medio de cultivo también aumentó significativamente a mayor concentración de xilosa en el medio de cultivo, alcanzando 22,6 g/L a partir de 8% de xilosa. Además, se detectó un aumento en la producción de etanol en los medios de cultivo con mayor porcentaje de xilosa (Fig. 21).

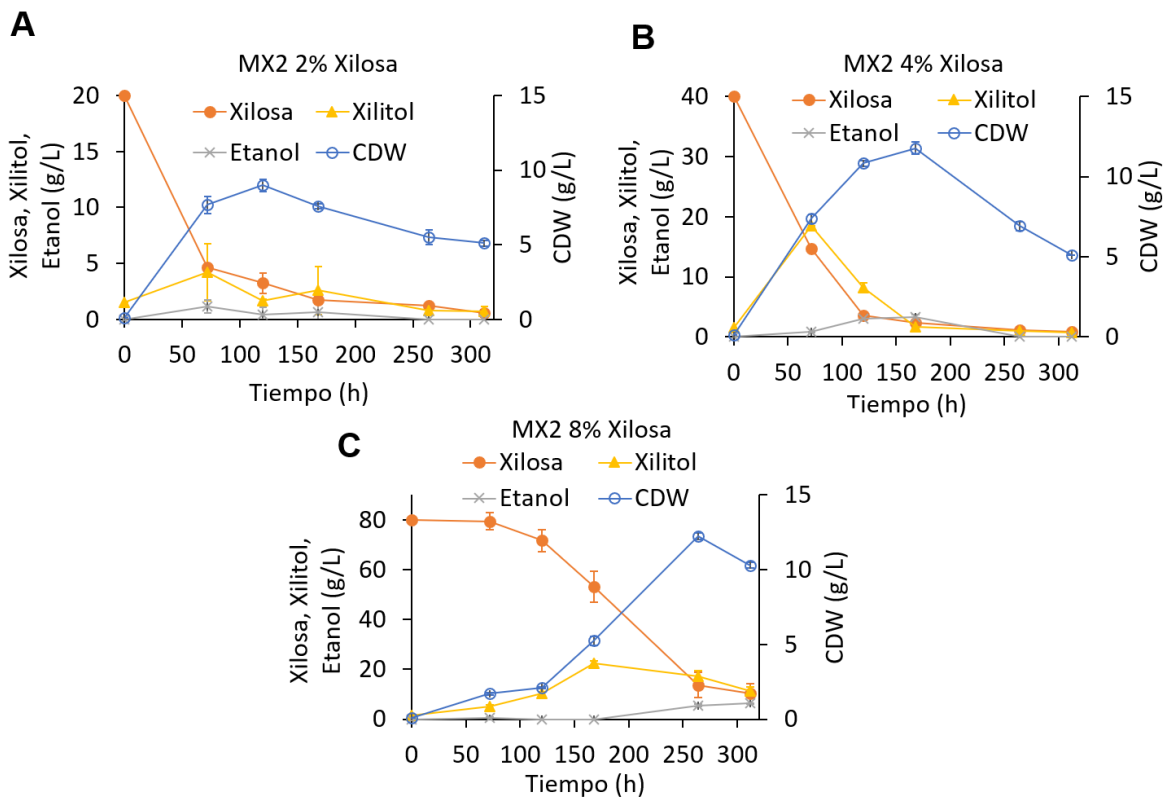


Figura 21. Cinéticas de crecimiento de la cepa GXX a diferentes concentraciones de xilosa. Producción de biomasa, consumo de xilosa y producción de xilitol y etanol de la cepa GXX crecida en medio MX2 al 2% de xilosa (A), al 4% de xilosa (B) y al 8% de xilosa (C)

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la sobreexpresión de los genes endógenos *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* de *A. gossypii* es suficiente para permitir el aprovechamiento de la xilosa como única fuente de carbono, siendo la capacidad de crecimiento de la cepa GXX similar a la observada cuando se emplea glucosa como fuente de carbono. Además, la acumulación de xilitol en el medio de cultivo tiene un gran potencial biotecnológico para la producción industrial de polialcoholes.

2. CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES DE AZÚCARES EN *Ashbya gossypii*

2.1. Caracterización de los homólogos de genes *HXT* en *A. gossypii*

La identificación de los sistemas de transporte de azúcar es importante para implementar enfoques de ingeniería metabólica que mejoren la utilización de diferentes materias primas para fermentaciones microbianas. La co-utilización de azúcares mixtos (pentosas y hexosas) constituye un desafío debido al sistema CCR, que reprime la utilización de pentosas en presencia de glucosa. En este sentido, se ha descrito que el empleo de materias primas ricas en xilosa para la producción de biolípidos en *A. gossypii* se ve obstaculizado por una deficiencia en la co-utilización de xilosa/glucosa, dificultando el crecimiento y la productividad de las cepas modificadas (Díaz-Fernández et al. 2017; 2019). De hecho, el consumo de xilosa por parte de la cepa GXX sólo se produce cuando no hay glucosa en el medio de cultivo (Fig. 20).

En *A. gossypii* hay una falta de información sobre los transportadores de azúcares, lo cual es de gran importancia para desarrollar bioprocesos eficientes basados en el empleo de sustratos complejos. Dado que *A. gossypii* está relacionado evolutivamente con *S. cerevisiae* (Dietrich et al. 2004), y considerando las proteínas Hxt1-7 y Gal2 como los transportadores de glucosa más prominentes en *S. cerevisiae*, una comparación genómica con *A. gossypii* reveló la ausencia de ortólogos para *HXT2* y *GAL2* en *A. gossypii*. Sin embargo, se identificaron tres genes candidatos que podrían codificar transportadores de azúcares en *A. gossypii*: *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C*. Estos tres genes son homólogos sinténicos de los genes *HXT1*, *HXT3-7* de *S. cerevisiae* y se agrupan en el cromosoma VI de *A. gossypii* (Fig. 22). Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de la vía XR-XDH-XK endógena en *A. gossypii* proporciona la capacidad del hongo para crecer en medios basados en xilosa como única fuente de carbono, lo que indica que también debe existir un mecanismo para el transporte de xilosa en *A. gossypii* (Díaz-Fernández et al. 2017).

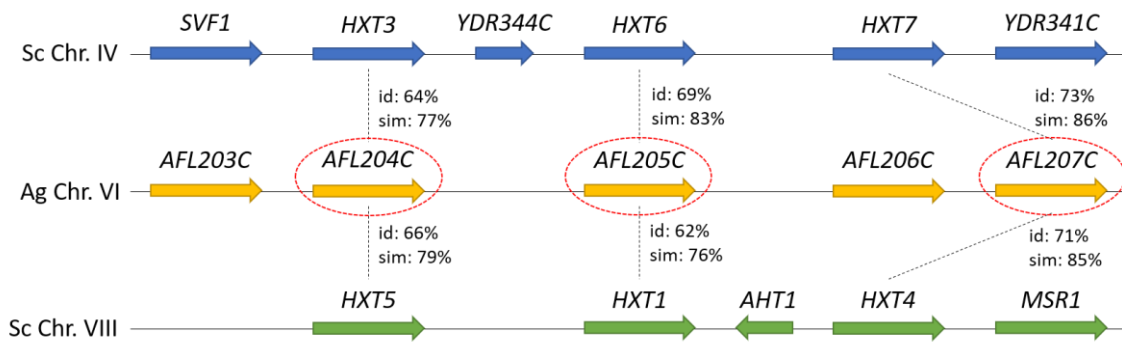


Figura 22. Homólogos de *HXT* en *A. gossypii*. Comparación de la región genómica del cromosoma VI de *A. gossypii* y los cromosomas IV y VIII de *S. cerevisiae*. El *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* son homólogos sinténicos de genes *HXT* de *S. cerevisiae*. Se indica el porcentaje de identidad y similitud de aminoácidos entre los homólogos.

Para caracterizar los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C*, se decidió analizar los niveles de transcripción en las cepas WT (A4) y GXX (A665) de *A. gossypii* (Tabla 1), que mostraron diferencias significativas en sus perfiles de expresión en respuesta a diferentes concentraciones de azúcares. Los niveles más altos de mRNA se correspondieron con el gen *AFL205C* y su expresión fue altamente inducida en medios de cultivo que contenían 0,2% de glucosa y 2% de xilosa (Fig. 23). La expresión de *AFL205C* también se analizó en la cepa GXX, que puede crecer usando xilosa como única fuente de carbono (Díaz-Fernández et al. 2017). Los resultados mostraron que la expresión de *AFL205C* fue 4,4 veces menor cuando se usó xilosa como única fuente de carbono, lo que sugiere que la expresión de *AFL205C* o bien no se induce, o bien se reprime parcialmente cuando no hay glucosa en el medio de cultivo. La expresión de *AFL205C* parece ser inducida en *A. gossypii* por bajos niveles de glucosa y parcialmente reprimida tanto por altas concentraciones de glucosa como en ausencia de glucosa. Esta regulación de la expresión de *AFL205C* es similar a la regulación de *HXT2* en *S. cerevisiae* (Özcan and Johnston 1999). Sin embargo, los homólogos sinténicos de *AFL205C* (*HXT1/HXT6*) (Fig. 22) muestran diferencias respecto a su regulación transcripcional en *S. cerevisiae*: mientras que *HXT1* es fuertemente inducido por altos niveles de glucosa, *HXT6* es levemente inducido por niveles muy bajos de glucosa y reprimido por altas concentraciones de glucosa (Reifenberger, Boles, and Ciriacy 1997).

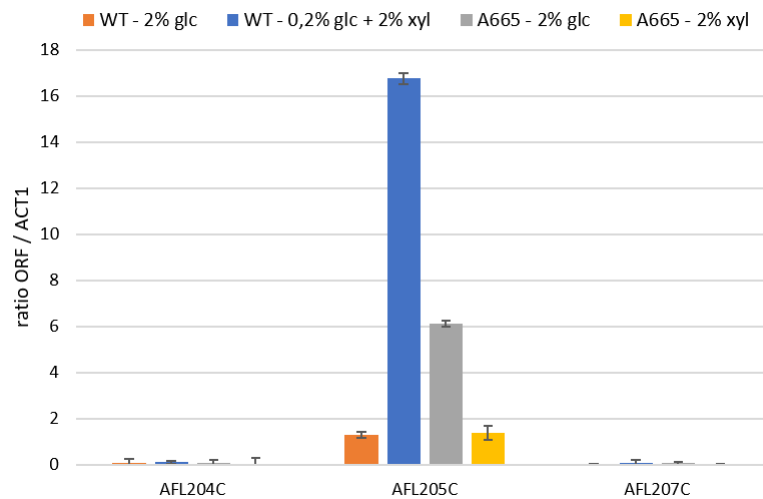


Figura 23. PCR cuantitativa a tiempo real de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* en las cepas WT y A665 de *A. gossypii*. Los niveles de transcripción relativa fueron cuantificados a las 48 horas de cultivo en medio líquido rico MA2 al 2% de glucosa y en MX2 al 0,2% de glucosa + 2% de xilosa. Los valores fueron normalizados utilizando el gen *AgACT1* de *A. gossypii* como referencia.

Por otro lado, tanto *AFL204C* como *AFL207C* mostraron una expresión mucho más baja que *AFL205C* (Fig. 23). Las diferencias encontradas en los perfiles de expresión de los tres transportadores de azúcares de *A. gossypii* se pueden asociar a una contribución diferente de cada gen al transporte de glucosa y xilosa.

2.2. Contribución de los homólogos *HXT* al transporte de xilosa en *A. gossypii*

Para estudiar la contribución específica de los homólogos de *HXT* al transporte de xilosa en *A. gossypii*, se llevaron a cabo deleciones simples, dobles y triples de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* en una cepa parental GXX, la cual puede crecer usando xilosa como única fuente de carbono (Díaz-Fernández et al. 2017). Las deleciones génicas se llevaron a cabo mediante la sustitución de la secuencia codificante del gen correspondiente por un marcador de selección *loxP-KanMX-loxP* (Materiales y Métodos: 6.2. Módulos para la deleción de genes) y la integración genómica de los módulos de deleción se confirmó mediante PCR analítica.

Se obtuvieron curvas de crecimiento a partir de medios de cultivo basados en xilosa como fuente de carbono principal y se descubrió que las deleciones simples y dobles de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* no afectaban significativamente a la capacidad de *A. gossypii* para usar xilosa (Fig. 24A). Se decidió utilizar el mutante *agl205cΔ* (A741) como referencia de deleción simple debido al mayor nivel de expresión génica del transportador *AFL205C*, junto a la ausencia de defectos en el crecimiento de la cepa A741 respecto a las

demás cepas con deleciones simples y dobles de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C*.

Al contrario que los mutantes simples y dobles de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C*, el mutante con una deleción triple (A764) (Tabla 1) mostró un defecto en el crecimiento a partir de medios basados en xilosa como fuente de carbono principal (Fig. 24A). No obstante, la cepa A764 pudo alcanzar la misma biomasa que la cepa GXX después de 120h de cultivo. En concordancia con los datos de crecimiento observados, el consumo de xilosa también sufrió un retraso en la cepa A764, explicando así el defecto de crecimiento en el triple mutante (Fig. 24B).

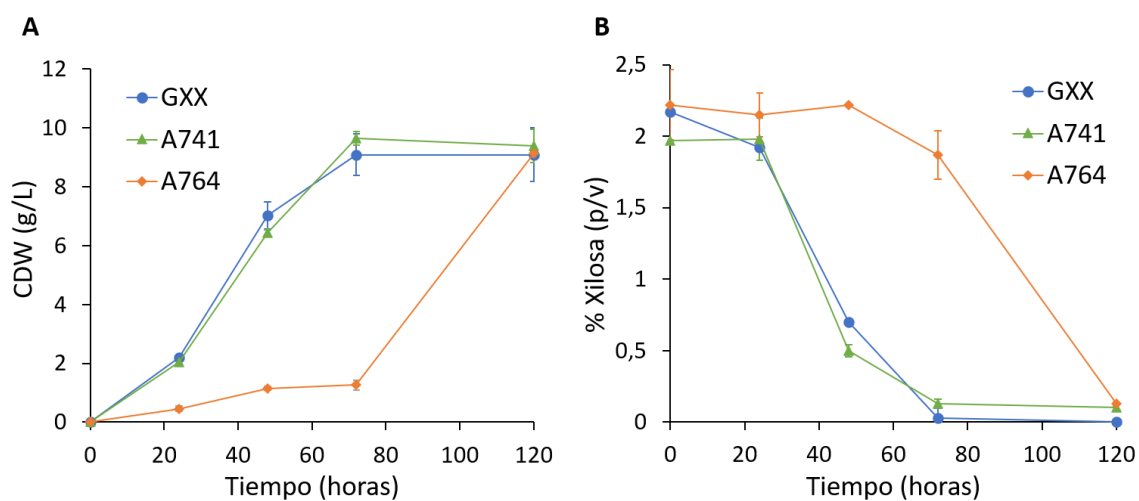


Figura 24. Crecimiento (A) y consumo de xilosa (B) de las cepas A665 (GXX), A741 y A764 en medio líquido rico MX2 al 2% de xilosa + 0,2% de glucosa.

También se observó un fenotipo diferencial relacionado con la capacidad de esporulación en el mutante triple A764. En *A. gossypii*, la formación de esporas se inicia al final de la fase trófica cuando se agotan los nutrientes (Introducción: 1.1. Biología de *A. gossypii*). En este sentido, tanto la cepa GXX como la cepa A741 mostraron una capacidad de esporulación máxima desde el segundo día de cultivo (Fig. 25). Sin embargo, el mutante triple A764 fue capaz de producir esporas desde el primer día de cultivo en medio SPA, aunque no se observó nuevamente la formación de esporas hasta el cuarto día de cultivo (Fig. 25). Además, el número de esporas generadas por la cepa A764 fue muy inferior al número de esporas generadas por las cepas GXX y A741, lo que sugiere que el transporte de azúcares debe estar afectado significativamente en la cepa A764.

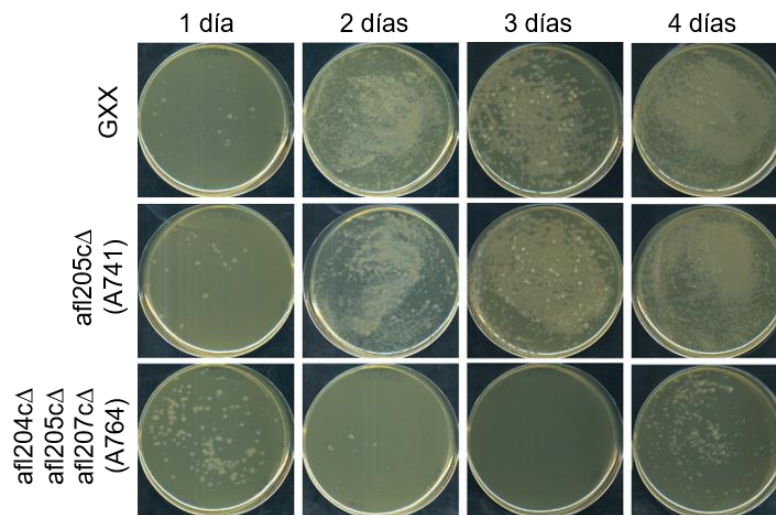


Figura 25. Crecimiento de esporas de las cepas A665, A741 y A764 en medio sólido MA2 al 2% de glucosa

Los resultados obtenidos en los mutantes de delección indican que pueden existir mecanismos compensatorios entre los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* para contrarrestar la ausencia de algunos de los homólogos de *HXT*. Además, la capacidad del triple mutante A764 para usar xilosa también sugiere la existencia de mecanismos adicionales para el transporte de azúcares en *A. gossypii*, que permiten la utilización de xilosa cuando los tres homólogos de *HXT* están inactivados. A este respecto, se identificaron dos genes adicionales (*AFR602W* y *ADR091W*) como candidatos potenciales para codificar transportadores de azúcar, ya que muestran un 30-40% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con Afl204c, Afl205c y Afl207c. No obstante, a pesar de estos posibles mecanismos compensatorios, la alteración de la capacidad de esporulación que mostró la cepa A764 (Fig. 25) indica que los bajos niveles intracelulares de azúcares pueden desencadenar la esporulación y, por lo tanto, sugiere que el transporte de azúcar debe verse significativamente afectado en esta cepa.

2.3. Co-utilización de azúcares mixtos en *A. gossypii*

Los transportadores de hexosas facilitan el transporte de pentosas en algunos microorganismos, como *S. cerevisiae* (G. Zhang et al. 2015). Sin embargo, el transporte de azúcares está controlado tanto por mecanismos de regulación transcripcional como por mecanismos enzimáticos que dependen principalmente de los niveles de glucosa presentes en el medio de cultivo, promoviendo así la utilización de glucosa como fuente de carbono preferida (Özcan and Johnston 1999). Estos mecanismos reguladores pueden reprimir la expresión de transportadores de hexosa en presencia de pentosas y, por tanto, también limitar la absorción de xilosa (Gancedo 1998). Por lo tanto, algunas estrategias destinadas a mejorar la utilización de azúcares alternativos han descrito la sobreexpresión

de transportadores de hexosa endógenos o la inactivación de reguladores negativos (Ostergaard et al. 2000; Rossi et al. 2010). En consecuencia, para superar la regulación transcripcional dependiente de los niveles de glucosa (represión CCR), se utilizó un promotor fuerte constitutivo del gen *GPD1* de *A. gossypii* para sobreexpresar los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C*. Se obtuvo así una cepa que sobreexpresa estos tres transportadores de azúcar (A847) (Tabla 1). La capacidad de crecimiento de esta cepa se analizó en cultivos con igual concentración de glucosa y xilosa (2% p/v) para evaluar la co-utilización de ambos azúcares.

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión simultánea de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* (A847) no mejoró la capacidad de *A. gossypii* para utilizar xilosa en presencia de glucosa (Fig. 26), lo que indica que la regulación transcripcional no es el único mecanismo involucrado en la selectividad del azúcar en *A. gossypii*.

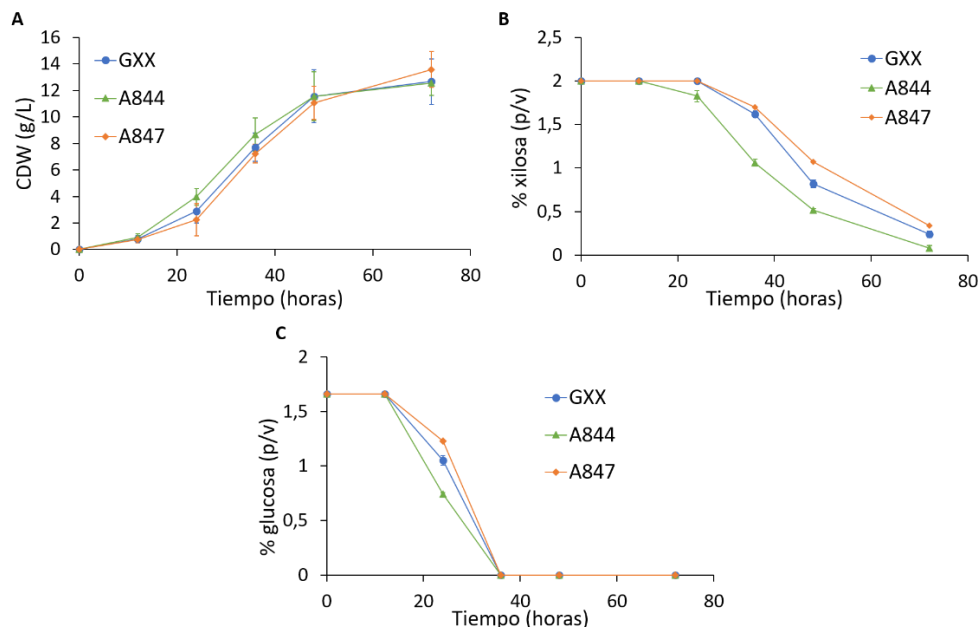


Figura 26. Producción de biomasa (a) y consumo de xilosa (b) y glucosa (c) de las cepas A665, A847 y A844 en medio líquido rico MX2 al 2% de xilosa + 2% de glucosa

Se ha descrito que mutaciones en los residuos que son importantes para la selectividad del azúcar pueden mejorar la afinidad de los supuestos transportadores de hexosa por la xilosa (Farwick et al. 2014; Young et al. 2014; G. Zhang et al. 2015). En concreto, el residuo N376 del gen *GAL2* está involucrado en la especificidad del azúcar en *S. cerevisiae* (Farwick et al. 2014). Este aminoácido está conservado en la proteína Afl205c de *A. gossypii* (N355). Por lo tanto, se decidió usar la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9 (Materiales y Métodos: 6.5. Técnica CRISPR/Cas9 para la edición genómica en *A. gossypii*) para introducir mutaciones puntuales en el gen *AFL205C* de la cepa A847,

que resultó en la sustitución del residuo 355 (N355V). La presencia de la mutación en la cepa A844 (Tabla 1) se confirmó mediante PCR analítica y secuenciación de DNA (Fig. 27).

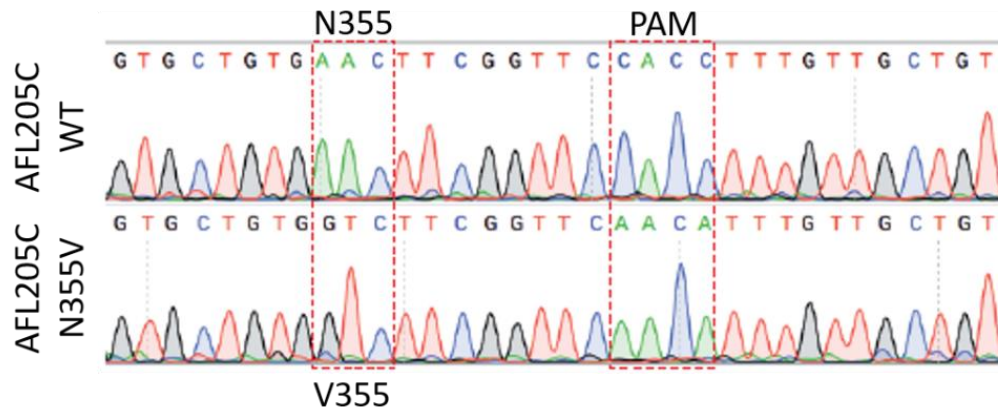


Figura 27. Cromatogramas de las secuencias del locus *AFL205C* de tipo silvestre y el alelo mutante *afI205c-N355V*. Se indican los cambios de nucleótidos y el motivo adyacente protospacer (PAM) Las sustituciones de nucleótidos introducen el cambio de aminoácidos (N355V) y eliminan la secuencia PAM para evitar la actividad recurrente de Cas9.

La cepa mutante A844 mostró una ligera mejora de su rendimiento de crecimiento en medios con glucosa/xilosa al 2% p/v, además de una mejora significativa del consumo de xilosa en presencia de glucosa (Fig. 26). También se puede observar que las cepas A665 y A847 no comienzan a consumir xilosa hasta que la glucosa comienza a agotarse (36 horas de cultivo), mientras que la cepa A844 presenta un consumo de ambos azúcares desde el comienzo del cultivo (Fig. 26). Además, durante la fase exponencial, a las 36 horas de cultivo, el consumo de xilosa fue un 26% mayor en la cepa A844 que en la cepa GXX (79% frente a 53% de xilosa por consumir presente en el medio de cultivo) (Fig. 26), confirmando así la funcionalidad de la sustitución N355V para facilitar la captación de xilosa en presencia de glucosa en *A. gossypii*.

En resumen, nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* no es suficiente para que *A. gossypii* pueda utilizar glucosa y xilosa simultáneamente. Sin embargo, la sobreexpresión del alelo *afI205c-N355V* mejora significativamente el uso de xilosa en presencia de glucosa. En consecuencia, el uso del alelo *afI205c-N355V* facilitará la co-utilización de azúcares mixtos en cepas modificadas de *A. gossypii*.

3. CANALIZACIÓN DE FLUJO METABÓLICO DE XILOSA HACIA LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS

3.1. Sobreexpresión heteróloga de los genes *pta* y *xpkA* (ruta de la fosfocetolasa)

La sobreexpresión de los genes *GRE3*, *XYL2* y *XKS1* en *A. gossypii* permite canalizar el flujo de carbono desde la xilosa hacia la ruta de las pentosas fosfato y utilizar este azúcar como fuente de carbono. No obstante, nuestro principal objetivo consiste en redirigir flujo metabólico desde el metabolismo de xilosa hacia la síntesis de ácidos grasos. La sobreexpresión de genes de la ruta de la fosfocetolasa se ha utilizado previamente para la producción de ésteres etílicos de ácidos grasos a partir de glucosa (De Jong et al. 2014). La ruta de la fosfocetolasa permite dirigir flujo metabólico desde X5P hacia AcCoA, que es el precursor inmediato de la biosíntesis de lípidos (Fig. 4). Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la sobreexpresión heteróloga de enzimas de la ruta de la fosfocetolasa en la cepa GXX de *A. gossypii*. Se emplearon las secuencias codificantes de las enzimas fosfotransacetilasa (*pta*) y Xu5P fosfocetolasa (*xpkA*) de *B. subtilis* y *A. nidulans*, respectivamente. La construcción de los módulos de sobreexpresión para la ruta de la fosfocetolasa está descrita en el apartado de materiales y métodos de este trabajo (Fig. 12). La integración de los dos módulos de sobreexpresión en los loci genómicos diana de la cepa GXX de *A. gossypii* se logró después de dos rondas de transformación y se confirmó mediante PCR analítica y secuenciación de DNA, dando lugar a la cepa A729 (GXX-PX) (Tabla 1). La funcionalidad de los módulos de sobreexpresión se verificó mediante un análisis de qPCR de la transcripción de los genes *pta* y *xpkA* respecto del gen constitutivo *UBC6* (Tabla 5).

Tabla 5. Q-RT-PCR de la cepa GXX-PX de los genes *pta* y *xpkA*

	ratio <i>ORF/UBC6</i>	
	<i>pta</i>	<i>xpkA</i>
2% Glc	46,9	7,1
0,2% Glc + 2% Xyl	60,9	10,1

A continuación, se llevó a cabo un análisis de la capacidad lipídica de la cepa GXX-PX en comparación con la cepa GXX. Se analizó la producción lipídica total de ambas cepas en medios MX2 con 8% de xilosa. Además, los medios fueron suplementados con un 0,2% de glucosa para favorecer la germinación de las esporas en la fase inicial del cultivo. Las cepas WT y GXX crecidas en medio MA2 con 8% de glucosa se emplearon como controles. Las muestras para el análisis de la producción lipídica se recogieron a los 3, 5 y 7 días de cultivo, determinando así la acumulación de lípidos durante las fases exponencial, productiva temprana y productiva tardía.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor producción de lípidos en la cepa GXX que en la cepa WT en cultivos con xilosa o glucosa como fuente de carbono a los 3 y 5 días de cultivo (Fig. 28). Este efecto puede deberse a que la sobreexpresión de la vía XR-XDH-XK en la cepa GXX podría afectar de manera indirecta a la actividad de la ruta de las pentosas fosfato que metaboliza el 30% de la glucosa-6-fosfato en *A. gossypii* (Jeong et al. 2015). Además, la contribución de la ruta de las pentosas fosfato a la generación de poder reductor en forma de NADPH resulta determinante para la síntesis de ácidos grasos en microorganismos oleaginosos (H. Chen et al. 2015).

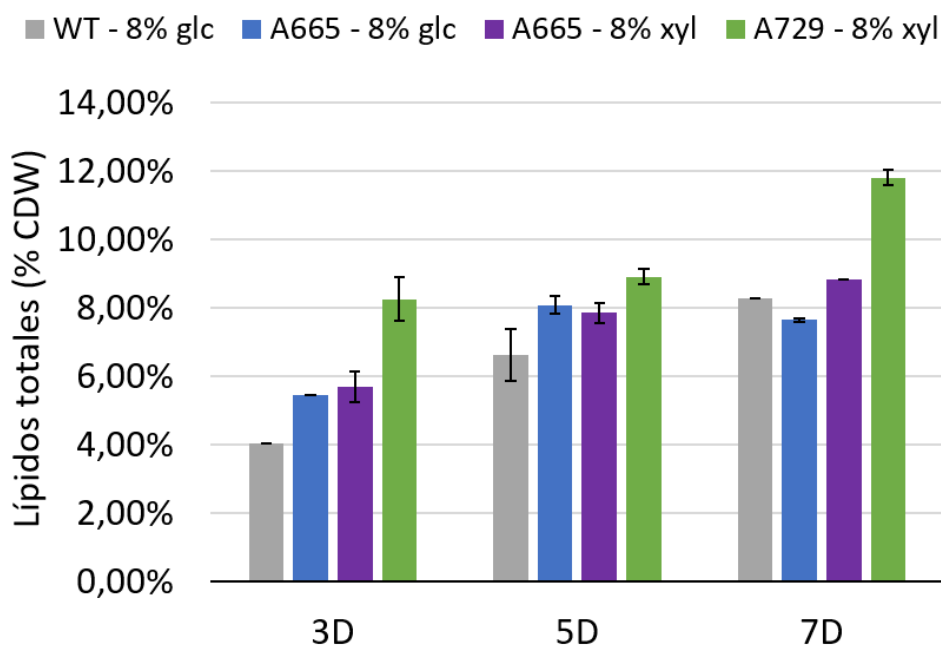


Figura 28. Producción de lípidos en las cepas WT, GXX y GXX-PX. Lípidos totales respecto de la biomasa total producida en medios líquidos ricos MA2 y MX2 con 8% de glucosa y 8% de xilosa más 0,2% de glucosa, respectivamente, de las cepas WT, A665 (GXX) y A729 (GXX-PX).

La cepa GXX-PX mostró los niveles máximos de producción de lípidos, alcanzando el 12% de contenido lipídico respecto de la biomasa total (Fig. 28). La sobreexpresión de la ruta de la fosfoacetolasa contribuye a incrementar la producción de lípidos desde un 8,85% en la cepa GXX a un 11,82% en la cepa GXX-PX. Por lo tanto, este resultado demuestra que la sobreexpresión combinada de las rutas XR-XDH-XK y fosfoacetolasa es una estrategia acertada para la producción de lípidos a partir de xilosa en *A. gossypii*.

3.2. Bloqueo del catabolismo de ácidos grasos mediante la delección del gen *POX1*

El bloqueo de la β -oxidación mediante la delección del gen *POX1* en *A. gossypii* produce un incremento notable en la acumulación total de lípidos (Ledesma-Amaro, Santos, et al. 2014b). Por lo tanto, se planteó la delección del gen *POX1* en la cepa GXX-PX con el

objetivo de eliminar una ruta competidora de la acumulación de lípidos en *A. gossypii*. Se diseñó un módulo de delección para el gen *POX1* y se empleó para transformar esporas de la cepa GXX-PX (Materiales y Métodos). La integración correcta del módulo de delección se comprobó mediante PCR analítica y secuenciación de DNA, dando lugar la cepa A738 (GXX-PX- $\beta\Delta$, Tabla 1). La producción de lípidos totales y el perfil de ácidos grasos se cuantificaron en las cepas GXX, GXX-PX y GXX-PX- $\beta\Delta$ empleando los siguientes medios de cultivo: MX2 con 8% de xilosa y 0,2% de glucosa; MX2 con 8% de xilosa y 2% de ácido oleico. Las muestras para el análisis de la producción lipídica se recogieron a los 3, 5 y 7 días de cultivo, para evaluar la acumulación de lípidos durante las fases exponencial, productiva temprana y productiva tardía.

Los resultados obtenidos mostraron que la delección del gen *POX1* aumentaba la producción lipídica total en la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$, alcanzando un 13% de lípidos totales respecto de la biomasa total en un medio de cultivo con 8% de xilosa como única fuente de carbono. La delección del gen *POX1* contribuye a incrementar un 69% la producción de lípidos de la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ en un medio con 8% de xilosa como única fuente de carbono, respecto a la cepa GXX en un medio con 8% glucosa como única fuente de carbono (Fig. 28, 29).

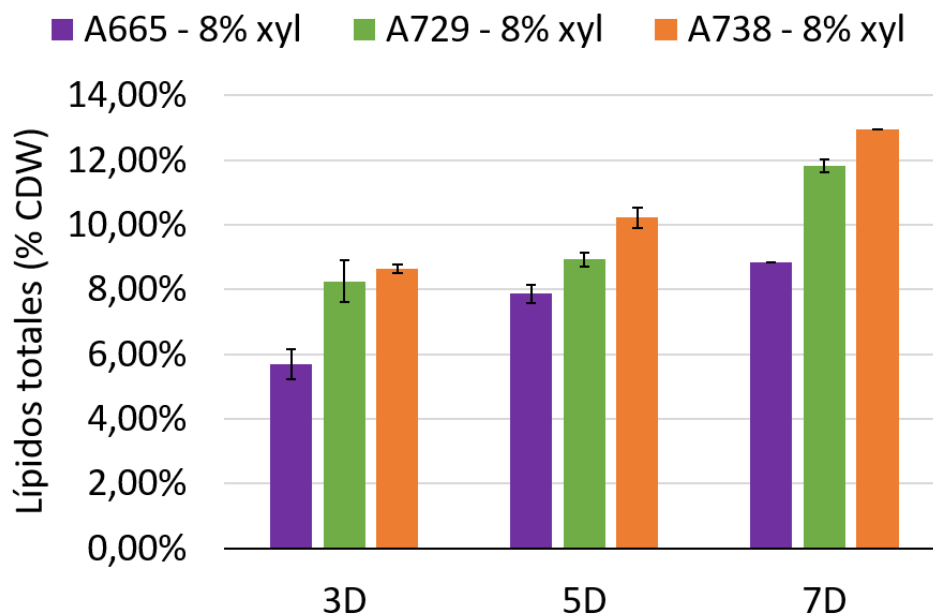


Figura 29. Producción de lípidos en las cepas GXX, GXX-PX y GXX-PX- $\beta\Delta$. Lípidos totales respecto de la biomasa total producida en medio líquido rico MX2 con 8% de xilosa de las cepas A665 (GXX), A729 (GXX-PX) y A738 (GXX-PX- $\beta\Delta$).

El análisis del perfil de ácidos grasos de las cepas anteriores confirmó que la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ presenta un mayor contenido en ácidos grasos con respecto a las cepas GXX y GXX-PX, destacando la acumulación de ácido oleico en la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$, que alcanzó 56,73 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y 246,60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en los medios con 8% de xilosa como única fuente de carbono

y con 8% de xilosa y 2% de ácido oleico, respectivamente. También cabe resaltar el incremento de la acumulación de ácido esteárico y, especialmente, ácido linoleico en la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ en el medio suplementado con ácido oleico (Fig. 30). La importancia del ácido linoleico radica en que es el precursor de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como los ácidos grasos omega-3 y omega-6 (Ledesma-Amaro, Jiménez, and Revuelta 2018).

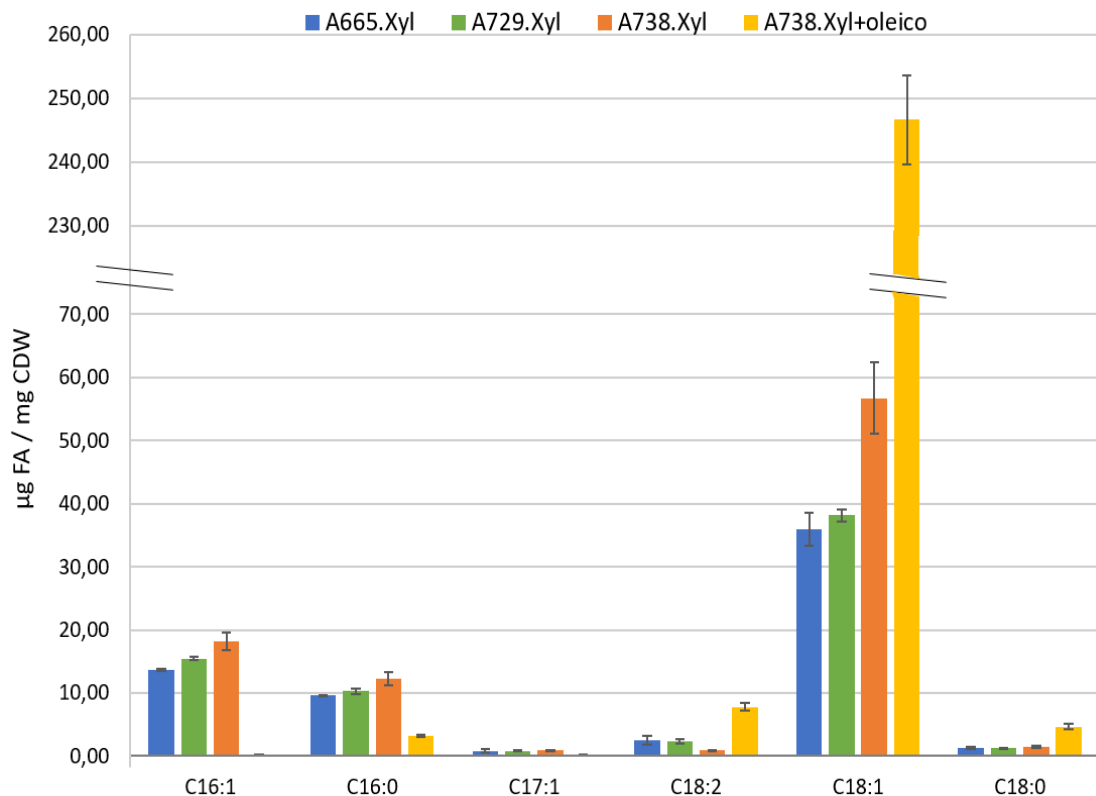


Figura 30. Perfil de ácidos grasos de las cepas A665 (GXX), A729 (GXX-PX) y A738 (GXX-PX- $\beta\Delta$). Las cepas GXX, GXX-PX y GXX-PX- $\beta\Delta$ fueron crecidas en medio líquido MX2 con 8% de xilosa como única fuente de carbono. La cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ también fue crecida en medio líquido MX2 con 8% de xilosa y 2% de ácido oleico.

La producción de lípidos en las cepas construidas de *A. gossypii* pudo ser visualizada por microscopía confocal mediante la tinción de los cuerpos lipídicos intracelulares con el compuesto fluorescente *Bodipy*. Tanto el tamaño como el número de cuerpos lipídicos de la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ fueron significativamente mayores que los de las cepas WT y GXX en medios de cultivo con glucosa y xilosa como fuentes de carbono. Además, la suplementación de 2% de ácido oleico a los medios con 8% de xilosa produjo un mayor aumento de la acumulación de cuerpos lipídicos intracelulares en la cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ (Fig. 31).

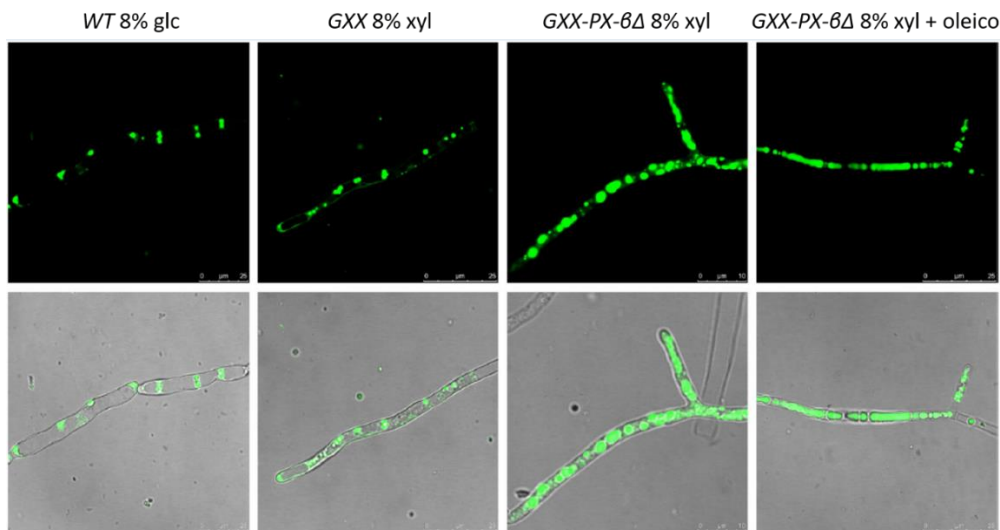


Figura 31. Cuerpos lipídicos de las cepas WT, GXX y GXX-PX- $\beta\Delta$. Las cepas WT y GXX fueron crecidas durante 5 días en medios de cultivo ricos MA2 con 8% de glucosa. Las cepas GXX y GXX-PX- $\beta\Delta$ fueron crecidas durante 5 días en medios de cultivo ricos MX2 con 8% de xilosa. La cepa GXX-PX- $\beta\Delta$ fue crecida también medio rico MX2 con 8% de xilosa y 2% ácido oleico. Los cuerpos lipídicos fueron teñidos con *Bodipy* y visualizados mediante microscopía confocal.

Los niveles de acumulación de lípidos de las cepas de *A. gossypii* construidas (9-13% de lípidos respecto de la biomasa total) son inferiores en comparación con otros microorganismos capaces producir lípidos a partir de xilosa, como *Y. lipolytica* o *R. toruloides* (Ledesma-Amaro et al. 2016; Li and Alper 2016; Shuyan Zhang et al. 2016). Sin embargo, las ventajas biotecnológicas respecto al procesamiento industrial posterior y su facilidad de manipulación genética hacen de *A. gossypii* un microorganismo con una amplia capacidad de mejora de las cepas que metabolizan xilosa. Además, el rendimiento y productividad de las capacidades lipídicas de estas cepas de *A. gossypii* pueden verse limitados por mecanismos de regulación que afectan a la biosíntesis de lípidos. Por tanto, el diseño de cepas modificadas genéticamente que alivien cuellos de botella regulatorios en la síntesis de lípidos podrían mejorar las capacidades lipídicas de *A. gossypii* (Qiao et al. 2015; Friedlander et al. 2016; L. Chen et al. 2014; Pflieger, Gossing, and Nielsen 2015).

4. DESREGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN *A. gossypii*

Se ha descrito la existencia de mecanismos reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos como la inhibición por producto final de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (Acc1) y FA sintasa (FAS) (Fig. 32). La enzima Acc1 cataliza la síntesis de malonil-CoA a partir de AcCoA, que es un paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos. La enzima Acc1 es inhibida por acumulación de acil-CoA y regulada mediante inhibición por fosforilación a través de la proteína quinasa Snf1 (Qiao et al. 2015). Un exceso de acil-CoA también ejerce un efecto inhibitorio sobre la FAS y sobre la desaturasa Δ9, codificada por el gen *OLE1* en *A. gossypii*. La eliminación de estos mecanismos de regulación ha logrado aumentar significativamente la biosíntesis de lípidos en microorganismos como *Y. lipolytica* (Qiao et al. 2015; Pflieger, Gossing, and Nielsen 2015).

A continuación, se describen tres estrategias de ingeniería metabólica que se llevaron a cabo para manipular la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos en *A. gossypii* (Fig. 32).

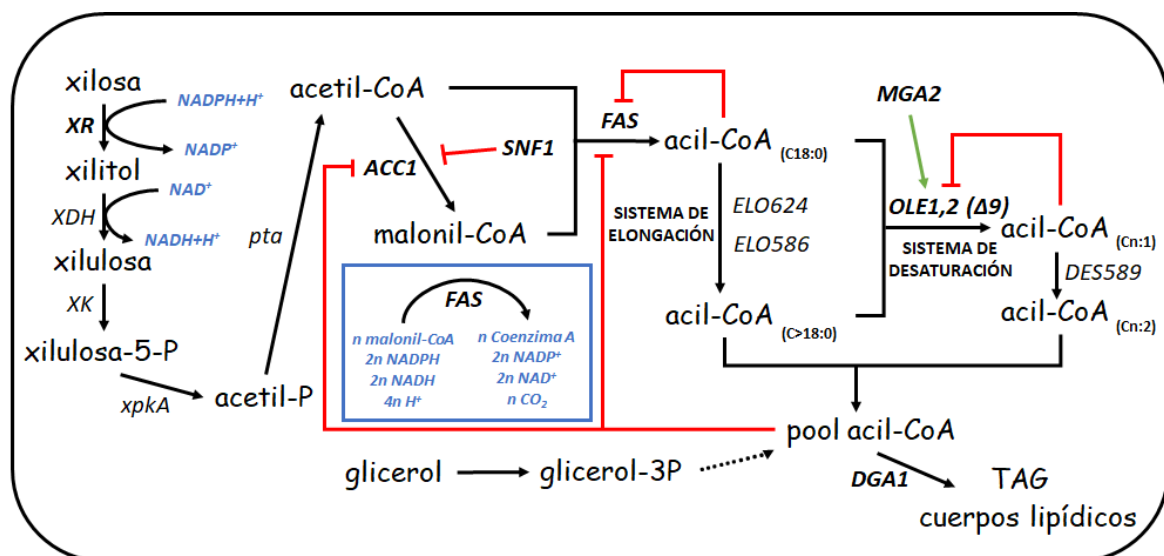


Figura 32. Biosíntesis de lípidos a partir de xilosa como fuente de carbono. Se destacan en negrita los puntos de regulación de la biosíntesis de lípidos. En azul se indica el requerimiento de poder reductor en forma de NADH y NADPH. La regulación negativa está indicada mediante líneas rojas, mientras que la regulación positiva con líneas verdes. Acc1, acetil-CoA carboxilasa; Snf1, proteína quinasa dependiente de AMP; FAS, Ácido Graso Sintasa; Elo624 y Elo586, elongasas de ácidos grasos; Ole1,2, desaturasa Δ9; MGA2, gen regulador de Ole1,2; Des589, desaturasa 589; Dga1, diacilglicerol aciltransferasa

4.1 Desregulación de la expresión de los genes *OLE1/OLE2* de *A. gossypii*

La primera estrategia tuvo como objetivo reducir el pool de acil-CoA saturados para prevenir la inhibición de Acc1 y FAS (Fig. 32). Los genes *OLE1* y *OLE2* de *A. gossypii* codifican enzimas con actividad desaturasa $\Delta 9$. No obstante, la sobreexpresión de los genes *OLE1* y *OLE2* no produce un incremento de la biosíntesis de lípidos en *A. gossypii* (Lozano-Martínez et al. 2017). Se ha descrito que la proteína Mga2 de *S. cerevisiae* participa en la estabilización del mRNA de *OLE1* y, por tanto, influye positivamente en la síntesis de ácidos grasos insaturados (Martin, Oh, and Jiang 2007). La expresión de una forma truncada en el extremo C-terminal de la proteína Mga2 (Mga2- Δ C-term) afecta significativamente a la capacidad lipídogenica en *S. cerevisiae* y *A. gossypii* en medios con glucosa como única fuente de carbono (Shirong Zhang, Skalsky, and Garfinkel 1999; Martin, Oh, and Jiang 2007; Lozano-Martínez et al. 2017).

Se decidió por tanto expresar la forma truncada de la proteína Mga2 en la cepa A729 (GXX-PX) (Tabla 1) para comprobar si se producía este mismo efecto en medios con xilosa como única fuente de carbono. Para obtener la forma truncada de Mga2 (Mga2- Δ C-term), el extremo C-terminal (aminoácidos 850-1139) fue sustituido por el marcador de selección *loxP-KanMX-loxP*, obteniéndose la cepa A789, según la estrategia que se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

El efecto de la expresión de Mga2- Δ C-term en la cepa A789 se analizó en medios de cultivo con 8% de xilosa como única fuente de carbono. Los resultados mostraron un ligero aumento de un 2,3% de la producción de lípidos de la cepa A789 respecto de la cepa A729 (Fig. 33). Se deduce, por tanto, que la forma truncada de la proteína Mga2 se comporta de forma similar tanto en medios basados en glucosa como en xilosa, favoreciendo la estabilidad del mRNA de *OLE1,2*. El aumento de la producción de acil-CoA insaturados en detrimento del *pool* de acil-CoA saturados disminuye la inhibición del complejo FAS producida por la acumulación de acil-CoA saturados. Sin embargo, el aumento del *pool* de acil-CoA insaturados inhibe la actividad de la desaturasa $\Delta 9$ codificada por *OLE1*. Esto podría explicar el escaso aumento de la cantidad de lípidos totales producidos por la cepa A789 respecto de la cepa parental A729, siendo necesarias manipulaciones adicionales para conseguir desregular la biosíntesis de ácidos grasos.

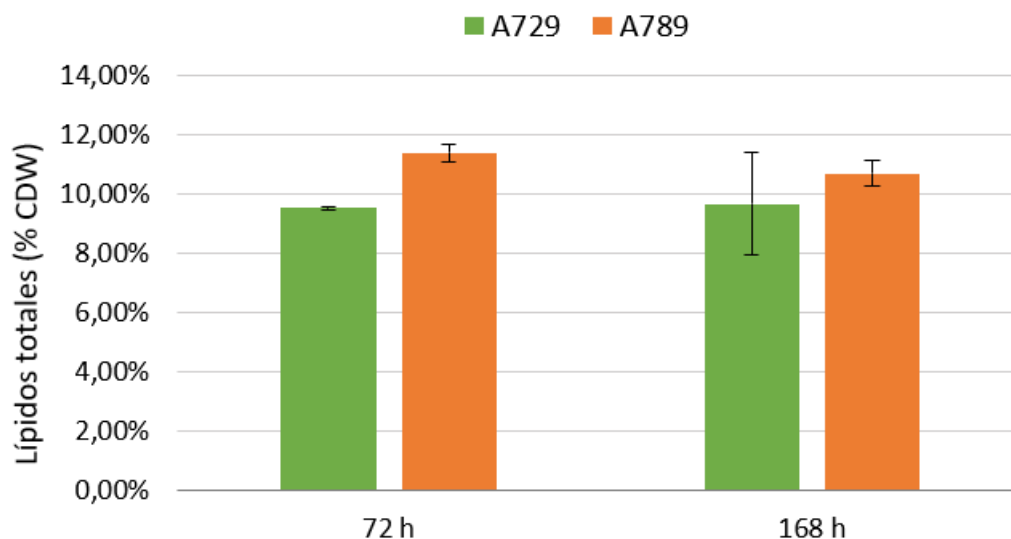


Figura 33. Producción de lípidos en las cepas A729 y A789. Lípidos totales respecto de la biomasa total producida en medio líquido MX2 con 8% de xilosa de las cepas A729 y A789

4.2 Desregulación de la enzima Acc1

La segunda estrategia para la eliminación de la regulación de la biosíntesis de lípidos consistió en la manipulación de la enzima Acc1 de *A. gossypii*. En *S. cerevisiae* se ha descrito que la sustitución de los residuos S659 y S1157 por residuos no fosforilables evita la regulación de Acc1 mediante fosforilación (Qiao et al. 2015), dando como resultado una mayor actividad de Acc1 (Shi et al. 2014). Mediante una búsqueda en la base de datos genómica de *A. gossypii* (<http://agd.unibas.ch/index.html>), se comprobó que los residuos S659 y S1157 están conservados en la enzima Acc1 de *A. gossypii*. Con el objetivo de obtener un alelo mutante *acc1* no sometido a regulación mediante fosforilación, se construyó un módulo de sobreexpresión para el reemplazamiento genómico del gen *ACC1* por el alelo mutante *acc1*^{S659A, S1155A}, en el cual se sustituyeron los residuos S659 y S1155 por alaninas (A) mediante la mutación de la timina 1975 a guanina (T1975G) y de la timina 3463 a guanina (T3463G) (Fig. 34). La construcción de este módulo de sobreexpresión con el alelo mutante del gen *ACC1* se llevó a cabo mediante dos rondas de PCR mutagénica inversa.

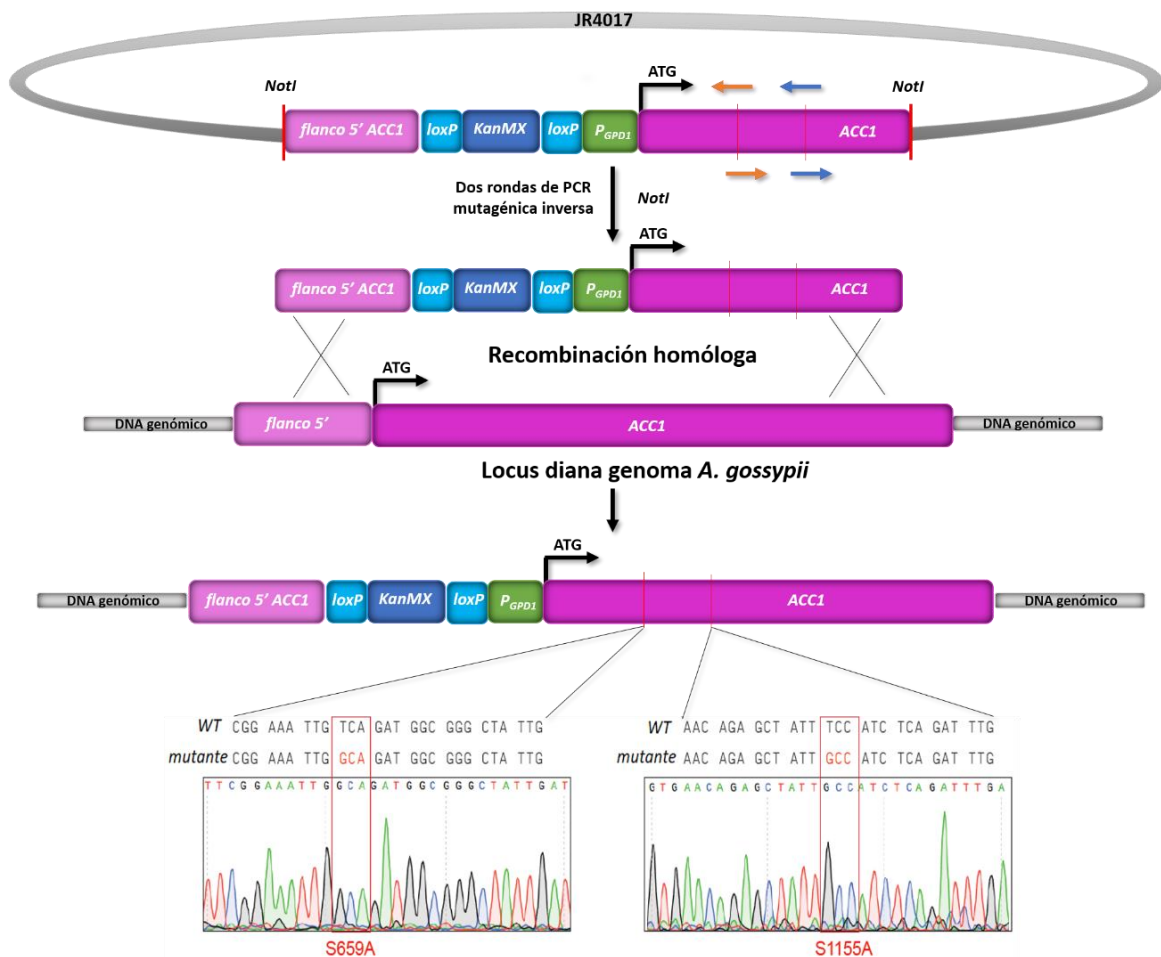


Figura 34. Construcción del módulo de sobreexpresión de *AgACC1* de *A. gossypii* con las mutaciones S659A y S1155A. Tras dos rondas de PCR mutagénica inversa con dos parejas de oligonucleótidos (se indican en el esquema en naranja y azul), se digiere el plásmido JR4017 con la enzima de restricción *NotI* y, a continuación, se transforma *A. gossypii* con el fragmento de DNA obtenido. Finalmente, se sustituye por recombinación homóloga el gen *ACC1* nativo por el alelo mutante *acc1^{S659A, S115A}*. En el panel inferior se muestran los cromatogramas de las secuencias genómicas de la cepa mutante *acc1^{S659A, S115A}*

El efecto de la sobreexpresión del alelo mutante se analizó en diferentes fondos genéticos. Contrariamente a lo esperado, en la cepa parental A729 (GXX-PX), la sobreexpresión del alelo *acc1^{S659A, S115A}* produce una disminución de la producción de lípidos (cepa A862, Tabla 1).

Sin embargo, se observó un efecto sinérgico de la sobreexpresión del alelo mutante *acc1^{S659A, S115A}* y de la expresión de la proteína Mga2-ΔC-term que produce un aumento significativo en la producción de lípidos en *A. gossypii* en un medio de cultivo con 2% de xilosa como única fuente de carbono, llegando a alcanzar el 22,51% de lípidos totales respecto de la biomasa total a las 96 horas de cultivo (Fig. 35). La combinación de ambas

mutaciones en la cepa A842 (Tabla 1) consigue que el contenido total de lípidos sea 1,3 veces el de la cepa A729 en un medio con xilosa como única fuente de carbono.

4.3 Sobreexpresión del gen *DGA1* de *A. gossypii*

Se ha descrito que la sobreexpresión del gen *DGA1* en *Y. lipolytica* provoca un aumento de la producción total de lípidos (Qiao et al. 2015). De forma análoga, se planteó la sobreexpresión de una copia adicional del gen *DGA1* de *A. gossypii* para aumentar las capacidades lipídicas de *A. gossypii*. En esta tercera estrategia se planteó redirigir la acumulación de acil-CoA hacia la biosíntesis de triacilglicerol (TAG) y, consecuentemente, reducir el pool intracelular de acil-CoA. La reducción del pool de acil-CoA podría contribuir a evitar la regulación negativa de estos sobre la enzima Acc1, el complejo enzimático FAS y la desaturasa $\Delta 9$.

La sobreexpresión de una copia adicional del gen *DGA1* en *A. gossypii* se llevó a cabo sobre la cepa A842. Se empleó un módulo de sobreexpresión que fue integrado en el locus *AFR171W* mediante recombinación homóloga (ver apartado 6 de Materiales y Métodos). Por lo tanto, la cepa resultante (A877) combinaría las tres manipulaciones genéticas descritas anteriormente para eliminar los mecanismos regulatorios de la biosíntesis de ácidos grasos (Fig. 32). El efecto de estas manipulaciones se tradujo en un notable incremento del contenido total de lípidos de la cepa A877 respecto tanto de la cepa A842 como de la cepa parental A729. La cepa A877 alcanzó un $25,2 \pm 1,7\%$ de lípidos totales respecto de la biomasa total en un medio AFM con 2% de xilosa como única fuente de carbono a las 96 horas, es decir, 1,5 veces más que la cepa parental A729 (Fig. 35).

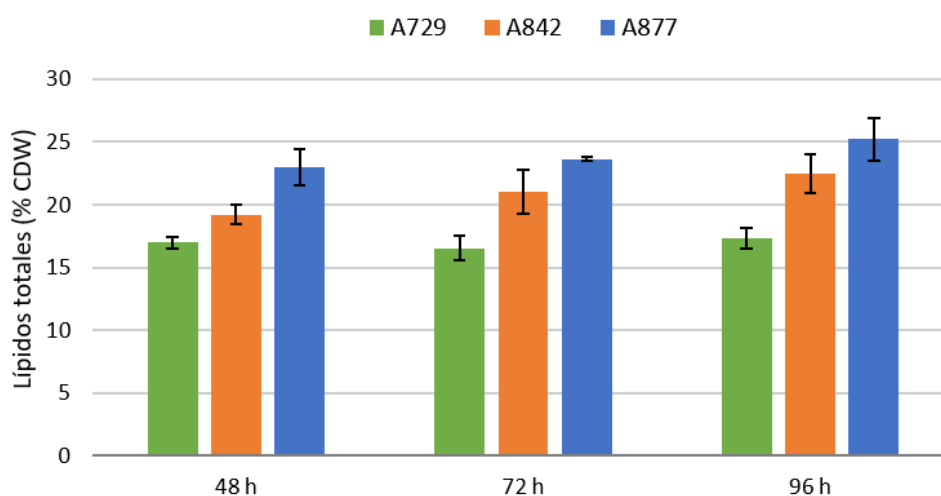


Figura 35. Producción de lípidos en las cepas A729, A842 y A877. Lípidos totales respecto de la biomasa total producida en medio líquido AFM con 2% de xilosa de las cepas A729, A842 y A877

4.4 Empleo de medios de cultivo con mezclas de distintas fuentes para la producción lipídica en *A. gossypii*

A pesar del aumento en la producción de lípidos, las cepas A842 y A877 presentaron un defecto de crecimiento en medios de cultivo con xilosa como única fuente de carbono (Fig. 36). Este efecto podría deberse a un déficit de NADPH generado por la sobreproducción de lípidos en las cepas A842 y A877. La enzima XR requiere NADPH como cofactor para transformar la xilosa en xilitol, pero el NADPH también se requiere para la biosíntesis de lípidos, que está desregulada en las cepas A842 y A877. Esto podría conducir a un problema de disponibilidad de poder reductor cuando estas cepas crecen en medios con xilosa como única fuente de carbono, lo que puede traducirse en un defecto en la generación de biomasa.

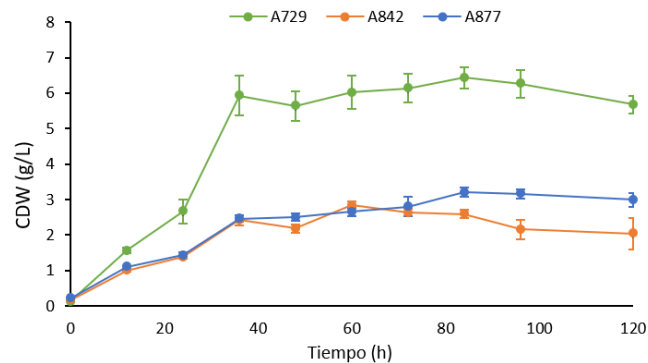


Figura 36. Crecimiento de las cepas A729, A842 y A877 en medio líquido AFM con 2% de xilosa

Para superar el defecto en el crecimiento de la cepa A877 en medios con xilosa como única fuente de carbono se decidió emplear medios de cultivo suplementados con glucosa y glicerol (Fig. 37), cuyo metabolismo no se ve comprometido por niveles de limitantes de NADPH. Se emplearon medios de cultivo con 1% de xilosa suplementados con 1% de glucosa o 1% de glicerol. En ambos medios de cultivo se consiguió restaurar el fenotipo de la cepa parental A729 en cuanto a generación de biomasa (6-7 g/L).

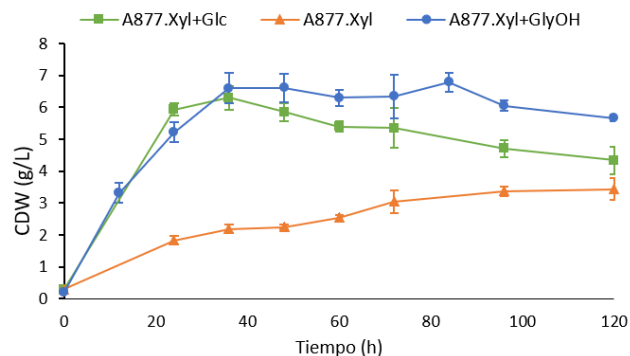


Figura 37. Crecimiento de la cepa A877 en distintos medios líquidos AFM (1% de xilosa + 1% de glucosa; 2% de xilosa; 1% de xilosa + 1% glicerol)

El análisis del perfil de ácidos grasos de la cepa A877 en los tres medios de cultivo descritos anteriormente mostró que la suplementación con glucosa o glicerol no provoca cambios notables en la composición de ácidos grasos en comparación con los resultados obtenidos en el medio AFM con 2% de xilosa, siendo los ácidos oleico (C18:1), palmitoleico (C16:1) y palmítico (C16:0) los mayoritarios (Fig. 38).

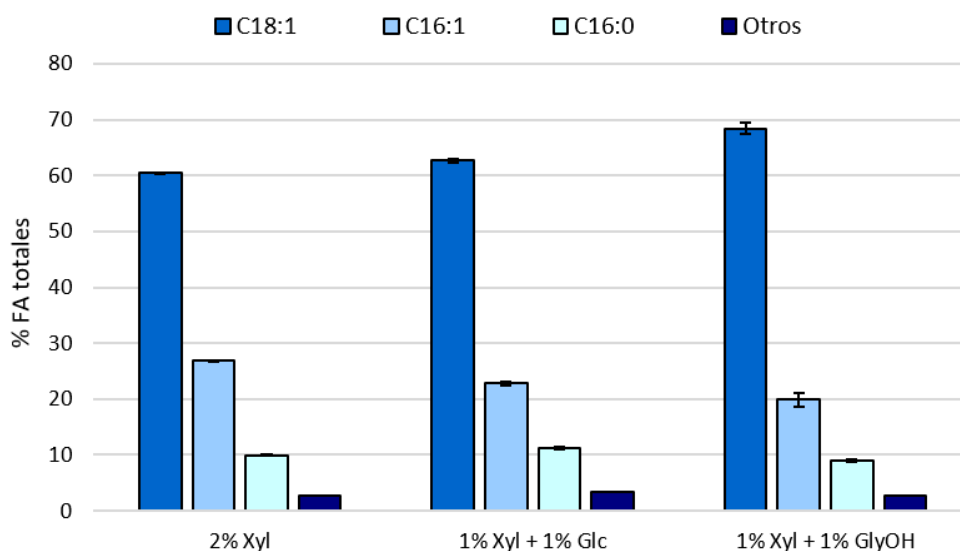


Figura 38. Perfil de ácidos grasos de la cepa A877 en distintos medios líquidos AFM (1% de xilosa + 1% de glucosa; 2% de xilosa; 1% de xilosa + 1% glicerol)

No obstante, el empleo de medios de cultivo con mezcla de distintas fuentes de carbono permitió obtener mayores niveles de producción de lípidos totales en comparación con el empleo de xilosa como única fuente de carbono. De hecho, la cepa A877 alcanzó un 28% de lípidos respecto la biomasa total producida en medios de cultivo con mezcla de distintas fuentes de carbono (Tabla 6).

Tabla 6. Lípidos totales, Títulos y rendimientos de lípidos y biomasa de la cepa A877 en distintos medios líquidos AFM

Medio (AFM)	Lípidos totales (%CDW)	Título lípidos (g _{lípidos} /L _{cultivo})	Rendimiento lípidos (g _{lípidos} /mol _{sustrato})	Rendimiento biomasa (g _{CDW} /mol _{sustrato})
2% Xilosa	25,2 ± 1,7	0,8 ± 0,5	10,7 ± 0,7	42,6 ± 0,7
1% Xilosa + 1% Glucosa	27,9 ± 3,2	1,4 ± 0,2	26,2 ± 2,8	106,3 ± 3,0
1% Xilosa + 1% Glicerol	28,0 ± 1,9	1,7 ± 0,1	12,9 ± 0,3	47,6 ± 3,6

*Los valores representados son los máximos obtenidos a partir de las 96 horas de cultivo.

En el medio con 1% de xilosa suplementado con 1% de glucosa se observa un aumento del título de lípidos y del rendimiento de lípidos producidos por mol de sustrato consumido (Tabla 6). La producción de lípidos microbianos depende principalmente de la disponibilidad de precursores inmediatos como el AcCoA y del suministro continuo de NADPH como poder reductor (Ratledge 2004). El requerimiento de NADPH, tanto para la reducción de la xilosa por medio de la XR (Fig. 32) como para la producción de lípidos, puede producir un desequilibrio de cofactores en la cepa A877. La utilización de cultivos basados en mezcla de distintas fuentes de carbono permitiría superar este desequilibrio de cofactores, ya que el cultivo es capaz de alcanzar la suficiente biomasa gracias a la utilización de glucosa como fuente de carbono durante las primeras etapas de crecimiento. La glucosa permitiría restaurar un equilibrio de cofactores que parece ser crucial durante la germinación de las esporas y las primeras etapas de crecimiento de la cepa A877 de *A. gossypii*.

En el medio con 1% de xilosa suplementado con 1% de glicerol también se observa un aumento del título de lípidos y del rendimiento de lípidos producidos por mol de sustrato consumido (Tabla 6). La restauración del equilibrio de cofactores por medio de la utilización de glicerol como fuente de carbono podría atribuirse al NADH generado en la transformación del glicerol a dihidroxiacetona-P (Fig. 5). Además, se observa un ligero aumento del título y del rendimiento de lípidos producidos por mol de sustrato consumido. Este aumento de la producción lipídica podría deberse a la presencia de glicerol en el medio de cultivo, ya que el glicerol es precursor de la biosíntesis de triglicéridos (Fig. 24) (Z. Wang et al. 2001). Sin embargo, el rendimiento de biomasa producida por mol de sustrato consumido permaneció similar al observado en el medio con xilosa como única fuente de carbono (Tabla 6). La ausencia de diferencias en el rendimiento de la biomasa producida entre el medio con 1% de xilosa suplementado con 1% de glicerol y el medio con xilosa como única fuente de carbono podría explicarse por el hecho de que el glicerol sea el principal precursor en la biosíntesis de triglicéridos y, por tanto, se utilice principalmente para la biosíntesis de lípidos en lugar de la generación de biomasa durante la fase estacionaria del experimento. Esto no ocurre en el medio con 1% de xilosa suplementado con 1% de glucosa, en el que aumenta tanto el rendimiento de biomasa producida como el rendimiento de lípidos producidos por mol de sustrato consumido.

5. APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN *Ashbya gossypii*

La cepa A877 presenta unos niveles elevados de producción lipídica cuando se cultiva en medios con mezcla de distintas fuentes de carbono sintéticas, como xilosa-glucosa (27,9% de lípidos respecto a la biomasa total producida) y xilosa-glicerol (28% de lípidos respecto a la biomasa total producida). Estos resultados anteriormente descritos sugieren que la cepa A877 (Tabla 1) puede ser un biocatalizador prometedor para la producción de lípidos microbianos a partir de hidrolizados lignocelulósicos ricos en xilosa mezclados con otras fuentes de carbono de bajo costo, como las melazas de caña de azúcar o el glicerol crudo. Por consiguiente, se decidió analizar la producción lipídica de la cepa A877 en medios de cultivo con diferentes formulaciones de residuos industriales, cuyas concentraciones de azúcares se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración inicial de carbohidratos en residuos industriales

Medio	Concentración (g/L)				
	Xilosa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Glicerol
100% CCh¹	20,4 ± 7,7	-	-	-	-
50% CCh²	12,3 ± 0,8	-	-	-	-
4% melazas³	-	25,13 ± 0,1	-	-	-
50% CCh + 4% melazas	15,1 ± 1,4	20,3 ± 5,4	2,6 ± 0,7	-	-
50% CCh + 1% glicerol crudo⁴	12,9 ± 0,3	-	-	-	13,5 ± 0,5

¹Hidrolizados lignocelulósicos de mazorcas de maíz desgranadas (*Corn Cob*) sin diluir

²CCh diluido con agua al 50%

³Melazas de caña de azúcar

⁴Subproducto generado en la producción de biodiesel

5.1. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos para producción de lípidos en *A. gossypii*

De manera análoga al estudio realizado en medios de cultivo sintéticos, se realizó un análisis del crecimiento y la producción de lípidos de la cepa A877 en comparación con la cepa parental A729 (Tabla 1). Se emplearon medios con hidrolizados lignocelulósicos de mazorcas de maíz desgranadas (raquis de maíz, *Corn Cob*, CCh) como única fuente de carbono. Los hidrolizados fueron preparados y detoxificados de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.1.1 de “Materiales y Métodos” para minimizar la concentración de inhibidores del crecimiento tales como ácidos orgánicos y derivados de furano (Cunha et

al. 2019). La concentración inicial de azúcares de los medios utilizados se muestra en la Tabla 7. La cepa A729 se cultivó en medios con CCh sin diluir (100% v/v: 2,04% de xilosa), mientras que la cepa A877 fue cultivada en CCh diluido al 50% v/v (1,23% de xilosa) previendo que podría mostrar el defecto de crecimiento observado en los medios sintéticos y, por tanto, siendo innecesaria la utilización de un medio de cultivo con mayores concentraciones de xilosa.

Respecto al crecimiento y el consumo de xilosa, los resultados obtenidos en los medios de cultivo que contienen CCh son similares a los observados en los medios sintéticos con xilosa como única fuente de carbono. La cepa A877 sólo consumió el 43,1% de la xilosa presente en el medio a las 168 h de cultivo; por el contrario, la cepa A729 había consumido el 88,3% de la xilosa del medio a las 36 horas, siendo capaz de metabolizar completamente toda la xilosa del medio de cultivo (Fig. 39). De hecho, el agotamiento de la fuente de carbono provoca un proceso de lisis celular en la cepa A729 desde las 60 h de cultivo.

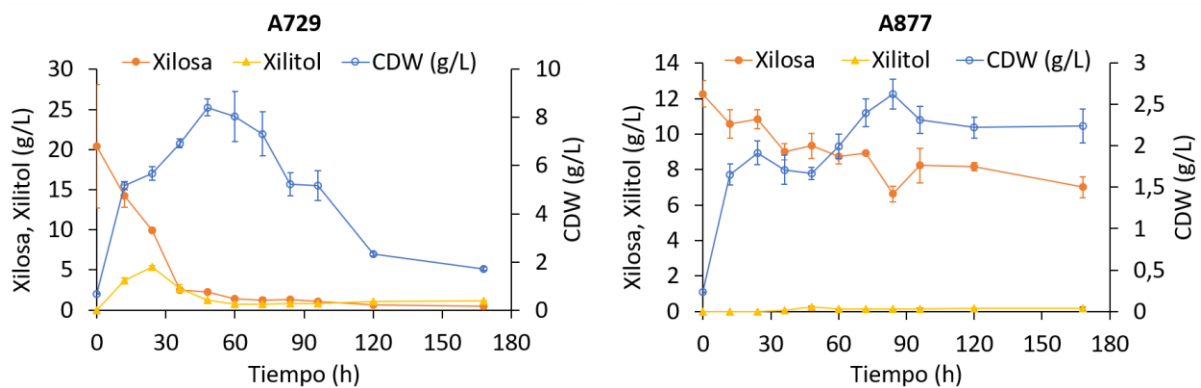


Figura 39. Crecimiento, consumo de xilosa y producción de xilitol de las cepas A729 y A877 en medio líquido CCh

La cepa A877 presentó un claro defecto en el crecimiento similar al descrito en los medios sintéticos AFM con 2% de xilosa como única fuente de carbono (Fig. 36). No obstante, a pesar de este defecto en el crecimiento, los resultados mostraron una mayor producción lipídica de la cepa A877: $29,02 \pm 0,01$ % de lípidos respecto de la biomasa total producida a las 96 horas, es decir, 1,87 veces más que la cepa parental A729 (Fig. 40).

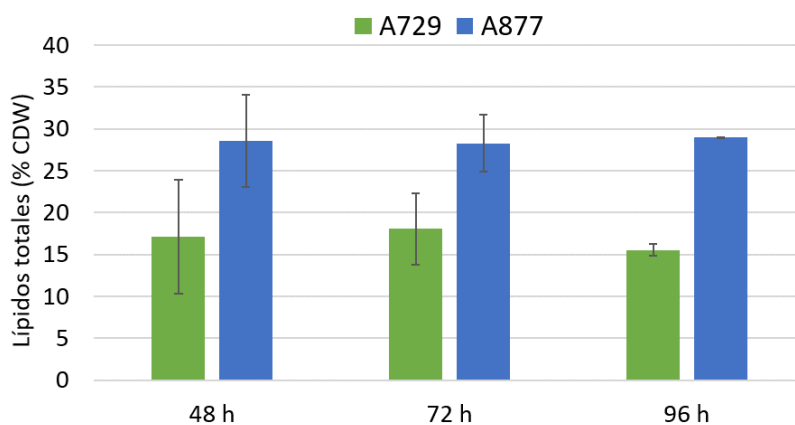


Figura 40. Producción lipídica de las cepas A729 y A877 en medio líquido CCh

Estos resultados demuestran que la cepa A877 tiene una alta capacidad lipídica; sin embargo, el defecto del crecimiento resulta incompatible con el establecimiento de un bioproceso eficiente. Por tanto, la idea de utilizar mezclas de distintos residuos industriales en cultivos de la cepa A877 se consideró como una estrategia adecuada, tanto para aumentar la producción lipídica como para prevenir el defecto en el crecimiento. La co-utilización de azúcares compuestos derivados de hidrolizados ricos en pentosas y melazas también se ha descrito para la producción de etanol en *S. cerevisiae*, así como en co-cultivos de *S. cerevisiae* y *S. stipitis* (Brar et al. 2019), apoyando así nuestra estrategia para la valorización de formulaciones mixtas de residuos industriales.

5.2. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos suplementados con melazas de caña de azúcar para producción de lípidos en *A. gossypii*

El empleo de medios de cultivo con mezclas de distintas fuentes de carbono mejora notablemente la capacidad lipídica de la cepa A877. El aumento en la producción de lípidos es especialmente destacable en los medios con mezcla de xilosa y glucosa sintética (Tabla 6). Por este motivo, en primer lugar, nos centramos en caracterizar la cepa A877, en comparación con la cepa A729, en medios de cultivo con formulaciones mixtas de residuos industriales: CCh, ricos en xilosa, y melazas de caña de azúcar, ricas en sacarosa.

Las cepas A729 y A877 fueron cultivadas en medios con 50% v/v de CCh detoxificado suplementado con 4% p/v de melazas de caña de azúcar, cuya concentración inicial de carbohidratos se indica en la Tabla 7. La producción de biomasa y el consumo de azúcares se registraron hasta que se agotó la fuente de carbono, observándose que ambas cepas pudieron utilizar la xilosa y la sacarosa de los medios de cultivo para la producción de biomasa (Fig. 41). Sin embargo, la cepa A729 apenas presenta consumo de xilosa hasta después de las 48-60 h de cultivo, a diferencia de la cepa A877 que mantiene una tasa de consumo de xilosa sostenida desde las 24 h de cultivo. Además, la cepa A877 pudo

consumir simultáneamente todos los azúcares, consumiendo la sacarosa más rápidamente que la cepa A729.

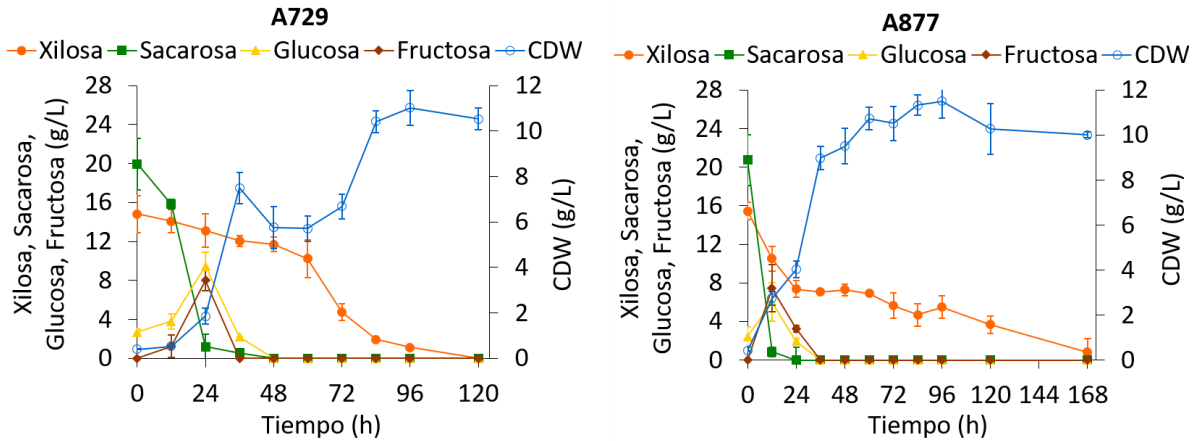


Figura 41. Producción de biomasa y consumo de azúcares de las cepas A729 y A877 en medio líquido con mezcla de 50% CCh + 4% melazas

Al contrario que la cepa A877, la cepa A729 sufrió un ciclo de esporulación cuando las hexosas (glucosa y fructosa), procedentes de la sacarosa de las melazas, se agotaron en el medio de cultivo (36-48 h) (Fig. 41). Este efecto podría explicarse por una diferente tasa de consumo de xilosa, glucosa y fructosa entre las cepas A729 y A877, pudiendo además haber contribuido la ausencia de esporulación de la cepa A877 a aumentar el rendimiento en la producción de biomasa de esta cepa respecto de la cepa A729 (Tabla 8).

El análisis cuantitativo de la producción total de lípidos mostró nuevamente la alta capacidad lipídica de la cepa A877, llegando a alcanzar un $38,1 \pm 1,5$ % de lípidos respecto de la biomasa total producida cuando se agotó la fuente de carbono; es decir, 2,4 veces superior que el contenido lipídico total observado en la cepa A729 (Fig. 42).

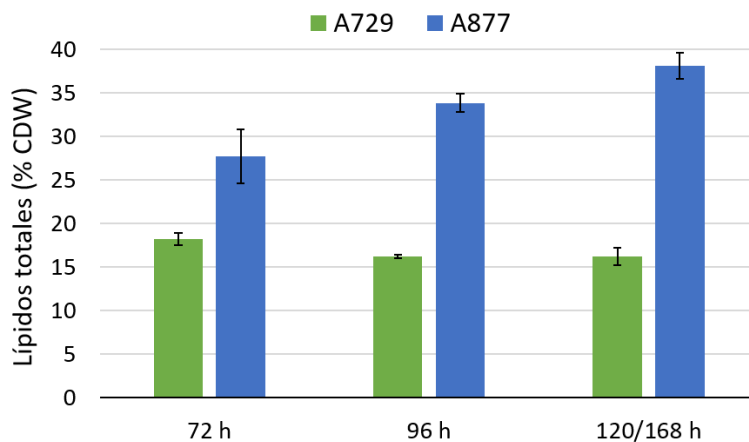


Figura 42. Producción lipídica de las cepas A729 y A877 en medio líquido con mezcla de 50% CCh + 4% melazas

El análisis detallado de parámetros de crecimiento y producción lipídica reveló que el título de lípidos alcanzado por la cepa A877 en el medio con CCh y melazas de caña de azúcar (Tabla 8) fue 2,7 veces más alto que el obtenido en medio sintético AFM con 1% de xilosa suplementado con 1% de glucosa (Tabla 6). Además, la producción de lípidos totales respecto de la biomasa total en la cepa A877 en el medio con CCh y melazas de caña de azúcar fue 2,1 veces superior a la producción alcanzada por la cepa A729 en este mismo medio y 1,3 veces superior a la producción alcanzada por la cepa A877 en el medio con CCh y glicerol crudo (Tabla 8).

Tabla 8. Lípidos totales, títulos y rendimientos de lípidos y biomasa en medio CCh, melazas y glicerol crudo A729 y A877

Cepa	Medio	Lípidos totales (%CDW)	Título lípidos (g lípidos/L cultivo)	Rendimiento lípidos (g lípidos/mol sustrato)	Rendimiento biomasa (g CDW/mol sustrato)
A729	50% CCh + 4% melazas	18,2 ± 0,7	1,8 ± 0,1	12,0 ± 0,8	73,8 ± 5,2
	50% CCh + 1% glicerol crudo	17,5 ± 0,5	1,7 ± 0,1	7,9 ± 0,4	45,5 ± 5,3
A877	50% CCh + 4% melazas	38,1 ± 1,5	3,9 ± 0,1	30,7 ± 0,9	90,7 ± 5,9
	50% CCh + 1% glicerol crudo	29,3 ± 0,8	3,0 ± 0,2	15,4 ± 0,8	53,2 ± 3,1

El efecto positivo de la utilización de formulaciones mixtas de residuos industriales se pudo comprobar comparando la producción lipídica total de la cepa A877 en distintos medios de cultivo: medio con 50% v/v de CCh detoxificado, medio con 4% p/v melazas con caña de azúcar y medio con una mezcla de ambos residuos industriales. El contenido lipídico total más elevado se alcanzó en el medio con 50% v/v de CCh detoxificado suplementado con 4% p/v de melazas de caña de azúcar (38,1 ± 1,5% lípidos respecto de la biomasa total producida) a las 120-168 h (Fig. 43). Estos resultados son similares a lo observado en *Trichosporon fermentans*, el cual muestra un incremento de su contenido lipídico cuando se emplean medios de cultivo basados en formulaciones mixtas de hidrolizados de planta de batata y melazas de caña de azúcar en comparación a fermentaciones realizadas en medios con melazas como única fuente de carbono (Shen et al. 2015).

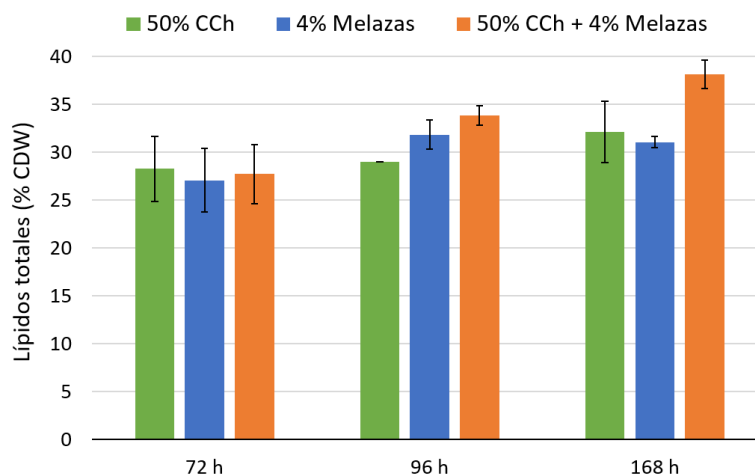


Figura 43. Producción lipídica de la cepa A877 en medio líquido con 50% CCh, 4% de melazas y mezcla de 50% CCh + 4% melazas

La utilización de xilosa en *A. gossypii* en las primeras etapas del cultivo puede verse obstaculizada por una cantidad insuficiente de biomasa, lo que provoca un retraso del inicio de la fase de crecimiento exponencial (fase *lag*) (Fig. 18, 21). Sin embargo, la actividad invertasa extracelular de *A. gossypii* responsable de la hidrólisis de la sacarosa (Aguiar et al. 2014), libera azúcares de hexosa (glucosa y fructosa) que promueven el crecimiento celular durante las primeras etapas de cultivo, disminuyendo así la fase *lag* cuando *A. gossypii* crece en medio con 50% v/v de CCh detoxificado suplementado con 4% p/v melazas de caña de azúcar. Las hexosas liberadas por la hidrólisis de la sacarosa permitirían restaurar el equilibrio de cofactores crucial durante la germinación de las esporas y las primeras etapas de crecimiento de la cepa A877 de *A. gossypii*, al igual que ocurre en el medio sintético con mezcla de xilosa y glucosa.

Estos resultados demuestran que la co-fermentación de hidrolizados lignocelulósicos ricos en xilosa junto con melazas ricas en sacarosa es una estrategia novedosa y eficaz para la producción de lípidos microbianos en *A. gossypii*.

5.3. Utilización de hidrolizados de residuos lignocelulósicos suplementados con glicerol crudo para producción de lípidos en *A. gossypii*

Se ha descrito un aumento de la producción de biolípidos en *Cryptococcus curvatus* empleando formulaciones mixtas de hidrolizados lignocelulósicos y glicerol crudo (Gong et al. 2016). En *A. gossypii*, el empleo de medios de cultivo sintéticos con mezcla de xilosa y glicerol mejora notablemente la capacidad lipídica de la cepa A877 (Tabla 6). Por tanto, decidimos caracterizar la cepa A877, en comparación con la cepa A729, en medios de cultivo con formulaciones mixtas de CCh, ricos en xilosa, y glicerol crudo.

Se llevó a cabo un análisis del crecimiento de las cepas A729 y A877 en medios de cultivo con 50% v/v de CCh detoxificado suplementado con 1% p/v de glicerol crudo (Fig. 44). Los resultados obtenidos revelaron que la cepa A729 era capaz de utilizar el glicerol y la xilosa de manera simultánea; sin embargo, la cepa A877 exhibió una tasa de consumo más baja para la xilosa. La co-utilización de glicerol y xilosa al comienzo del cultivo también se ha descrito en la preparación de hidrolizados lignocelulósicos de mazorca de maíz desgranadas y glicerol crudo para la producción de lípidos en el microorganismo *C. curvatus* (Gong et al. 2016).

Durante el cultivo de la cepa A729 se observó la acumulación de xilitol (alcanzando un máximo de 2,54 g/L a las 60h), que podría deberse a la saturación de la actividad enzimática de la XDH. Sin embargo, no se detectó acumulación de xilitol en el medio de cultivo en la cepa A877 (Fig. 44). La menor demanda de NADPH para la biosíntesis lipídica de la cepa A729 podría promover un aumento de la actividad de la enzima XR dependiente de NADPH, contribuyendo así a la saturación de la XDH, y por consiguiente a la acumulación de xilitol. Por otro lado, la mayor capacidad lipídica de la cepa A877 podría restringir la utilización de NADPH de la enzima XR, lo que limitaría el consumo de xilosa y la acumulación de xilitol. Una posible forma de evitar este desequilibrio de cofactores y aumentar la tasa de consumo de xilosa de la cepa A877 podría conseguirse mediante la expresión de genes heterólogos para la utilización de xilosa con diferentes requerimientos respecto al uso de cofactores, como los genes codificantes de XR y XDH de levaduras fermentadoras de xilosa de manera innata (Cunha et al. 2019).

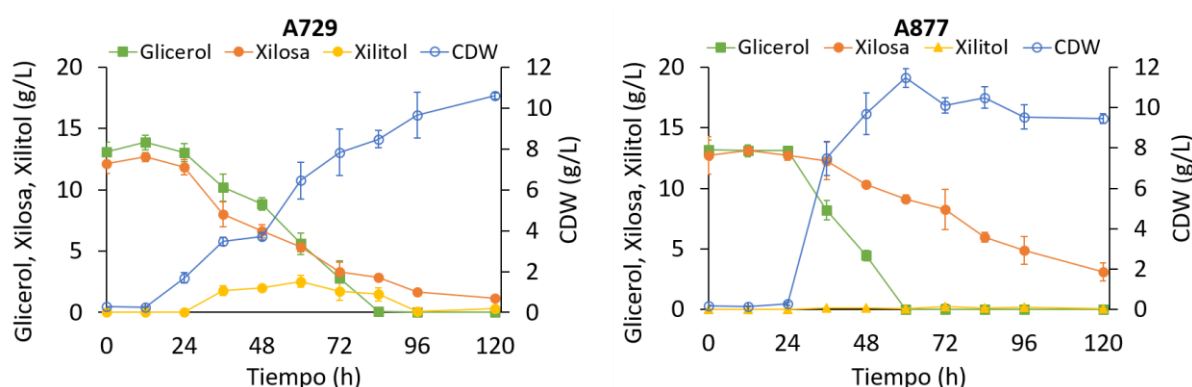


Figura 44. Producción de biomasa y consumo de azúcares de las cepas A729 y A877 en medio líquido con mezcla de 50% CCh + 1% glicerol crudo

El análisis de la producción lipídica en los cultivos con mezclas de CCh suplementado con glicerol crudo mostró un mayor título de lípidos totales (3 g/L) de la cepa A877 respecto a la cepa A729 (Tabla 8; Fig. 45). De hecho, la cepa A877 alcanzó un $29,3 \pm 0,8\%$ de lípidos respecto de la biomasa total producida, demostrando nuevamente la eficiencia de esta

cepa para la utilización de mezclas de residuos industriales. No obstante, se puede apreciar que el rendimiento de la producción de lípidos es inferior en este medio respecto al medio CCh suplementado con melazas de caña de azúcar, lo cual podría deberse al mayor grado de lisis micelial observado en las fases finales del cultivo.

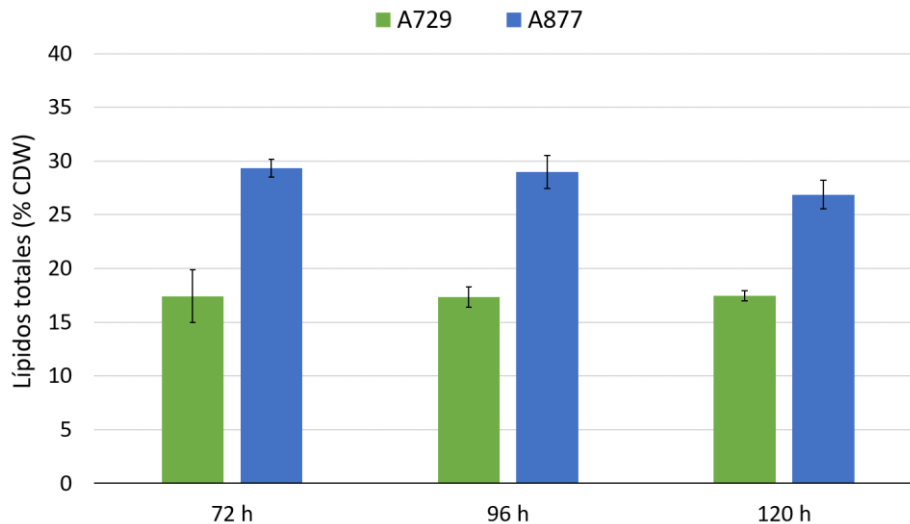


Figura 45. Lípidos totales respecto al CDW de las cepas A729 y A877 en medio líquido con mezcla de 50% CCh + 1% glicerol crudo

La co-fermentación de glicerol crudo junto a otros suplementos, como extracto de levadura o sulfato de amonio, ha sido descrita en estudios similares, obteniéndose títulos de lípidos que oscilan entre 0,8 y 1,3 g/L en *Y. lipolitica* (Poli et al. 2014). Asimismo, se ha empleado *Clostridium diolis* para la producción de 1,3-propanodiol mediante la fermentación conjunta de glicerol y azúcares mixtos, poniendo de manifiesto la importancia de aumentar la proporción de NADH/NAD⁺ intracelular para la producción de compuestos de alto valor añadido a partir de medios de cultivo con mezclas de distintas fuentes de carbono (Xin et al. 2016). La importancia de una proporción adecuada de poder reductor dentro de la célula y la optimización de los parámetros de cultivo, condiciones de oxigenación y densidades del inóculo, pueden contribuir a aumentar aún más la producción lipídica (Rakicka et al. 2015).

CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados muestran la capacidad de *A. gossypii* de ser utilizado como chasis biotecnológico para la valorización de residuos industriales hacia la producción de compuestos de alto valor añadido, como los lípidos microbianos. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* codifican XR, XDH y XKS en *A. gossypii*.
2. La sobreexpresión de los genes *ACL107C*, *ABR229C* y *AGR324C* de *A. gossypii* es necesaria y suficiente para permitir el uso de xilosa como única fuente de carbono, siendo la capacidad de crecimiento de la cepa mutante GXX similar a la observada cuando se emplea glucosa como fuente de carbono.
3. Los genes *AFL204C*, *AFL205C* y *AFL207C* están implicados en el transporte de azúcares en *A. gossypii*.
4. La sobreexpresión de un alelo mutante *afl205c-N355V* mejora significativamente el uso de xilosa en presencia de glucosa en *A. gossypii*.
5. El bloqueo de la β -oxidación combinada con la sobreexpresión de las rutas XR-XDH-XK y fosfoacetolasa (cepa GXX-PX) en *A. gossypii* permite canalizar el flujo metabólico hacia la biosíntesis de lípidos, alcanzándose un 13% de lípidos totales respecto de la biomasa total en un medio con xilosa como única fuente de carbono.
6. La sobreexpresión de una copia adicional del gen *DGA1* de *A. gossypii* en combinación con la sobreexpresión del alelo mutante *acc1^{S659A, S115A}* y la expresión de la proteína Mga2- Δ C-term en la cepa GXX-PX produce un aumento de la producción de biolípidos hasta un 25,2% de lípidos totales respecto de la biomasa total en un medio con xilosa como única fuente de carbono.
7. *A. gossypii* es capaz de crecer utilizando residuos industriales como fuente de carbono. La co-fermentación de hidrolizados lignocelulósicos CCh ricos en xilosa junto con melazas de caña de azúcar ricas en sacarosa es una estrategia novedosa y eficaz que mejora notablemente la producción de lípidos microbianos en *A. gossypii*, alcanzando el 38,1% de lípidos respecto de la biomasa total producida. *A. gossypii* también es capaz de crecer utilizando mezclas de hidrolizados lignocelulósicos CCh suplementados con glicerol crudo, alcanzando un 29,3% de lípidos totales respecto de la biomasa total.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, Tatiana Q., Cláudia Dinis, Frederico Magalhaes, Carla Oliveira, Marilyn G. Wiebe, Merja Penttila, and Lucília Domingues. 2014. "Molecular and Functional Characterization of an Invertase Secreted by *Ashbya Gossypii*." *Molecular Biotechnology* 56 (6): 524–34. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9726-9>.
- Aguiar, Tatiana Q., Rui Silva, and Lucília Domingues. 2017. "New Biotechnological Applications for *Ashbya Gossypii*: Challenges and Perspectives." *Bioengineered* 8 (4): 309–15. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1234543>.
- Ashby, SF, and W Nowell. 1926. "The Fungi of Stigmatomycosis." *Ann Bot* 40: 69–84.
- Bamba, Takahiro, Tomohisa Hasunuma, and Akihiko Kondo. 2016. "Disruption of PHO13 Improves Ethanol Production via the Xylose Isomerase Pathway." *AMB Express* 6 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0175-7>.
- Beopoulos, Athanasios, Julien Cescut, Ramdane Haddouche, Jean Louis Uribelarrea, Carole Molina-Jouve, and Jean Marc Nicaud. 2009. "Yarrowia Lipolytica as a Model for Bio-Oil Production." *Progress in Lipid Research* 48 (6): 375–87. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.
- Beopoulos, Athanasios, Jean Marc Nicaud, and Claude Gaillardin. 2011. "An Overview of Lipid Metabolism in Yeasts and Its Impact on Biotechnological Processes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (4): 1193–1206. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>.
- Berg, JM, JL Tymoczko, and L Stryer. 2002. "20.3 the Pentose Phosphate Pathway Generates NADPH and Synthesizes Five-Carbon Sugars." In *Biochemistry*, edited by W H Freeman, 5th editio. New York.
- Branco, Ricardo F., Julio C. dos Santos, Boutros F. Sarrouh, Juan D. Rivaldi, Adalberto Pessoa, and Silvio S. da Silva. 2009. "Profiles of Xylose Reductase, Xylitol Dehydrogenase and Xylitol Production under Different Oxygen Transfer Volumetric Coefficient Values." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84 (3): 326–30. <https://doi.org/10.1002/jctb.2042>.
- Brar, K. K., D. Agrawal, B. S. Chadha, and Hung Lee. 2019. "Evaluating Novel Fungal Secretomes for Efficient Saccharification and Fermentation of Composite Sugars Derived from Hydrolysate and Molasses into Ethanol." *Bioresource Technology* 273 (September): 114–21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.004>.
- Brouns, Stan J. J., Matthijs M. Jore, Magnus Lundgren, Edze R. Westra, Rik J. H. Slijkhuis, Ambrosius P. L. Snijders, Mark J. Dickman, Kira S. Makarova, Eugene V. Koonin, and John van der Oost. 2008. "Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes." *Science* 321 (5891): 960–64. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.
- Chaiyaso, Thanongsak, Atchara Manowattana, Charin Techapun, and Masanori Watanabe. 2019. "Efficient Bioconversion of Enzymatic Corn cob Hydrolysate into Biomass and Lipids by Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Paludigenum* KM281510." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 49 (6): 545–56. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591985>.
- Chen, Haiqin, Guangfei Hao, Lei Wang, Hongchao Wang, Zhennan Gu, Liming Liu, Hao Zhang, Wei Chen, and Yong Q. Chen. 2015. "Identification of a Critical Determinant That Enables Efficient Fatty Acid Synthesis in Oleaginous Fungi." *Scientific Reports* 5 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep11247>.
- Chen, Liwei, Jianhua Zhang, Jaslyn Lee, and Wei Ning Chen. 2014. "Enhancement of Free Fatty

- Acid Production in *Saccharomyces Cerevisiae* by Control of Fatty Acyl-CoA Metabolism.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (15): 6739–50. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5758-8>.
- Chen, Rachel, and Jennifer Dou. 2015. “Biofuels and Bio-Based Chemicals from Lignocellulose: Metabolic Engineering Strategies in Strain Development.” *Biotechnology Letters* 38 (2): 213–21. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1976-0>.
- Converti, Attilio, Mario Zilli, Patrizia Perego, and Marco Del Borghi. 1988. “Inhibiting Factors in the Continuous Production of Ethanol from Molasses.” *Resources, Conservation and Recycling* 1 (2): 81–95. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(88\)90045-6](https://doi.org/10.1016/0921-3449(88)90045-6).
- Cunha, Joana T., Pedro O. Soares, Aloia Romaní, Johan M. Thevelein, and Lucília Domingues. 2019. “Xylose Fermentation Efficiency of Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast with Separate or Combined Xylose Reductase/Xylitol Dehydrogenase and Xylose Isomerase Pathways.” *Biotechnology for Biofuels* 12 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>.
- Demeke, Mekonnen M, Heiko Dietz, Yingying Li, María R Foulquié-Moreno, Sarma Mutturi, Sylvie Deprez, Tom Den Abt, et al. 2013. “Development of a D-Xylose Fermenting and Inhibitor Tolerant Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* Strain with High Performance in Lignocellulose Hydrolysates Using Metabolic and Evolutionary Engineering.” *Biotechnology for Biofuels* 6 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-89>.
- Díaz-Fernández, David, Tatiana Q. Aguiar, Victoria Isabel Martín, Aloia Romaní, Rui Silva, Lucília Domingues, José Luis Revuelta, and Alberto Jiménez. 2019. “Microbial Lipids from Industrial Wastes Using Xylose-Utilizing *Ashbya Gossypii* Strains.” *Bioresource Technology* 293 (December): 122054. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122054>.
- Díaz-Fernández, David, Patricia Lozano-Martínez, Rubén M Buey, José Luis Revuelta, and Alberto Jiménez. 2017. “Utilization of Xylose by Engineered Strains of *Ashbya Gossypii* for the Production of Microbial Oils.” *Biotechnology for Biofuels*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0685-9>.
- Dietrich, Fred S, Sylvia Voegeli, Sophie Brachat, Anita Lerch, Krista Gates, Sabine Steiner, Christine Mohr, et al. 2004. “The *Ashbya Gossypii* Genome as a Tool for Mapping the Ancient *Saccharomyces Cerevisiae* Genome.” *Science (New York, N.Y.)* 304 (5668): 304–7. <https://doi.org/10.1126/science.1095781>.
- Duthie, S J. 1999. “Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of DNA Instability.” *British Medical Bulletin* 55 (3): 578–92.
- Eliasson, A, C Christensson, C F Wahlbom, and B Hahn-Hägerdal. 2000. “Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3381–86.
- Engler, Carola, Ramona Gruetzner, Romy Kandzia, and Sylvestre Marillonnet. 2009. “Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes.” *PLoS ONE* 4 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>.
- European Commission. 2018. *A Sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the Connection between Economy, Society and the Environment*. <https://doi.org/10.2777/478385>.

- Farwick, Alexander, Stefan Bruder, Virginia Schadeweg, Mislav Oreb, and Eckhard Boles. 2014. "Engineering of Yeast Hexose Transporters to Transport D -Xylose without Inhibition by D -Glucose." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (14): 5159–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>.
- Folch, Jordi, M. Lees, and H. Sloane Stanley. 1987. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues." *The Journal of Biological Chemistry* 55 (5): 999–1033. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2011.03.005>.
- Friedlander, Jonathan, Vasiliki Tsakraklides, Annapurna Kamineni, Emily H. Greenhagen, Andrew L. Consiglio, Kyle MacEwen, Donald V. Crabtree, et al. 2016. "Engineering of a High Lipid Producing *Yarrowia Lipolytica* Strain." *Biotechnology for Biofuels* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0492-3>.
- Ganatsios, Vassilios, Athanasios A. Koutinas, Argyro Bekatorou, Vassilios Panagopoulos, Ibrahim M. Banat, Antonia Terpou, and Nikolaos Kopsahelis. 2017. "Porous Cellulose as Promoter of Oil Production by the Oleaginous Yeast *Lipomyces Starkeyi* Using Mixed Agroindustrial Wastes." *Bioresource Technology* 244 (July): 629–34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.163>.
- Gancedo, J M. 1998. "Yeast Carbon Catabolite Repression." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62 (2): 334–61.
- Gao, Difeng, Jijiao Zeng, Yubin Zheng, Xiaochen Yu, and Shulin Chen. 2013. "Microbial Lipid Production from Xylose by *Mortierella Isabellina*." *Bioresource Technology* 133: 315–21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.132>.
- Garrote, Gil, Remedios Yáñez, José Luis Alonso, and Juan Carlos Parajó. 2008. "Coproduction of Oligosaccharides and Glucose from Corncobs by Hydrothermal Processing and Enzymatic Hydrolysis." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 47 (4): 1336–45. <https://doi.org/10.1021/ie071201f>.
- Gattiker, Alexandre, Riccarda Rischatsch, Philippe Demougin, Sylvia Voegeli, Fred S Dietrich, Peter Philippsen, and Michael Primig. 2007. "Transcriptome Browser for Yeast Biologists" 7: 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-9>.
- Gong, Zhiwei, Wenting Zhou, Hongwei Shen, Zongbao K. Zhao, Zhonghua Yang, Jiabao Yan, and Mi Zhao. 2016. "Co-Utilization of Corn Stover Hydrolysates and Biodiesel-Derived Glycerol by *Cryptococcus Curvatus* for Lipid Production." *Bioresource Technology* 219: 552–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.021>.
- Güldener, Ulrich, Susanne Heck, Thomas Fiedler, Jens Beinhauer, Johannes H Hegemann, Justus-liebig-universität Gießen, and Frankfurter Straße. 1996. "A New Efficient Gene Disruption Cassette for Repeated Use in Budding Yeast." *Nucleic Acids Research* 24 (13): 2519–24.
- Hall, J, and F Solehdin. 1998. "Folic Acid for the Prevention of Congenital Anomalies." *European Journal of Pediatrics* 157 (6): 445–50.
- Hao, Guangfei, Haiqin Chen, Zhennan Gu, Hao Zhang, Wei Chen, and Yong Q. Chen. 2015. "Metabolic Engineering of *Mortierella Alpina* for Arachidonic Acid Production with Glycerol as Carbon Source." *Microbial Cell Factories* 14 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0392-4>.
- Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams, and Amit K. Jaiswal. 2019. "Lignocellulosic Biorefineries in

- Europe: Current State and Prospects.” *Trends in Biotechnology* 37 (3): 231–34. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.002>.
- Huang, Chao, Xue fang Chen, Lian Xiong, Xin de Chen, Long long Ma, and Yong Chen. 2013. “Single Cell Oil Production from Low-Cost Substrates: The Possibility and Potential of Its Industrialization.” *Biotechnology Advances* 31 (2): 129–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.010>.
- Jeong, Bo Young, Christoph Wittmann, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park. 2015. “Comparative Metabolic Flux Analysis of an Ashbya Gossypii Wild Type Strain and a High Riboflavin-Producing Mutant Strain.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119 (1): 101–6. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.014>.
- Jeppsson, Marie, and Marie F Gorwa-grauslund. 2002. “Reduced Oxidative Pentose Phosphate Pathway Flux in Recombinant Xylose-Utilizing *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Improves the Ethanol Yield from Xylose.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4): 1604–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1604>.
- Jiménez, Alberto, Gloria Muñoz-Fernández, Rodrigo Ledesma-Amaro, Rubén M. Buey, and José L. Revuelta. 2019. “One-Vector CRISPR/Cas9 Genome Engineering of the Industrial Fungus *Ashbya Gossypii*.” *Microbial Biotechnology* 12 (6): 1293–1301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13425>.
- Jin, Yong Su, and Thomas W. Jeffries. 2004. “Stoichiometric Network Constraints on Xylose Metabolism by Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Metabolic Engineering* 6 (3): 229–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.11.006>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science* 337 (6096): 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Johansson, Björn, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 2002. “The Non-Oxidative Pentose Phosphate Pathway Controls the Fermentation Rate of Xylulose but Not of Xylose in *Saccharomyces Cerevisiae* TMB3001.” *FEMS Yeast Research* 2 (3): 277–82. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00114-9).
- Jong, Bouke Wim De, Shuobo Shi, Verena Siewers, and Jens Nielsen. 2014. “Improved Production of Fatty Acid Ethyl Esters in *Saccharomyces Cerevisiae* through Up-Regulation of the Ethanol Degradation Pathway and Expression of the Heterologous Phosphoketolase Pathway.” *Microbial Cell Factories* 13 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-39>.
- Kaliszewski, Paweł, Anna Szkopińska, Thierry Ferreira, Ewa Świeżewska, Thierry Berges, and Teresa Zoładek. 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*.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781 (10): 627–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2008.07.011>.
- Kamat, Srijay, Mahesh Khot, Smita Zinjarde, Ameeta RaviKumar, and Wasudeo Namdeo Gade. 2013. “Coupled Production of Single Cell Oil as Biodiesel Feedstock, Xylitol and Xylanase from Sugarcane Bagasse in a Biorefinery Concept Using Fungi from the Tropical Mangrove

- Wetlands.” *Bioresource Technology* 135: 246–53.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.059>.
- Karhumaa, Kaisa, Rosa Garcia Sanchez, Bärbel Hahn-Hägerdal, and Marie F. Gorwa-Grauslund. 2007. “Comparison of the Xylose Reductase-Xylitol Dehydrogenase and the Xylose Isomerase Pathways for Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Microbial Cell Factories* 6: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-5>.
- Kato, Tatsuya, and Enoch Y Park. 2012. “Riboflavin Production by *Ashbya Gossypii*.” *Biotechnology Letters* 34 (4): 611–18. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0833-z>.
- Kim, Il-Kwon, António Roldão, Verena Siewers, and Jens Nielsen. 2012. “A Systems-Level Approach for Metabolic Engineering of Yeast Cell Factories.” *FEMS Yeast Research* 12 (2): 228–48. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00779.x>.
- Kim, Sang-Yong, Jung-Hoe Kim, and Deok-Kum Oh. 1997. “Improvement of Xylitol Production by Controlling Supply in *Candida Parapsilosis*.” *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (3): 267–70.
- Kim, Soo Rin, Yong-Cheol Park, Yong-Su Jin, and Jin-Ho Seo. 2013. “Strain Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* for Enhanced Xylose Metabolism.” *Biotechnology Advances* 31 (6): 851–61. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.004>.
- Kim, Soo Rin, Haiqing Xu, Anastashia Lesmana, Uros Kuzmanovic, Matthew Au, Clarissa Florencia, Eun Joong Oh, Guochang Zhang, Kyoung Heon Kim, and Yong-Su Jin. 2015. “Deletion of PHO13, Encoding Haloacid Dehalogenase Type IIA Phosphatase, Results in Upregulation of the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Applied and Environmental Microbiology* 81 (5): 1601–9. <https://doi.org/10.1128/aem.03474-14>.
- Koch, Barbara, Claudia Schmidt, and Günther Daum. 2014. “Storage Lipids of Yeasts: A Survey of Nonpolar Lipid Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*, *Pichia Pastoris*, and *Yarrowia Lipolytica*.” *FEMS Microbiology Reviews* 38 (5): 892–915. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12069>.
- Kuyper, Marko, Harry R. Harhangi, Ann Kristin Stave, Aaron A. Winkler, Mike S.M. Jetten, Wim T.A.M. De Laat, Jan J.J. Den Ridder, Huub J.M. Op Den Camp, Johannes P. Van Dijken, and Jack T. Pronk. 2003. “High-Level Functional Expression of a Fungal Xylose Isomerase: The Key to Efficient Ethanolic Fermentation of Xylose by *Saccharomyces Cerevisiae*?” *FEMS Yeast Research* 4 (1): 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7).
- Kwak, Suryang, and Yong Su Jin. 2017. “Production of Fuels and Chemicals from Xylose by Engineered *Saccharomyces Cerevisiae*: A Review and Perspective.” *Microbial Cell Factories* 16 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0694-9>.
- Leandro, Maria José, César Fonseca, and Paula Gonçalves. 2009. “Hexose and Pentose Transport in Ascomycetous Yeasts: An Overview.” *FEMS Yeast Research* 9 (4): 511–25. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x>.
- Leber, Christopher, and Nancy A. Da Silva. 2014. “Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae* for the Synthesis of Short Chain Fatty Acids.” *Biotechnology and Bioengineering* 111 (2): 347–58. <https://doi.org/10.1002/bit.25021>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Ruben M. Buey, and Jose Luis Revuelta. 2015. “Increased Production of Inosine and Guanosine by Means of Metabolic Engineering of the Purine Pathway in *Ashbya*

- Gossypii." *Microbial Cell Factories* 14 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0234-4>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2018. "Pathway Grafting for Polyunsaturated Fatty Acids Production in *Ashbya Gossypii* through Golden Gate Rapid Assembly." *ACS Synthetic Biology* 7 (10): 2340–47. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00287>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Eduard J Kerkhoven, José Luis Revuelta, and Jens Nielsen. 2014. "Genome Scale Metabolic Modeling of the Riboflavin Overproducer *Ashbya Gossypii*." *Biotechnology and Bioengineering* 111 (6): 1191–99. <https://doi.org/10.1002/bit.25167>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Zbigniew Lazar, Magdalena Rakicka, Zhongpeng Guo, Florian Fouchard, Anne Marie Cruz Le Coq, and Jean Marc Nicaud. 2016. "Metabolic Engineering of *Yarrowia Lipolytica* to Produce Chemicals and Fuels from Xylose." *Metabolic Engineering* 38: 115–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.07.001>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, Patricia Lozano-Martínez, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2015. "Engineering *Ashbya Gossypii* for Efficient Biolipid Production." *Bioengineered* 6 (2): 119–23. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1011525>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, and Jean Marc Nicaud. 2016. "*Yarrowia Lipolytica* as a Biotechnological Chassis to Produce Usual and Unusual Fatty Acids." *Progress in Lipid Research* 61: 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.001>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, María-Angeles Santos, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2014a. "Tuning Single-Cell Oil Production in *Ashbya Gossypii* by Engineering the Elongation and Desaturation Systems." *Biotechnology and Bioengineering* 111 (9): 1782–91. <https://doi.org/10.1002/bit.25245>.
- Ledesma-Amaro, Rodrigo, María A Santos, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2014b. "Strain Design of *Ashbya Gossypii* for Single-Cell Oil Production." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (4): 1237–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.03560-13>.
- Lennen, Rebecca M., and Brian F. Pflieger. 2013. "Microbial Production of Fatty Acid-Derived Fuels and Chemicals." *Current Opinion in Biotechnology* 24 (6): 1044–53. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.028>.
- Li, Haibo, and Hal S. Alper. 2016. "Enabling Xylose Utilization in *Yarrowia Lipolytica* for Lipid Production." *Biotechnology Journal* 11 (9): 1230–40. <https://doi.org/10.1002/biot.201600210>.
- Liu, Leqian, Kelly Markham, John Blazeck, Nijia Zhou, Dacia Leon, Peter Otoupal, and Hal S. Alper. 2015. "Surveying the Lipogenesis Landscape in *Yarrowia Lipolytica* through Understanding the Function of a Mga2p Regulatory Protein Mutant." *Metabolic Engineering* 31: 102–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.07.004>.
- Lozano-Martínez, Patricia, Rubén M. Buey, Rodrigo Ledesma-Amaro, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2017. "Engineering *Ashbya Gossypii* Strains for de Novo Lipid Production Using Industrial By-Products." *Microbial Biotechnology* 10 (2): 425–33. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12487>.
- Martin, Charles E., Chan Seok Oh, and Yide Jiang. 2007. "Regulation of Long Chain Unsaturated Fatty Acid Synthesis in Yeast." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771 (3): 271–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.010>.
- Mateos, Laura, Alberto Jiménez, José Luis Revuelta, and María A Santos. 2006. "Purine

- Biosynthesis , Riboflavin Production , and Trophic-Phase Span Are Controlled by a Myb-Related Transcription Factor in the Fungus *Ashbya Gossypii* †.” *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 5052–60. <https://doi.org/10.1128/AEM.00424-06>.
- Mert, M. J., S. H. Rose, D. C. la Grange, T. Bamba, T. Hasunuma, A. Kondo, and W. H. van Zyl. 2017. “Quantitative Metabolomics of a Xylose-Utilizing *Saccharomyces Cerevisiae* Strain Expressing the Bacteroides Thetaiotaomicron Xylose Isomerase on Glucose and Xylose.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44 (10): 1459–70. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1969-1>.
- Moreira Dos Santos, Margarida, Vijayendran Raghevendran, Peter Kötter, Lisbeth Olsson, and Jens Nielsen. 2004. “Manipulation of Malic Enzyme in *Saccharomyces Cerevisiae* for Increasing NADPH Production Capacity Aerobically in Different Cellular Compartments.” *Metabolic Engineering* 6 (4): 352–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.06.002>.
- Natter, Klaus, and Sepp D. Kohlwein. 2013. “Yeast and Cancer Cells - Common Principles in Lipid Metabolism.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (2): 314–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2012.09.003>.
- Niehus, Xochitl, Anne Marie Crutz-Le Coq, Georgina Sandoval, Jean Marc Nicaud, and Rodrigo Ledesma-Amaro. 2018. “Engineering *Yarrowia Lipolytica* to Enhance Lipid Production from Lignocellulosic Materials.” *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1010-6>.
- Oreb, Mislav, Heiko Dietz, Alexander Farwick, and Eckhard Boles. 2012. “Novel Strategies to Improve Co-Fermentation of Pentoses with D-Glucose by Recombinant Yeast Strains in Lignocellulosic Hydrolysates.” *Bioengineered* 3 (6): 347–51. <https://doi.org/10.4161/bioe.21444>.
- Ostergaard, Simon, Lisbeth Olsson, Mark Johnston, and Jens Nielsen. 2000. “Increasing Galactose Consumption by *Saccharomyces Cerevisiae* through Metabolic Engineering of the GAL Gene Regulatory Network.” *Nature Biotechnology* 18 (12): 1283–86. <https://doi.org/10.1038/82400>.
- Özcan, Sabire, and Mark Johnston. 1999. “Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (3): 554–69. <https://doi.org/10.1128/mnbr.63.3.554-569.1999>.
- Papini, Marta, Intawat Nookaew, Verena Siewers, and Jens Nielsen. 2012. “Physiological Characterization of Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Expressing the *Aspergillus Nidulans* Phosphoketolase Pathway: Validation of Activity through ¹³C-Based Metabolic Flux Analysis.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (4): 1001–10. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3936-0>.
- Parreiras, Lucas S., Laura B. Willis, Brandi L. Bonfert, David H. Keating, Deepti Tanjore, Tongjun Liu, Edward L. Pohlmann, et al. 2014. “Engineering and Two-Stage Evolution of a Lignocellulosic Hydrolysate-Tolerant *Saccharomyces Cerevisiae* Strain for Anaerobic Fermentation of Xylose from AFEX Pretreated Corn Stover.” *PLoS ONE* 9 (9): e107499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107499>.
- Pfleger, Brian F., Michael Gossing, and Jens Nielsen. 2015. “Metabolic Engineering Strategies for Microbial Synthesis of Oleochemicals.” *Metabolic Engineering* 29: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.009>.

- Poirier, Yves, Vasily D. Antonenkov, Tuomo Glumoff, and J. Kalervo Hiltunen. 2006. "Peroxisomal β -Oxidation-A Metabolic Pathway with Multiple Functions." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763 (12): 1413–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.034>.
- Poli, Jandora Severo, Mirra Angelina Neres da Silva, Ezequias P. Siqueira, Vânia M.D. Pasa, Carlos Augusto Rosa, and Patricia Valente. 2014. "Microbial Lipid Produced by *Yarrowia Lipolytica* QU21 Using Industrial Waste: A Potential Feedstock for Biodiesel Production." *Bioresource Technology* 161 (2014): 320–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>.
- Powers, H J, and D I Thurnham. 1981. "Riboflavin Deficiency in Man: Effects on Haemoglobin and Reduced Glutathione in Erythrocytes of Different Ages." *The British Journal of Nutrition* 46 (2): 257–66.
- Qiao, Kangjian, Syed Hussain Imam Abidi, Hongjuan Liu, Haoran Zhang, Sagar Chakraborty, Nicki Watson, Parayil Kumaran Ajikumar, and Gregory Stephanopoulos. 2015. "Engineering Lipid Overproduction in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Metabolic Engineering* 29: 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.005>.
- Qiao, Kangjian, Thomas M. Wasylenko, Kang Zhou, Peng Xu, and Gregory Stephanopoulos. 2017. "Lipid Production in *Yarrowia Lipolytica* Is Maximized by Engineering Cytosolic Redox Metabolism." *Nature Biotechnology* 35 (2): 173–77. <https://doi.org/10.1038/nbt.3763>.
- Qin, Lei, Lu Liu, An Ping Zeng, and Dong Wei. 2017. "From Low-Cost Substrates to Single Cell Oils Synthesized by Oleaginous Yeasts." *Bioresource Technology* 245: 1507–19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>.
- Rakicka, Magdalena, Zbigniew Lazar, Thierry Dulermo, Patrick Fickers, and Jean Marc Nicaud. 2015. "Lipid Production by the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* Using Industrial By-Products under Different Culture Conditions." *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0286-z>.
- Raschmanová, Hana, Astrid Weninger, Anton Glieder, Karin Kovar, and Thomas Vogl. 2018. "Implementing CRISPR-Cas Technologies in Conventional and Non-Conventional Yeasts: Current State and Future Prospects." *Biotechnology Advances* 36 (3): 641–65. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>.
- Ratledge, Colin. 2004. "Fatty Acid Biosynthesis in Microorganisms Being Used for Single Cell Oil Production." *Biochimie* 86 (11): 807–15. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>.
- Ratledge, Colin, and James P. Wynn. 2002. "The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms." *Advances in Applied Microbiology* 51: 1–52. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(02\)51000-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(02)51000-5).
- Ravindran, Rajeev, and Amit K. Jaiswal. 2016. "Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products." *Trends in Biotechnology* 34 (1): 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>.
- Reifenberger, Elke, Eckhard Boles, and Michael Ciriacy. 1997. "Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and Their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression." *European Journal of Biochemistry* 245 (2): 324–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x>.
- Revueleta, José Luis, Rodrigo Ledesma-Amaro, Patricia Lozano-Martinez, David Díaz-Fernández, Rubén M. Buey, and Alberto Jiménez. 2017. "Bioproduction of Riboflavin: A Bright Yellow

- History.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44 (4–5): 659–65. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7>.
- Ribeiro, Orquídea, Lucília Domingues, Merja Penttilä, and Marilyn G Wiebe. 2012. “Nutritional Requirements and Strain Heterogeneity in *Ashbya Gossypii*.” *Journal of Basic Microbiology* 52 (5): 582–89. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100383>.
- Rivas, Beatriz, Paolo Torre, José Manuel Domínguez, Attilio Converti, and Juan Carlos Parajó. 2006. “Purification of Xylitol Obtained by Fermentation of Corncob Hydrolysates.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (12): 4430–35. <https://doi.org/10.1021/jf053156x>.
- Rossi, Giorgia, Michael Sauer, Danilo Porro, and Paola Branduardi. 2010. “Effect of HXT1 and HXT7 Hexose Transporter Overexpression on Wild-Type and Lactic Acid Producing *Saccharomyces Cerevisiae* Cells.” *Microbial Cell Factories* 9: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-15>.
- Ruan, Zhenhua, Michael Zanotti, Xiaoqing Wang, Chad Ducey, and Yan Liu. 2012. “Evaluation of Lipid Accumulation from Lignocellulosic Sugars by *Mortierella Isabellina* for Biodiesel Production.” *Bioresource Technology* 110: 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.053>.
- Ruhal, Rohit, Shivang Aggarwal, and Bijan Choudhury. 2011. “Suitability of Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Waste for the Production of Trehalose and Propionic Acid.” *Green Chemistry* 13 (12): 3492–98. <https://doi.org/10.1039/c1gc15847c>.
- Sandager, Line, Maria H. Gustavsson, Ulf Ståhl, Anders Dahlqvist, Eva Wiberg, Antoni Banas, Marit Lenman, Hans Ronne, and Sten Stymne. 2002. “Storage Lipid Synthesis Is Non-Essential in Yeast.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 6478–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109109200>.
- Sarria, Stephen, Nicholas S. Kruyer, and Pamela Peralta-Yahya. 2017. “Microbial Synthesis of Medium-Chain Chemicals from Renewables.” *Nature Biotechnology* 35 (12): 1158–66. <https://doi.org/10.1038/nbt.4022>.
- Sato, Trey K., Dana J. Wohlbach, Lucas S. Parreiras, Audrey P. Gasch, Shweta Deshpande, Donald Busalacchi, Benjamin D. Bice, et al. 2013. “Harnessing Genetic Diversity in *Saccharomyces Cerevisiae* for Fermentation of Xylose in Hydrolysates of Alkaline Hydrogen Peroxide-Pretreated Biomass.” *Applied and Environmental Microbiology* 80 (2): 540–54. <https://doi.org/10.1128/aem.01885-13>.
- Schlösser, Thomas, Andreas Wiesenburg, Cornelia Gätgens, Andreas Funke, Ulrike Viets, Swaminathan Vijayalakshmi, Susanne Nieland, and K. Peter Stahmann. 2007. “Growth Stress Triggers Riboflavin Overproduction in *Ashbya Gossypii*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3): 569–78. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1075-9>.
- Schneiter, R., and G. Daum. 2006. “Extraction of Yeast Lipids.” *Methods in Molecular Biology* 313: 41–45. <https://doi.org/10.1385/1-59259-958-3:041>.
- Schoenen, J, J Jacquy, and M Lenaerts. 1998. “Effectiveness of High-Dose Riboflavin in Migraine Prophylaxis. A Randomized Controlled Trial.” *Neurology* 50 (2): 466–70.
- Serrano-Amatriain, Cristina, Rodrigo Ledesma-Amaro, Rubén López-Nicolás, Gaspar Ros, Alberto Jiménez, and José Luis Revuelta. 2016. “Folic Acid Production by Engineered *Ashbya Gossypii*.” *Metabolic Engineering* 38 (June): 473–82. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.011>.

- Shen, Qi, Hui Lin, Qun Wang, Xiaoping Fan, Yuyi Yang, and Yuhua Zhao. 2015. "Sweetpotato Vines Hydrolysate Promotes Single Cell Oils Production of *Trichosporon Fermentans* in High-Density Molasses Fermentation." *Bioresource Technology* 176: 249–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.045>.
- Shi, Shuobo, Yun Chen, Verena Siewers, and Jens Nielsen. 2014. "Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1." *MBio* 5 (3): 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01130-14.Editor>.
- Shields-Menard, Sara A., Marta Amirsadeghi, W. Todd French, and Raj Boopathy. 2018. "A Review on Microbial Lipids as a Potential Biofuel." *Bioresource Technology* 259 (January): 451–60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.080>.
- Silva, Gervásio Paulo da, Matthias Mack, and Jonas Contiero. 2009. "Glycerol: A Promising and Abundant Carbon Source for Industrial Microbiology." *Biotechnology Advances* 27 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.
- Silva, Rui, Tatiana Q. Aguiar, Eduardo Coelho, Alberto Jiménez, José Luis Revuelta, and Lucília Domingues. 2019. "Metabolic Engineering of *Ashbya Gossypii* for Deciphering the de Novo Biosynthesis of γ -Lactones." *Microbial Cell Factories* 18 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1113-1>.
- Silverman, Andrew M., Kangjian Qiao, Peng Xu, and Gregory Stephanopoulos. 2016. "Functional Overexpression and Characterization of Lipogenesis-Related Genes in the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (8): 3781–98. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7376-0>.
- Son, Hyeoncheol Francis, Sun Mi Lee, and Kyung Jin Kim. 2018. "Crystal Structure and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Piromyces* Sp. E2." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (4): 571–78. <https://doi.org/10.4014/jmb.1711.11026>.
- Sperduto, R D, T S Hu, R C Milton, J L Zhao, D F Everett, Q F Cheng, W J Blot, L Bing, P R Taylor, and J Y Li. 1993. "The Linxian Cataract Studies. Two Nutrition Intervention Trials." *Archives of Ophthalmology* 111 (9): 1246–53.
- Stahmann, K P., C. Kupp, S. D. Feldmann, and H. Sahm. 1994. "Formation and Degradation of Lipid Bodies Found in the Riboflavin-Producing Fungus *Ashbya Gossypii*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (1): 121–27. <https://doi.org/10.1007/BF00170234>.
- Stahmann, K P, H N Arst, H Althöfer, J L Revuelta, N Monschau, C Schlüpen, C Gätgens, A Wiesenburg, and T Schlösser. 2001. "Riboflavin, Overproduced during Sporulation of *Ashbya Gossypii*, Protects Its Hyaline Spores against Ultraviolet Light." *Environmental Microbiology* 3 (9): 545–50.
- Stahmann, K P, J L Revuelta, and H Seulberger. 2000. "Three Biotechnical Processes Using *Ashbya Gossypii*, *Candida Famata*, or *Bacillus Subtilis* Compete with Chemical Riboflavin Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (5): 509–16.
- Steiner, S, J Wendland, M C Wright, and P Philippsen. 1995. "Homologous Recombination as the Main Mechanism for DNA Integration and Cause of Rearrangements in the Filamentous Ascomycete *Ashbya Gossypii*." *Genetics* 140 (3): 973–87.
- Stincone, Anna, Alessandro Prigione, Thorsten Cramer, Mirjam M. C. Wamelink, Kate Campbell, Eric Cheung, Viridiana Olin-Sandoval, et al. 2015. "The Return of Metabolism: Biochemistry

- and Physiology of the Pentose Phosphate Pathway.” *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 90 (3): 927–63. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>.The.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough, and C. E. Martin. 1990. “The OLE1 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes the $\Delta 9$ Fatty Acid Desaturase and Can Be Functionally Replaced by the Rat Stearoyl-CoA Desaturase Gene.” *Journal of Biological Chemistry* 265 (33): 20144–49.
- Subtil, Thorsten, and Eckhard Boles. 2012. “Competition between Pentoses and Glucose during Uptake and Catabolism in Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Biotechnology for Biofuels* 5 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-14>.
- Tang, Xiaoling, Huixing Feng, and Wei Ning Chen. 2013. “Metabolic Engineering for Enhanced Fatty Acids Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Metabolic Engineering* 16 (1): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.01.003>.
- Vleet, Jennifer Headman Van, Thomas W. Jeffries, and Lisbeth Olsson. 2008. “Deleting the Para-Nitrophenyl Phosphatase (PNPPase), PHO13, in Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Improves Growth and Ethanol Production on d-Xylose.” *Metabolic Engineering* 10 (6): 360–69. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.12.002>.
- Walfridsson, M, M Anderlund, X Bao, and B Hahn- 1997. “Expression of Different Levels of Enzymes from the *Pichia Stipitis* XYL1 and XYL2 Genes in” *Appl Microbiol Biotechnol*, 218–24.
- Wang, Jiancai, Ronghua Xu, Ruling Wang, Mohammad Enamul Haque, and Aizhong Liu. 2016. “Overexpression of Acc Gene from Oleaginous Yeast *Lipomyces Starkeyi* Enhanced the Lipid Accumulation in *Saccharomyces Cerevisiae* with Increased Levels of Glycerol 3-Phosphate Substrates.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 80 (6): 1214–22. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1136883>.
- Wang, Meng, Chenzhao Yu, and Huimin Zhao. 2016. “Identification of an Important Motif That Controls the Activity and Specificity of Sugar Transporters.” *Biotechnology and Bioengineering* 113 (7): 1460–67. <https://doi.org/10.1002/bit.25926>.
- Wang, Zhengxiang, Jian Zhuge, Huiying Fang, and Bernard A. Prior. 2001. “Glycerol Production by Microbial Fermentation: A Review.” *Biotechnology Advances* 19 (3): 201–23. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X).
- Wasylenko, Thomas M., Woo Suk Ahn, and Gregory Stephanopoulos. 2015. “The Oxidative Pentose Phosphate Pathway Is the Primary Source of NADPH for Lipid Overproduction from Glucose in *Yarrowia Lipolytica*.” *Metabolic Engineering* 30: 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.007>.
- Wendland, J, P Knechtle, C Reischung, and P Philippsen. 2000. “PCR-Based Gene Targeting in the Filamentous Fungus *Ashbya Gossypii*.” *Gene* 242: 381–91.
- Wendland, Jürgen, and Andrea Walther. 2005. “*Ashbya Gossypii*: A Model for Fungal Developmental Biology.” *Nature Reviews Microbiology* 3 (5): 421–29. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1148>.
- Wright, Martin C., and Peter Philippsen. 1991. “Replicative Transformation of the Filamentous Fungus *Ashbya Gossypii* with Plasmids Containing *Saccharomyces Cerevisiae* ARS Elements.” *Gene* 109: 99–105.
- Xin, Bo, Yu Wang, Fei Tao, Lixiang Li, Cuiqing Ma, and Ping Xu. 2016. “Co-Utilization of Glycerol and Lignocellulosic Hydrolysates Enhances Anaerobic 1,3-Propanediol Production by

- Clostridium Diolis.” *Scientific Reports* 6 (June): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep19044>.
- Young, Eric M, Alice Tong, Hang Bui, Caitlin Spofford, and Hal S Alper. 2014. “Rewiring Yeast Sugar Transporter Preference through Modifying a Conserved Protein Motif.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1): 131–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311970111>.
- Zhang, Guo-chang, Jing-jing Liu, In lok Kong, Suryang Kwak, and Yong-su Jin. 2015. “Combining C6 and C5 Sugar Metabolism for Enhancing Microbial Bioconversion.” *Current Opinion in Chemical Biology* 29: 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.09.008>.
- Zhang, Shirong, Yitzchak Skalsky, and David J. Garfinkel. 1999. “MGA2 or SPT23 Is Required for Transcription of the $\Delta 9$ Fatty Acid Desaturase Gene, OLE1, and Nuclear Membrane Integrity in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 151 (2): 473–83.
- Zhang, Shuyan, Jeffrey M. Skerker, Charles D. Rutter, Matthew J. Maurer, Adam P. Arkin, and Christopher V. Rao. 2016. “Engineering *Rhodospiridium Toruloides* for Increased Lipid Production.” *Biotechnology and Bioengineering* 113 (5): 1056–66. <https://doi.org/10.1002/bit.25864>.
- Zheng, Zhifu, and Jitao Zou. 2001. “The Initial Step of the Glycerolipid Pathway: Identification of Glycerol 3-Phosphate/Dihydroxyacetone Phosphate Dual Substrate Acyltransferases in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41710–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104749200>.

APÉNDICE

RESEARCH

Open Access



Utilization of xylose by engineered strains of *Ashbya gossypii* for the production of microbial oils

David Díaz-Fernández, Patricia Lozano-Martínez, Rubén M. Buey, José Luis Revuelta^{*†} and Alberto Jiménez^{*†}

Abstract

Background: *Ashbya gossypii* is a filamentous fungus that is currently exploited for the industrial production of riboflavin. The utilization of *A. gossypii* as a microbial biocatalyst is further supported by its ability to grow in low-cost feedstocks, inexpensive downstream processing and the availability of an ease to use molecular toolbox for genetic and genomic modifications. Consequently, *A. gossypii* has been also introduced as an ideal biotechnological chassis for the production of inosine, folic acid, and microbial oils. However, *A. gossypii* cannot use xylose, the most common pentose in hydrolysates of plant biomass.

Results: In this work, we aimed at designing *A. gossypii* strains able to utilize xylose as the carbon source for the production of biolipids. An endogenous xylose utilization pathway was identified and overexpressed, resulting in an *A. gossypii* xylose-metabolizing strain showing prominent conversion rates of xylose to xylitol (up to 97% after 48 h). In addition, metabolic flux channeling from xylulose-5-phosphate to acetyl-CoA, using a heterologous phosphoketolase pathway, increased the lipid content in the xylose-metabolizing strain a 54% over the parental strain growing in glucose-based media. This increase raised to 69% when lipid accumulation was further boosted by blocking the beta-oxidation pathway.

Conclusions: *Ashbya gossypii* has been engineered for the utilization of xylose. We present here a proof-of-concept study for the production of microbial oils from xylose in *A. gossypii*, thus introducing a novel biocatalyst with very promising properties in developing consolidated bioprocessing to produce fine chemicals and biofuels from xylose-rich hydrolysates of plant biomass.

Keywords: *Ashbya gossypii*, Xylose, Xylitol, Metabolic engineering, Lipids

Background

The implementation of novel technologies to produce more sustainable and clean oil-based fuels and chemicals is an important challenge for the industrial biotechnology field. In this context, the use of non-edible oils such as microbial oils represents a sustainable alternative for the production of functional oils and hydrocarbon-based compounds [1].

Microbial oils have several advantages over other oil resources: the fermentative processes are independent

of climate and, more importantly, the use of either waste industrial by-products or plant biomass as substrates for microbial fermentation avoids competition with edible resources and makes the process environmentally friendly [2]. In this regard, the development of novel microbial biocatalysts with different properties in terms of substrate utilization, fermentation conditions, and broad-range compound production is required. Therefore, it is necessary to engineer widely used industrial microorganisms such as bacteria, yeast, and fungi for the efficient utilization of low-cost substrates that can be used for the production of biofuels and other oleochemicals [3–5].

Ashbya gossypii is a filamentous hemiascomycete that is extensively used for the industrial production

*Correspondence: revuelta@usal.es; alji@usal.es

†Alberto Jiménez and José Luis Revuelta contributed equally to this work
Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca,
Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

of riboflavin [6–9]. The use of *A. gossypii* in industry is considered a paradigm of sustainable white biotechnology for the microbial production of riboflavin and other vitamins. Importantly, a large number of genomic, bioinformatic, and biotechnological tools are available for *A. gossypii* [10–12], thus allowing the development of systems metabolic engineering approaches to industrial applications of the fungus. The use of *A. gossypii* for microbial fermentation presents other biotechnological advantages, such as the ability to grow using industrial by-products and low-cost oils, the partial autolysis of its hyphae at late growth phases, and the harvesting of the mycelia by simple filtration [3].

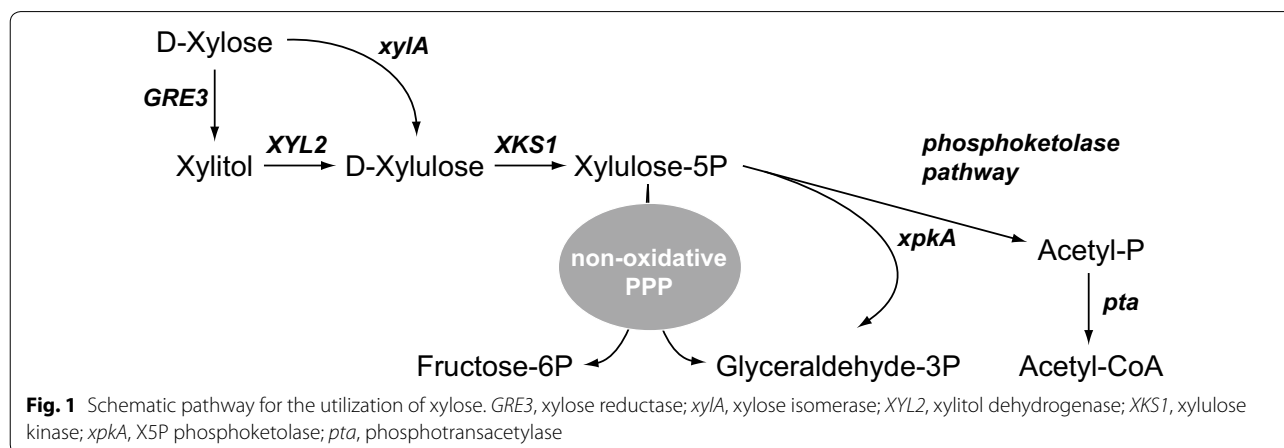
Recently, we have reported engineered strains of *A. gossypii*, which are able to accumulate up to 70% of their cell dry weight (CDW) as lipid content. This was achieved using a multigene approach consisting of both the heterologous overexpression of the ATP-citrate lyase (ACL) activity from *Yarrowia lipolytica* and the inactivation of the endogenous lipid beta-oxidation pathway by *POX1* gene deletion [13]. Metabolic engineering has also been applied to both the fatty acid elongase and desaturase systems with a view to generating novel *A. gossypii* strains that are able to accumulate high-value oil-related compounds. For example, engineered *A. gossypii* strains lacking both very long chain fatty acids and polyunsaturated fatty acids, which are undesired features in biodiesel blends, have been described [14].

The *A. gossypii* industrial fermentations are currently achieved using low-cost plant oils as carbon source. However, as mentioned above, the use of non-edible substrates, such as plant biomass, for microbial bioconversion is gaining much attention during recent years [15]. Therefore, it is required to explore the ability of *A. gossypii* to metabolize C5 sugars, such as D-xylose, present in hydrolysates of plant biomass. So far, it is described that xylose as the only carbon source cannot support

the growth of *A. gossypii*, though it can be converted to xylitol, thus suggesting that *A. gossypii* is equipped both with transporters for pentose sugars and the catalytic machinery for the conversion of D-xylose into xylitol [16]. In this regard, two pathways for the utilization of xylose have been described (Fig. 1): in bacteria and some anaerobic fungi, the conversion of D-xylose to D-xylulose is catalyzed by a xylose isomerase (XI, *xylA*); in yeast, fungi and other eukaryotes the transformation of D-xylose into D-xylulose is accomplished by a two-step pathway which involves both a xylose reductase (XR, *XYL1*, *GRE3*) and a xylitol dehydrogenase (XDH, *XYL2*) [15, 17]. D-xylulose can subsequently enter the non-oxidative pentose phosphate pathway (PPP) after being phosphorylated by xylulose kinase (XK, *XKS1*) into xylulose-5-phosphate (X5P).

Two general strategies have been employed for the construction of xylose-utilizing yeast strains: the overexpression of a bacterial XI along with XK, and the overexpression of a complete XR-XDH-XK pathway [18, 19]. Strains with engineered xylose metabolism combined with additional manipulations have also been described for the production of different high-value chemicals [19]. For example, a recombinant phosphoketolase pathway, which directly channels the X5P carbon flux toward acetate/acetyl-CoA synthesis, has been used for the production of fatty acids and ethanol [20, 21].

Here we describe the development of novel *A. gossypii* strains that have been engineered for the utilization of xylose as carbon source. The overexpression of the native XR-XDH-XK pathway permits *A. gossypii* to grow using xylose as the only carbon source. In addition, further strain engineering using a heterologous phosphoketolase pathway along with the abolition of the beta-oxidation pathway resulted in the isolation of *A. gossypii* strains which are able to produce a high yield of biolipids from xylose as the only carbon source. In sum, we describe a novel microbial biocatalyst, which can be useful for the



production of higher added-value lipids, fine chemicals, and biofuels from xylose-rich biomass. The biotechnological significance and the future applications of these strains are further discussed.

Results

Identification of the xylose utilization pathway

in *A. gossypii*

Ashbya gossypii is able to accumulate xylitol when xylose is used as the carbon source [16], suggesting that a metabolic pathway for xylose utilization must exist in this fungus. Indeed, a putative XR-XDH-XK pathway for xylose utilization in *A. gossypii* was found at the KEGG Pathway database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). The sequences of the predicted XR (ACL107Cp), XDH (ABR229Cp), and XK (AGR324Cp) enzymes were obtained and a BLASTP analysis was carried out. The *ACL107C* gene resulted in a syntenic ortholog of the *S. cerevisiae* *GRE3* gene that codes for an aldose reductase. The predicted sequence of the ACL107Cp showed high identity (60–65%) with XR enzymes from Saccharomycetaceae yeast species such as *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida tropicalis*, or *C. dubliniensis*. The *ABR229C* gene showed homology with the *S. cerevisiae* *XYL2* and other XDH-coding orthologs such as *XYL2* from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. Likewise, the *AGR324C* protein showed high similarity (55–65%) with both yeast and fungi XK enzymes from species such as *Saccharomyces cerevisiae*, *S. stipitis*, and *Neurospora crassa*. Consequently, the *A. gossypii* *ACL107C*, *ABR229C*, and *AGR324C* genes were termed as *GRE3*, *XYL2*, and *XKS1*, respectively, due to their homology with the *S. cerevisiae* orthologs.

Overexpression of the xylose utilization pathway

in *A. gossypii*

Ashbya gossypii cannot grow on xylose as the only carbon source, even though a putative XR-XDH-XK pathway was identified to be encoded in its genome. Gene overexpression of either native or heterologous xylose assimilation pathways (XI-XK or XR-XDH-XK) has been successfully used for the generation of different bacterial or yeast strains able to metabolize xylose [15]. Therefore, we wished to analyze whether boosting the native pathway for xylose utilization (XR-XDH-XK) can improve the ability of *A. gossypii* to grow on xylose as the only carbon source.

The generation of a triple (*GRE3*, *XYL2*, and *XKS1*) overexpressing strain was achieved after three rounds of transformations, as depicted in Fig. 2a. The overexpression of the genes *GRE3*, *XYL2*, and *XKS1* in the triple mutant strain (A665-GXX strain) was confirmed by qRT-PCR (Fig. 2b). All three genes showed mRNA levels

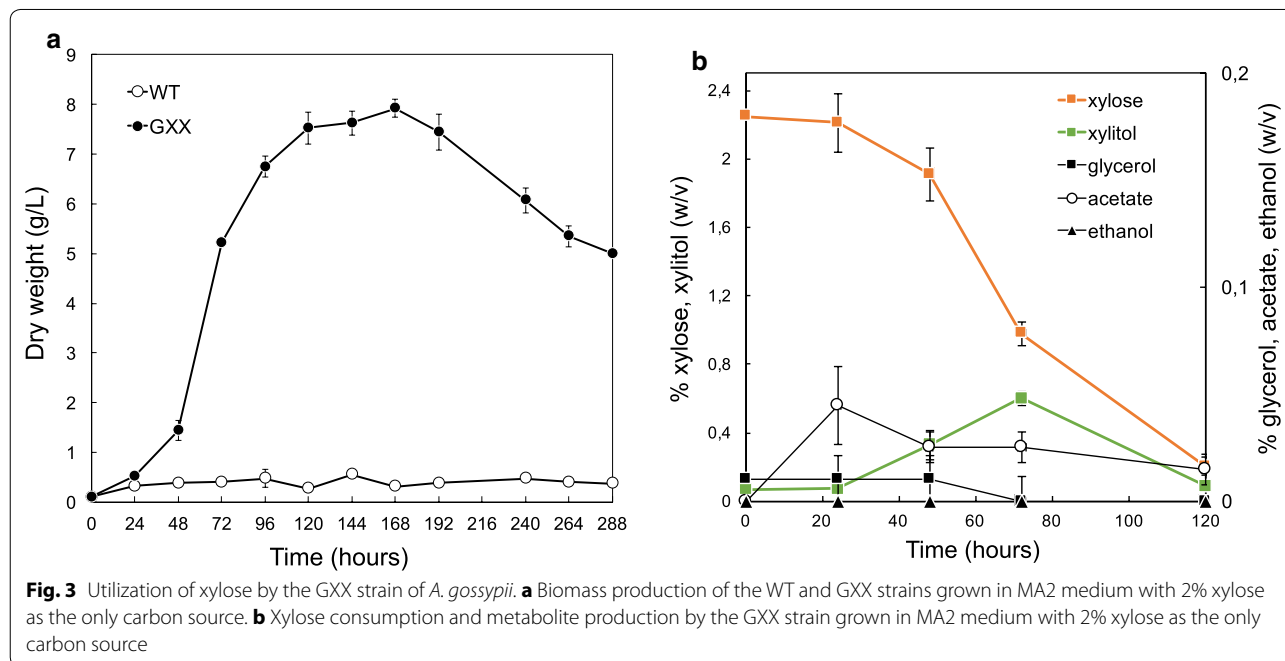
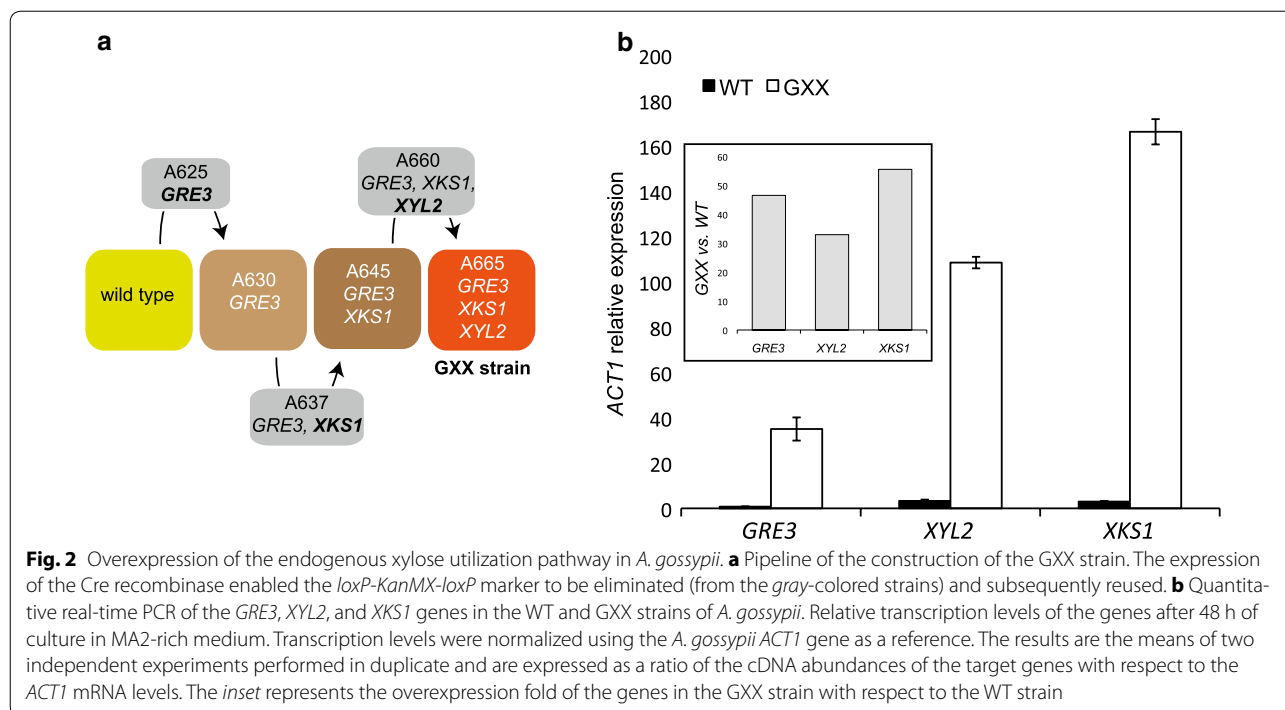
in the GXX strain 30- to 50-fold higher than in the wild-type strain.

The ability of the GXX strain in utilizing xylose was evaluated in flask cultures during 12 days using MA2-rich media with 2% xylose as the only carbon source. The GXX strain showed exponential growth (specific growth rate $\mu_{\text{xyI}} = 0.0537 \text{ h}^{-1}$) during the first 72 h of culture in xylose-based media (Fig. 3a). Unexpectedly, the GXX strain was able to produce more biomass in xylose-based media (7–8 g/L of biomass) than in glucose-based media (6–7 g/L of biomass) (Fig. 3a; Additional file 1). In addition, we found that the germination of the spores from the GXX strain was significantly delayed in xylose-based media compared to glucose-based media (Fig. 3a; Additional file 1). Accordingly, the consumption of xylose was very low until sufficient biomass was reached in the culture (Fig. 3a, b). The specific consumption rate of xylose during the exponential growth of the GXX strain in MA2-rich media with 2% xylose was 0.226 mmol/g/h. Excretion of xylitol to the culture media occurred soon after the xylose started to be consumed. The concentration of xylitol in the supernatant reached 6 g/L after 72 h of culture, but it was subsequently consumed (Fig. 3b). Excretion of other metabolites such as glycerol, acetate, and ethanol was very low (Fig. 3b).

Increasing concentrations of xylose (2, 4, and 8%) were used to further analyze the GXX growth abilities. MA2-rich media with 4% xylose increased significantly the production of biomass without changing the growth kinetics of the GXX strain (Fig. 4a, b). In contrast, the use of MA2-rich media with 8% xylose resulted in a strong delay of the culture for biomass production and an extended trophic phase, which agrees with a lack of xylose consumption during the first 72 h of culture (Fig. 4c). Nevertheless, the production of biomass was maximal with 8% xylose after 264 h of culture, reaching more than 12 g/L of CDW (Fig. 4c).

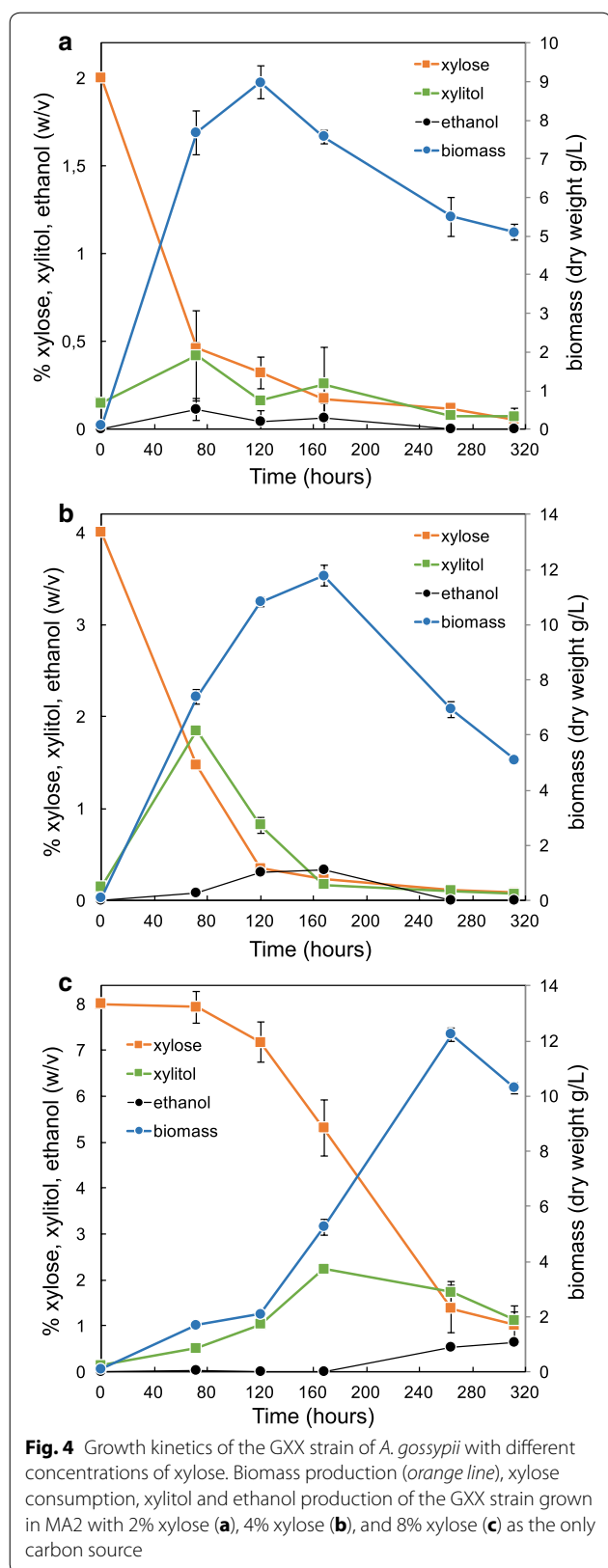
Interestingly, the excretion on xylitol was highest when 1.5–2.5% of xylose was consumed in all conditions that were analyzed, reaching very high concentrations in the culture media (up to 22.6 g/L from 8% xylose media); yet again the excreted xylitol was consumed afterwards (Fig. 4). Ethanol excretion (3–6 g/L) was also detected with 4 and 8% xylose, and the levels of ethanol in the culture media were highest when most of the xylose was consumed (Fig. 4b, c).

As mentioned above, the germination of the spores and, hence, the initiation of the exponential growth was significantly delayed in xylose-based media in comparison with the glucose-based cultures (Fig. 3a; Additional file 1). While MA2 glucose-based media produced high levels of biomass soon after the first 6–8 h, the cultures in MA2 xylose-based media were delayed in the



production of biomass. This phenotype was almost completely restored by the addition of 0.2–0.5% glucose to the xylose-based culture media (Fig. 5a). Accordingly, the xylose began to be consumed earlier during the culture when most of the glucose was exhausted (Fig. 5b, c). Again, a peak of xylitol excretion to the culture media

(8–8.3 g/L) occurred when about 10 g/L of xylose were consumed (48 h of culture). Certain levels of ethanol (up to 1 g/L), produced by fermentation of glucose, were detected in the culture media during the early time-points of the culture, but this ethanol was latter consumed (Fig. 5b, c).



Overall, our results demonstrate that the overexpression of the XR-XDH-XK pathway in *A. gossypii* allows the utilization of xylose and supports growth in xylose-based culture media.

Heterologous overexpression of a phosphoketolase pathway in the GXX strain

The overexpression of the XR-XDH-XK pathway in *A. gossypii* allows channeling the carbon flux from xylose, through X5P, toward the pentose–phosphate pathway. However, our aim in this work was to redirect carbon flux to the production of lipids. Enzymatic activities of the “so called” phosphoketolase pathway are able to catalyze the transformation of X5P into acetyl-CoA (Fig. 1), which is the essential donor molecule for fatty acid (FA) biosynthesis. In this regard, the overexpression of a recombinant phosphoketolase pathway, including the phosphotransacetylase (*pta*) and X5P phosphoketolase (*xpkA*) from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus nidulans*, respectively, has been used for the production of fatty acid ethyl esters from glucose [20]. Therefore, we next decided to overexpress both a X5P phosphoketolase and a phosphotransacetylase in the GXX strain in order to redirect carbon flux to the biosynthesis of acetyl-CoA.

The ORFs of the *B. subtilis pta* and *A. nidulans xpkA* genes were used for the construction of two overexpression cassettes using the strong promoter P_{AgGPD} . All fragments for each overexpression module were assembled following a one-pot DNA-shuffling method (see Additional file 2 and “Methods” section for details). The overexpression cassette for the *pta* gene was targeted to the *ADR304W* locus, while the overexpression cassette for the *xpkA* gene was inserted into the *AGL034C* locus (Additional file 2). The disruption of either *ADR304W* or *AGL034C* does not affect growth in *A. gossypii*, as previously described [13, 14]. The integration of the overexpression cassettes in the target genomic loci of the GXX strain was achieved after two rounds of transformations and it was confirmed by analytical PCR and DNA sequencing.

To confirm the transcription of both *pta* and *xpkA*, total mRNA of the new strain (A729, GXX-PX strain), growth in MA2 rich media with 2% xylose, was analyzed by qRT-PCR. The levels of the *pta* and *xpkA* mRNAs were 50- and 10-fold higher than those of the *UBC6* housekeeping gene taken as a reference, respectively. With regard to the xylose utilization capacities, we did not find differences in growth kinetics between the GXX-PX strain and its parental strain GXX in MA2-rich media with either glucose or xylose as the carbon sources.

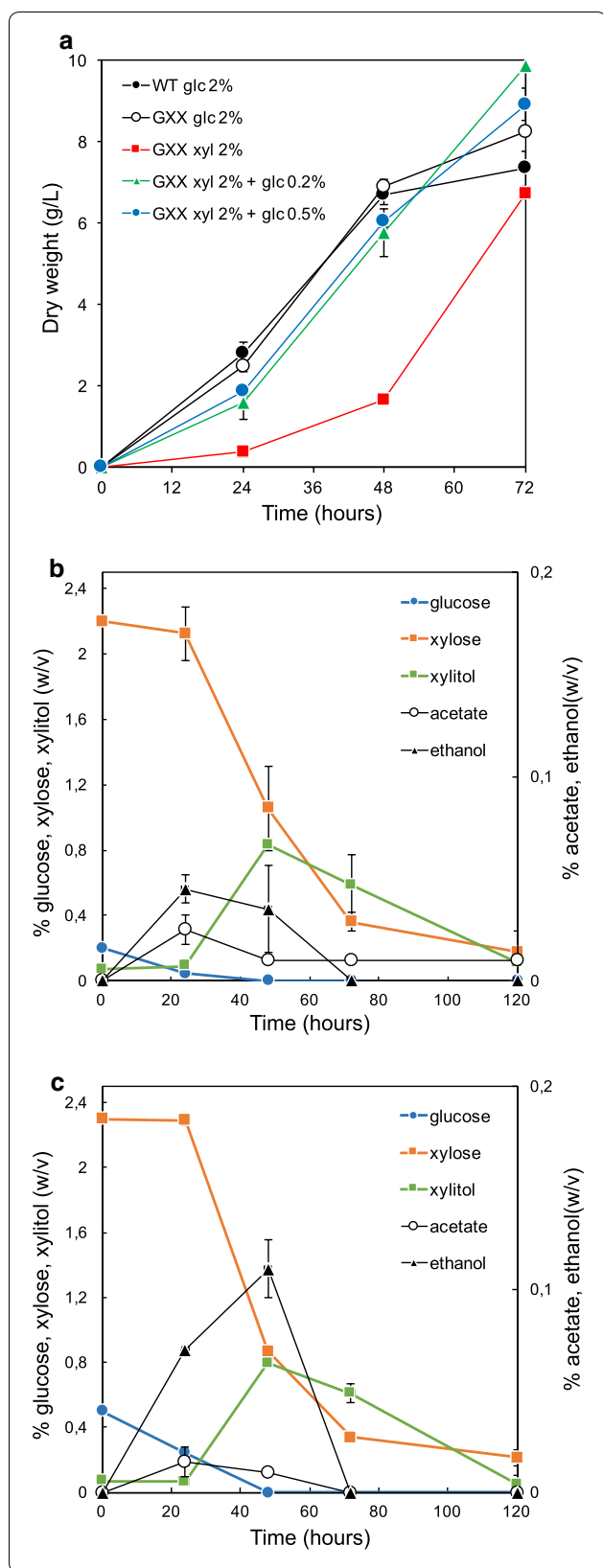
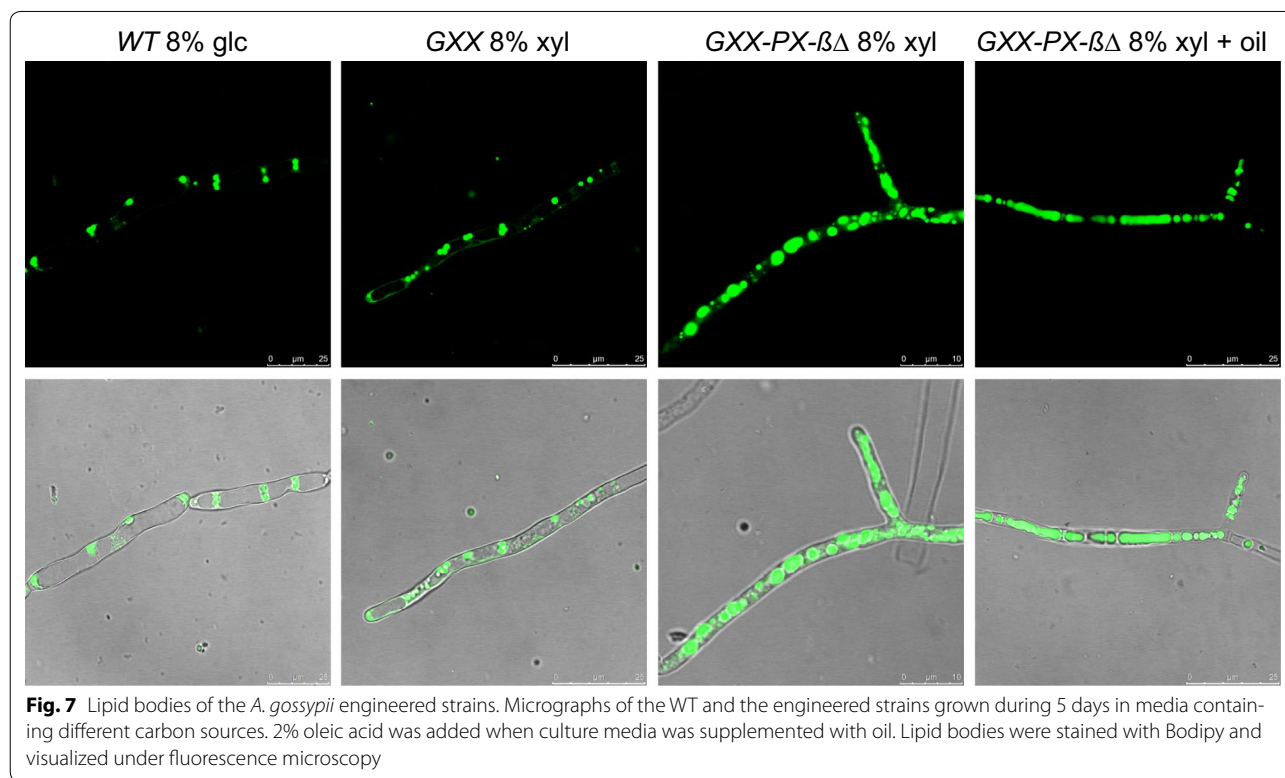
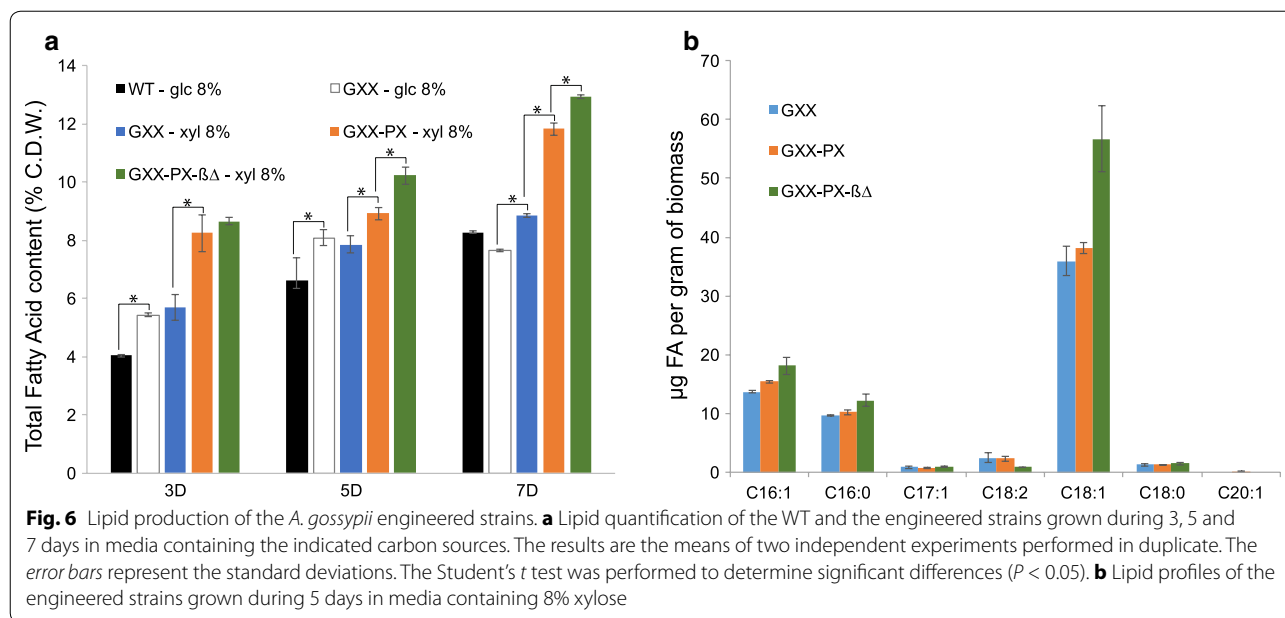


Fig. 5 Growth kinetics of the GXX strain of *A. gossypii* using mixed sugars. **a** Biomass production of the WT and GXX strains at early stages of cultures using different sugar formulations. **b, c** Sugar consumption and metabolite production of the GXX strain grown in MA2 with 2% xylose plus 0.2% glucose (**b**) and 2% xylose plus 0.5% glucose (**c**) as the carbon sources

Lipid production from xylose in engineered strains of *A. gossypii*

We wished to further investigate the lipidogenic capacities of the modified strains GXX and GXX-PX. According to the results shown above, MA2 media with 0.2% glucose plus 8% xylose were used to analyze the total lipid production of the strains GXX and GXX-PX. Lipid content was measured at 3, 5, and 7 days of culture in order to analyze the accumulation of lipids both during the exponential, early productive, and late productive phases of *A. gossypii* culture. MA2 media with 8% glucose were also used as a reference of lipid production of both the wild-type strain and the GXX strain. Surprisingly, the GXX strain showed a 20–40% higher lipid production than the wild-type during the 3–5 days of culture when grown either in glucose or xylose media (Fig. 6a). In addition, the GXX-PX strain showed significantly higher levels of lipid production from xylose, reaching a 12% of CDW after 7 days of culture, thus demonstrating that carbon flux was efficiently channeled toward lipid synthesis in this strain (Fig. 6a).

Lipid accumulation in *A. gossypii* can be further increased through the blocking of the beta-oxidation pathway [13]. Accordingly, the *POX1* gene was deleted in the GXX-PX strain, and the lipid production was measured. The new engineered *GXX-PX-pox1Δ* (*GXX-PX-βΔ*) strain showed the highest levels of lipid production all along the culture time-points, reaching a 13% of total fatty acids in the CDW after 7 days of culture in 8% xylose-based media, which represents an increase of 69% with respect to GXX strain grown in 8% glucose-based media (Fig. 6a). The lipid profiles of the three xylose-metabolizing strains revealed that the *GXX-PX-βΔ* strain accumulates significantly higher concentrations of oleic acid (C18:1) than the GXX and GXX-PX strains, which showed no differences among them. The production of lipids in the engineered strains could be visualized directly by bodipy staining of the intracellular lipid bodies. As shown in the Fig. 7, both the number and the size of lipid bodies in the *GXX-PX-βΔ* strain were significantly larger than those in the GXX and wild-type strains grown in xylose and glucose, respectively. In addition, the supplementation of the xylose-based media with 2% oleic acid resulted in a huge accumulation of intracellular lipids (Fig. 7; Additional file 3). Hence, our results demonstrate that *A. gossypii* can be engineered for the utilization of xylose and lipid production.



Discussion

Xylose-rich feedstocks and by-products are between the most abundant and low-priced substrates with biotechnological application. Therefore, the assimilation of xylose by industrial biocatalysts is an important issue that can help microbial fermentations to be more

economically feasible and, consequently, the optimization of pentose utilization along with the design of novel microbial tools is required [19]. In this work, we have developed novel strains of *A. gossypii* that can utilize xylose as the only carbon source. Furthermore, metabolic flux from xylose has been channeled for the production

of biolipids by the heterologous expression of a phosphoketolase pathway in *A. gossypii*.

Although the GXX strain and derivatives can reach equal biomass titers using either glucose or xylose, the use of glucose is preferred when both sugars are present in the culture media. Indeed, glucose (0.2%) is essential to avoid a delay in the germination of spores of *A. gossypii*. This may reflect a general regulatory mechanism of the C5/C6 sugar uptake by carbon catabolite repression, which eventually would interfere with co-fermentation of mixed sugars, as described for most bacteria and eukaryotes [15]. Therefore, the optimization of xylose uptake using engineered xylose-specific transporters can improve the simultaneous consumption of mixed sugars [15, 22–25].

In spite of the sequential utilization of xylose by the *A. gossypii* engineered strains, we could detect high concentrations of xylitol in the culture media that was eventually consumed, which indicate both a high conversion rate of xylose to xylitol and an active mechanism of xylitol excretion/uptake in *A. gossypii*. The transient accumulation of xylitol indicates that the XDH activity is a rate-limiting step during xylose assimilation. This might be explained by the possible effect of a decreased oxygenation of the culture when biomass becomes high. Indeed, the oxygen availability and aeration conditions were shown to affect the enzyme activities for xylitol production in different xylose-utilizing microorganisms [26–28]. Alternatively, the XDH enzyme might become saturated by an excess of the substrate, thus triggering an increase of the excretion of xylitol. The high concentration of xylitol in the culture media (22.9 g/L in 8% xylose media, Fig. 4c) has a prominent biotechnological interest, since *A. gossypii* can be also considered a potential microbial factory for the industrial production of xylitol. Thus, depending of the composition of the culture media, yields between 0.5 and 0.97 g of xylitol per gram of xylose were measured.

We have previously reported engineered *A. gossypii* strains that are able to accumulate high levels of lipids in oil-based culture media [13]; however, when sugar-based substrates are used, the lipid biosynthesis capacity of microbial catalysts is often hindered by regulatory mechanisms controlling the de novo lipid synthesis [29, 30]. The overexpression of a phosphoketolase pathway in our GXX-PX strain induced an increase of lipid synthesis, thus demonstrating that metabolic flux is channeled from X5P toward the synthesis of acetyl-CoA. This strategy was previously used for the production of fatty acid ethyl esters in *S. cerevisiae* [20]. Also, although an additional increase in lipid synthesis is obtained by blocking the beta-oxidation pathway in the GXX-PX- $\beta\Delta$ strain, our results suggest that the lipid degrading activity of this pathway may not be very high in the GXX-PX strain under the conditions assayed (8% xylose).

Strikingly, the GXX strain produced more lipids than the wild-type in glucose-based media during the 3–5 days of culture. The presence of a constitutively active XR-XDH-XK pathway in the GXX strain might affect the activity of the PPP, which has been shown to metabolize a 30% of the glucose-6-P pool in *A. gossypii* [31]. In turn, an increase of the PPP in the GXX strain might contribute to increase the generation of reducing power in the form of NADPH, which eventually triggers a higher lipid production. Indeed, the reducing power of NADPH/NADH has been shown to play a determinant role in the fatty acid synthesis in oleaginous fungi [32].

Other reports have described genetic customization of microorganisms for the production of lipids from xylose. In the oleaginous yeast *Y. lipolytica*, the heterologous expression of the oxidoreductase pathway (XR-XDH) from *S. stipitis* in combination with other manipulations have been described in two recent works: Ledesma-Amaro et al. [33] have shown the combination of XR-XDH from *S. stipitis* with the overexpression of the endogenous XK in a lipid overproducer genetic background, thus obtaining a 35% of CDW in lipid accumulation under controlled bioreactor conditions; besides, Li and Alper [34] also described the use of XR and XDH from *S. stipitis* along with adaptive-evolutionary engineering in a strain which is able to accumulate 15 g/L of lipids in bioreactor fermentations. In addition, lipid production from xylose has also been described in oleaginous yeast that are able to naturally utilize xylose such as *Rhodospiridium toruloides* and *Mortierella isabellina* with lipid titers of 9.5 and 18.5 g/L, respectively [35, 36]. While *R. toruloides* was engineered to overexpress the lipogenic genes *ACC1* and *DGAI* [36], culture conditions were optimized for lipid accumulation from xylose in *M. isabellina* [35]. In comparison, our engineered strains showed less capacities for lipid accumulation (9–13% of CDW) in the conditions assayed; however, it is worthy to mention that the use of *A. gossypii* presents biotechnological advantages regarding downstream processing and genome engineering, which allow a significant room for improvement of the xylose-utilizing strains.

Lipid titers in our engineered strains may also be constrained by mechanisms affecting the biosynthesis of fatty acids such as feedback inhibition and cofactor imbalance. In this regard, it has been described that acyl-CoA esters regulate the activity of the fatty acid synthase and the acetyl-CoA carboxylase in *S. cerevisiae* [29, 37]. Hence, customized microorganisms lacking metabolic bottlenecks for lipid production have been described, providing evidence that rewiring the de novo lipid regulation can increase the conversion yields of carbohydrates to lipids [30, 37–39]. Further work is foreseen in *A. gossypii* to improve the conversion of carbohydrates to

lipids either by engineering the regulators of lipid synthesis or introducing additional lipidogenic manipulations. Indeed, our recent results anticipate that feedback regulation of lipogenic genes exerted by the acyl-CoA pool in *A. gossypii* can be abrogated using engineered alleles of the *MGA2* gene (unpublished results).

In this work, flask cultures with controlled concentrations of xylose in rich media have been performed. However, the exploitation of xylose-rich resources also requires the identification of the critical parameters affecting fermentation productivity. In this regard, the optimization of the culture conditions and downstream processing in a controlled bioreactor most likely would increase titer, yield, and productivity of the xylose-utilizing engineered strains of *A. gossypii*.

Conclusions

We present here a proof-of-concept study demonstrating the undertaking potential of *A. gossypii* as a competitive biocatalyst for the industrial production of biolipids from xylose. The importance of the present work relies on the feasibility of *A. gossypii* as a cell factory, which enables the application of systems metabolic engineering, fluxomics, and model-based approaches for the generation of improved strains with broad-range abilities for microbial fermentations. A large number of applications for the use of xylose-rich lignocellulosic feedstocks are being recently reported such as the production of ethanol, butanol, butanediol, hexadecanol, and organic acids [40–43]. Hence, it is worthy to mention that enabling *A. gossypii* to use xylose as the only carbon source opens new opportunities for the harnessing of xylose-rich substrates not only for the production of microbial oils, but also a wide range of high-value industrial products such as fine chemicals, riboflavin and other vitamins, purines, and xylitol.

Methods

Ashbya gossypii strains and growth conditions

The *A. gossypii* ATCC 10895 strain was used and considered a wild-type strain. Other *A. gossypii* strains used in the study are listed in Additional file 4. *Ashbya gossypii* cultures were initiated with spores (10^6 spores per liter) and carried out at 28 °C in MA2-rich medium using either glucose and/or xylose as carbon sources at the indicated concentrations [6]. *Ashbya gossypii* transformation, its sporulation conditions, and spore isolation were as described previously [6, 44]. Concentrations of 250 mg/L for geneticin (G418) (Gibco-BRL) were used where indicated.

Gene overexpression and gene deletion

Different transformation cassettes were used either for the overexpression of endogenous genes (i.e., *GRE3*,

XYL2, and *XKS1*), the overexpression of heterologous genes (i.e., *pta* and *xpkA*) or gene deletion.

For the overexpression of endogenous genes, the promoter sequence of the *AgGPD* gene was integrated upstream of the ATG initiator codon of each gene. Overexpression cassettes comprising the *AgGPD* promoter (P_{AgGPD}) and the *loxP-KanMX-loxP* selectable marker, conferring resistance to G418, were PCR-amplified using specific primers for each gene (Additional file 5).

For the overexpression of heterologous *pta* and *xpkA* genes, each open reading frame was PCR-amplified using specific primers for each gene (Additional file 5). The *pta* ORF was amplified from *Bacillus subtilis* genomic DNA and the *xpkA* ORF was amplified from the plasmid pMPa (Dr. Jens Nielsen), which has been described elsewhere [20]. The overexpression modules comprised two recombinogenic flanks, a selection marker *loxP-KanMX-loxP*, and the corresponding ORF with both promoter and terminator sequences (Additional file 2). For the overexpression of the *pta* gene, recombinogenic flanks targeting the *ADR304W* locus were used, and the regulatory sequences were the promoter of *AgGPD* and the terminator of *AgPGK1*. For the overexpression of the *xpkA* gene, recombinogenic flanks targeting the *AGR034C* locus were used, and the regulatory sequences were the promoter of *AgGPD* and the terminator of *AgENO2*. All fragments for each overexpression module were PCR-amplified (see Additional file 5 for primer sequences), verified by DNA sequencing and assembled following a one-pot DNA-shuffling method using the sequence of the *BsaI* restriction enzyme in the acceptor vector, as previously described [45]. The overexpression modules were finally isolated by enzymatic restriction with *SapI*.

For the deletion of *AgPOX1*, a gene replacement cassette was constructed for the *POX1* gene by PCR amplification of the *loxP-KanMX-loxP* marker (see primer sequences in Additional file 5).

Spores of *A. gossypii* were transformed with the corresponding overexpression/deletion cassettes, and positive clones were selected in G418-containing medium. Homokaryon clones were obtained by sporulation of the primary transformants. The correct genomic integration of each overexpression/deletion cassette was confirmed by analytical PCR followed by DNA sequencing. Gene overexpression was further analyzed by qRT-PCR. The *loxP* repeated inverted sequences present in the *loxP-KanMX-loxP* marker enabled the selection marker to be eliminated and subsequently reused by expressing a Cre recombinase, as described elsewhere [13].

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with a LightCycler 480 real-time PCR instrument (Roche),

using SYBR Green I master mix (Roche) and following the manufacturer's instructions. Total RNA samples were obtained as described previously [9], and cDNA samples were prepared using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Primer sequences are indicated in Additional file 5. All real-time PCR reactions were performed in duplicate and in at least two independent experiments. Quantitative analyses were carried out using the LightCycler 480 software. The mRNA level of the target genes was normalized to that of *AgUBC6* and was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [46].

HPLC analysis of metabolites

Glucose, xylose, xylitol, ethanol, glycerol, and acetate from culture supernatants were analyzed with a Waters Alliance 2795 High-performance liquid chromatography system equipped with a REZEX ROA Organic Acid H+ (8%) column coupled to RI detector (Waters 410). The mobile phase was 0.005 N H₂SO₄ and the flow rate was 0.6 mL/min. All samples were filtered through 0.45 μm filters and 25 μL of each sample were injected.

Lipid extraction for gravimetric quantitative analysis

Lipids were extracted from 50 mL flask cultures grown in MA2-rich media with carbon sources at indicated concentrations. The cultures were initiated from an overnight pre-inoculum and were incubated for 3–7 days at 28 °C and 200 r.p.m. The mycelium biomass was collected by filtration, lyophilized and the dry cell weight of each sample was determined. Extraction with chloroform/methanol was performed by applying a modification of Folch's method [47, 48]; equal volumes of methanol and chloroform were added to the mycelium powder and mixed vigorously by vortex. Then ½ volume of H₂O was added and mixed again. After centrifuging for 5 min at 2000 r.p.m., the lower organic phase was collected and the total fatty acids content was determined gravimetrically after evaporation of organic solvents.

Lipid extraction for gas chromatography and mass spectrometry analyses

Lyophilized biomass was resuspended in 1 mL of methanol and sulfuric acid (97.5% methanol and 2.5% sulfuric acid) with an internal standard. The samples were incubated at 80 °C for 1.5 h. The reaction that takes place is a transesterification of triglycerides with methanol in presence of an acid catalyst. This reaction is necessary for the subsequent detection of methyl esters of fatty acids in the gas chromatograph. The reaction was stopped by the addition of 1.5 mL H₂O. Then 0.45 mL of hexane was added and the mixture was vigorously stirred. The upper phase was recovered after centrifugation for 5 min to 2500 r.p.m. 100 μL was collected and placed in glass vials for subsequent

analysis. Methyl esters of fatty acids dissolved in hexane were analyzed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC–MS). GC–MS was carried out using the GC17 Shimadzu gas chromatograph and Shimadzu QP5000 mass spectrometer. A column DB-5 (30 m long, 0.25 mm internal diameter and 25 μm of film) was used. The conditions for the analysis were as follows: it was used helium with a flow of 1.3 mL/min as a carrier gas, with a Split-ratio 60:1. The injector temperature was 270 °C and the interface temperature was 290 °C. The oven followed this program: initial temperature of 90 °C for 5 min, a ramp of 12 °C/min to 190 °C, and a ramp of 4 °C/min to 290 °C. The fatty acids were identified by comparison with the methyl esters of fatty acids of standard commercial sample (FAME32; Supelco). The total quantification of fatty acids was carried out following the method of standard internal pattern using 50 μg of heptadecanoic acid C17:0 (Sigma).

Additional files

Additional file 1. Utilization of glucose by the GXX strain of *A. gossypii*. Biomass production of the WT and GXX strains grown in MA2 medium with 2% xylose as the only carbon source (upper panel). Glucose consumption and metabolite production by the WT (middle panel) and GXX strains (lower panel) grown in MA2 medium with 2% glucose as the only carbon source.

Additional file 2. Cloning strategy for the overexpression of *pta* and *xpkA* genes. (A) Six modules were assembled for the construction of the overexpression cassettes: integration modules 5' and 3', selection module, promoter, terminator and the corresponding ORF (*pta* or *xpkA*). (B) The six modules were assembled following a one-pot DNA-shuffling (see "Methods" section) and the overexpression cassettes were integrated in the corresponding genomic loci (*ADR304W* for the *pta* cassette and *AGR034C* for the *xpkA* cassette).

Additional file 3. Lipid bodies of the *A. gossypii* GXX-PX-βΔ strain. Micrograph of the GXX-PX-βΔ strain grown during 5 days in media containing 8% xylose plus 2% oleic acid. Lipid bodies were stained with Bodipy and visualized under fluorescence microscopy. White asterisks indicate partial autolysis of hyphae.

Additional file 4. *A. gossypii* strains used in this study. Table of *A. gossypii* strains used in this study.

Additional file 5. List of primers used in this study. List of primers used in this study.

Authors' contributions

AJ and JLR conceived the pivotal idea of the study, co-designed the experiments, and supervised the work. DDF performed most of the experiments. AJ performed some experiments. PLM helped to carry out the lipid profiling. AJ, JLR, and RMB drafted the manuscript, and AJ wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was financed in part by BASF to JLR and by grant BIO2014-56930-P from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad to JLR and AJ. DDF and PLM were recipients of USAL and FPI predoctoral fellowships from the University of Salamanca and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, respectively. RMB is supported by a "Ramón y Cajal" contract from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad. We thank María Dolores Sánchez and Silvia Domínguez for excellent technical help.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported in part by BASF and by grant BIO2014-56930-P from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad.

Received: 18 September 2016 Accepted: 9 December 2016

Published online: 03 January 2017

References

- Peralta-Yahya PP, Zhang F, del Cardayre SB, Keasling JD. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*. 2012;488:320–8.
- Tuck CO, Pérez E, Horváth IT, Sheldon RA, Poliakoff M. Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science*. 2012;337:695–9.
- Ledesma-Amaro R, Lozano-Martinez P, Jiménez A, Revuelta JL. Engineering *Ashbya gossypii* for efficient biolipid production. *Bioengineered*. 2015;6:119–23.
- Ledesma-Amaro R, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2015;61:40–50.
- Lennen RM, Pfeleger BF. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:1044–53.
- Jiménez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:5743–51.
- Jiménez A, Santos MA, Revuelta JL. Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *BMC Biotechnol*. 2008;8:67.
- Ledesma-Amaro R, Serrano-Amatriain C, Jiménez A, Revuelta JL. Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. *Microb Cell Fact*. 2015;14:163.
- Mateos L, Jiménez A, Revuelta JL, Santos MA. Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a Myb-related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:5052–60.
- Gattiker A, Rischatsch R, Demougin P, Voegelé S, Dietrich FS, Philippsen P, Primig M. Ashbya genome database 3.0: a cross-species genome and transcriptome browser for yeast biologists. *BMC Genom*. 2007;8:9.
- Ledesma-Amaro R, Kerkhoven EJ, Revuelta JL, Nielsen J. Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111(6):1191–9. doi:10.1002/bit.25167.
- Wendland J, Ayad-Durieux Y, Knechtle P, Reibischung C, Philippsen P. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Gene*. 2000;242:381–91.
- Ledesma-Amaro R, Santos MA, Jiménez A, Revuelta JL. Strain design of *Ashbya gossypii* for single-cell oil production. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:1237–44.
- Ledesma-Amaro R, Santos MA, Jiménez A, Revuelta JL. Tuning single-cell oil production in *Ashbya gossypii* by engineering the elongation and desaturation systems. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111:1782–91.
- Zhang GC, Liu JJ, Kong II, Kwak S, Jin YS. Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial bioconversion. *Curr Opin Chem Biol*. 2015;29:49–57.
- Ribeiro O, Domingues L, Penttilä M, Wiebe MG. Nutritional requirements and strain heterogeneity in *Ashbya gossypii*. *J Basic Microbiol*. 2012;52:582–9.
- Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol*. 2006;17:320–6.
- Kim SR, Park YC, Jin YS, Seo JH. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol Adv*. 2013;31:851–61.
- Young E, Lee SM, Alper H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol Biofuels*. 2010;3:24.
- de Jong BW, Shi S, Siewers V, Nielsen J. Improved production of fatty acid ethyl esters in *Saccharomyces cerevisiae* through up-regulation of the ethanol degradation pathway and expression of the heterologous phosphoketolase pathway. *Microb Cell Fact*. 2014;13:39.
- Sonderegger M, Schumperli M, Sauer U. Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:2892–7.
- Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:5159–64.
- Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, Choi JH, Yang X, Seo JH, Glass NL, Cate JH, Jin YS. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:504–9.
- Kim SM, Choi BY, Ryu YS, Jung SH, Park JM, Kim GH, Lee SK. Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2015;30:141–8.
- Young EM, Tong A, Bui H, Spofford C, Alper HS. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:131–6.
- Branco RF, dos Santos JC, Sarrouh BF, Rivaldi JD, Pessoa JA, da Silva SS. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84:326–30.
- Jin Y-S, Jeffries TW. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 2004;6:229–38.
- Kim S-Y, Kim J-H, Oh D-K. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *J Ferment Bioeng*. 1997;83:267–70.
- Neess D, Bek S, Engelsby H, Gallego SF, Faergeman NJ. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: role of acyl-CoA binding proteins. *Prog Lipid Res*. 2015;59:1–25.
- Pfeleger BF, Gossing M, Nielsen J. Metabolic engineering strategies for microbial synthesis of oleochemicals. *Metab Eng*. 2015;29:1–11.
- Jeong B-Y, Wittmann C, Kato T, Park EY. Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. *J Biosci Bioeng*. 2015;119:101–6.
- Chen H, Hao G, Wang L, Wang H, Gu Z, Liu L, Zhang H, Chen W, Chen YQ. Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Sci Rep*. 2015;5:11247.
- Ledesma-Amaro R, Lazar Z, Rakicka M, Guo Z, Fouchard F, Coq A-MC-L, Nicaud J-M. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* to produce chemicals and fuels from xylose. *Metab Eng*. 2016;38:115–24.
- Li H, Alper HS. Enabling xylose utilization in *Yarrowia lipolytica* for lipid production. *Biotechnol J*. 2016;11:1230–40.
- Gao D, Zeng J, Zheng Y, Yu X, Chen S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresour Technol*. 2013;133:315–21.
- Zhang S, Skerker JM, Rutter CD, Maurer MJ, Arkin AP, Rao CV. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113:1056–66.
- Chen L, Zhang J, Lee J, Chen WN. Enhancement of free fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by control of fatty acyl-CoA metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:6739–50.
- Friedlander J, Tsakraklides V, Kamineni A, Greenhagen EH, Consiglio AL, MacEwen K, Crabtree DV, Afshar J, Nugent RL, Hamilton MA, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:77.
- Qiao K, Imam Abidi SH, Liu H, Zhang H, Chakraborty S, Watson N, Kumaran Ajikumar P, Stephanopoulos G. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*. 2015;29:56–65.
- Chen R, Dou J. Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. *Biotechnol Lett*. 2016;38:213–21.
- Guo W, Sheng J, Zhao H, Feng X. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to produce 1-hexadecanol from xylose. *Microb Cell Fact*. 2016;15:24.
- Tai YS, Xiong M, Jambunathan P, Wang J, Wang J, Stapleton C, Zhang K. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products. *Nat Chem Biol*. 2016;12:247–53.
- Trausinger G, Gruber C, Krahulec S, Magnes C, Nidetzky B, Klimacek M. Identification of novel metabolic interactions controlling carbon flux from xylose to ethanol in natural and recombinant yeasts. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:157.
- Santos MA, Mateos L, Stahmann KP, Revuelta JL. Insertional mutagenesis in the vitamin B2 producer fungus *Ashbya gossypii*. In: Barredo JL, editor. *Methods in biotechnology*, vol 18. Microbial processes and products. Totowa: Humana Press Inc.; 2004.

45. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS ONE*. 2009;4:e5553.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
47. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497–509.
48. Schneiter R, Daum G. Extraction of yeast lipids. *Methods Mol Biol*. 2006;313:41–5.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





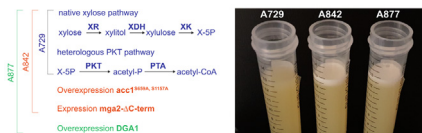
Microbial lipids from industrial wastes using xylose-utilizing *Ashbya gossypii* strains

David Díaz-Fernández^a, Tatiana Q. Aguiar^b, Victoria Isabel Martín^a, Aloia Romani^b, Rui Silva^b, Lucília Domingues^b, José Luis Revuelta^{a,*}, Alberto Jiménez^{a,*}

^a Metabolic Engineering Group, Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain

^b CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Ashbya gossypii
Microbial lipids
Regulation
Lignocellulosic hydrolysates
Xylose
Molasses
Glycerol

ABSTRACT

This work presents the exploitation of waste industrial by-products as raw materials for the production of microbial lipids in engineered strains of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. A lipogenic xylose-utilizing strain was used to apply a metabolic engineering approach aiming at relieving regulatory mechanisms to further increase the biosynthesis of lipids. Three genomic manipulations were applied: the overexpression of a feedback resistant form of the acetyl-CoA carboxylase enzyme; the expression of a truncated form of Mga2, a regulator of the main $\Delta 9$ desaturase gene; and the overexpression of an additional copy of *DGA1* that codes for diacylglycerol acyltransferase. The performance of the engineered strain was evaluated in culture media containing mixed formulations of corn-cob hydrolysates, sugarcane molasses or crude glycerol. Our results demonstrate the efficiency of the engineered strains, which were able to accumulate about 40% of cell dry weight (CDW) in lipid content using organic industrial wastes as feedstocks.

1. Introduction

The sustainable and circular bioeconomy constitutes a new challenge for the near future that aims at using renewable biological resources to produce food, materials and energy. Hence, a sustainable bioeconomy can turn organic wastes and residues into valuable resources (European Commission, 2018). In this regard, the development of new technologies and microbial biocatalysts for the biotransformation of industrial wastes into high-value products is an important issue for the industrial biotechnology. Consequently, different approaches are being implemented for the valorization of waste low-cost substrates such as lignocellulosic hydrolysates, crude glycerol, molasses, waste

cooking oil, wastewaters and animal or plant food waste (Qin et al., 2017; Ravindran and Jaiswal, 2016). Indeed, the lignocellulosic bio-refinery industry has received much attention from the EU and represents an important element of the future European bioeconomy (Hassan et al., 2019). These strategies broaden horizons for the sustainable production of biofuels, nutraceuticals, enzymes, bioactive compounds, bioplastics and nanoparticles, among others (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Microbial lipids can be used for the production of many valuable chemicals with applications as biofuels, nutraceuticals and oleochemicals (Lennen and Pfeleger, 2013). Microbial lipids are produced by a wide range of microorganisms such as filamentous fungi, microalgae,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: revuelta@usal.es (J.L. Revuelta), alji@usal.es (A. Jiménez).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122054>

Received 18 June 2019; Received in revised form 21 August 2019; Accepted 22 August 2019

Available online 26 August 2019

0960-8524/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

bacteria and yeast, which can be cultivated in a controlled bioreactor environment. In addition, some microbial biocatalysts can be grown using low-cost waste substrates and, therefore, represent an ideal element for a sustainable bioeconomy (Qin et al., 2017).

Ashbya gossypii is a filamentous hemiascomycete that is currently exploited for the industrial production of riboflavin (Revuelta et al., 2017). A complete molecular toolbox for strain engineering is available for *A. gossypii*, including genomic, bioinformatic, and biotechnological tools (Aguiar et al., 2015; Dietrich et al., 2004; Jiménez et al., 2019; Ledesma-Amaro et al., 2018). In terms of bioprocessing, *A. gossypii* has the ability to grow using low-cost substrates and presents inexpensive downstream processing (Schwechheimer et al., 2016), thereby making this fungus a suitable microbial chassis for the implementation of efficient bioprocesses. Thus, *A. gossypii* has been proposed as an efficient biotechnological chassis for the production of different high-added value compounds such as folic acid (Serrano-Amatriain et al., 2016), nucleosides (Ledesma-Amaro et al., 2015a), recombinant proteins (Aguiar et al., 2017), γ -lactones (Silva et al., 2019) and microbial lipids (Ledesma-Amaro et al., 2018, 2015b).

In this regard, the production of microbial lipids in *A. gossypii* from xylose and sugarcane molasses has been reported using different metabolic engineering strategies (Díaz-Fernández et al., 2017; Lozano-Martínez et al., 2017). The endogenous xylose-utilizing pathway was overexpressed, together with an heterologous phosphoketolase pathway, channeling the xylose carbon flux towards the biosynthesis of microbial lipids (Díaz-Fernández et al., 2017). In addition, the expression of a truncated form of Mga2, a regulator of the main $\Delta 9$ desaturase gene *OLE1* (Fig. 1), was demonstrated to be effective for increasing the biosynthesis of fatty acids (FA) in culture media containing either glucose or sugarcane molasses (Lozano-Martínez et al., 2017). However, the production of lipids did not exceed 25% of the cell dry weight (CDW), thereby suggesting that regulatory mechanisms might hamper

the biosynthesis of lipids in *A. gossypii*.

The existence of major bottlenecks due to feedback inhibition of lipogenic enzymes has been described (Fig. 1): the acetyl-CoA carboxylase (Acc1), which is the initial and rate-limiting enzyme of FA synthesis, can be inhibited both by saturated FA and by Snf1-dependent phosphorylation (Qiao et al., 2015; Woods et al., 1994). Also, the fatty acyl-CoA pool can regulate the activity of the FA synthase (FAS), the Acc1 and the $\Delta 9$ desaturase (Ole1) in yeasts (Nees et al., 2015; Qiao et al., 2015). Indeed, previous works succeeded at increasing the biosynthesis of lipids by abolishing those regulatory bottlenecks (Pfleger et al., 2015). For example, the simultaneous overexpression of $\Delta 9$ desaturase, Acc1 and diacylglycerol acyltransferase (Dga1) contributed to the reduction of saturated FAs and resulted in a significant increase of the lipid titer in *Yarrowia lipolytica* (Qiao et al., 2015). Also, the use of feedback resistant mutants of *ACC1* and the overexpression of *DGA1* have been proved to be successful metabolic engineering strategies aimed at increasing the lipid productivity (Blazeck et al., 2014; Shi et al., 2014).

This work presents a combined approach both for alleviating regulatory bottlenecks of lipid biosynthesis and utilizing different industrial wastes for the production of microbial lipids in *A. gossypii*. Hence, engineered strains of *A. gossypii* are reported to accumulate up to 40% of CDW, following a multi-wastes valorization approach, using corn-cob lignocellulosic hydrolysates (CCh), sugarcane molasses or crude glycerol. The utilization of these industrial by-products as efficient feedstocks for microbial fermentation is further discussed.

2. Materials and methods

2.1. *A. gossypii* strains and general growth conditions

The *A. gossypii* GXX-PX strain (A729) was used as the parental strain

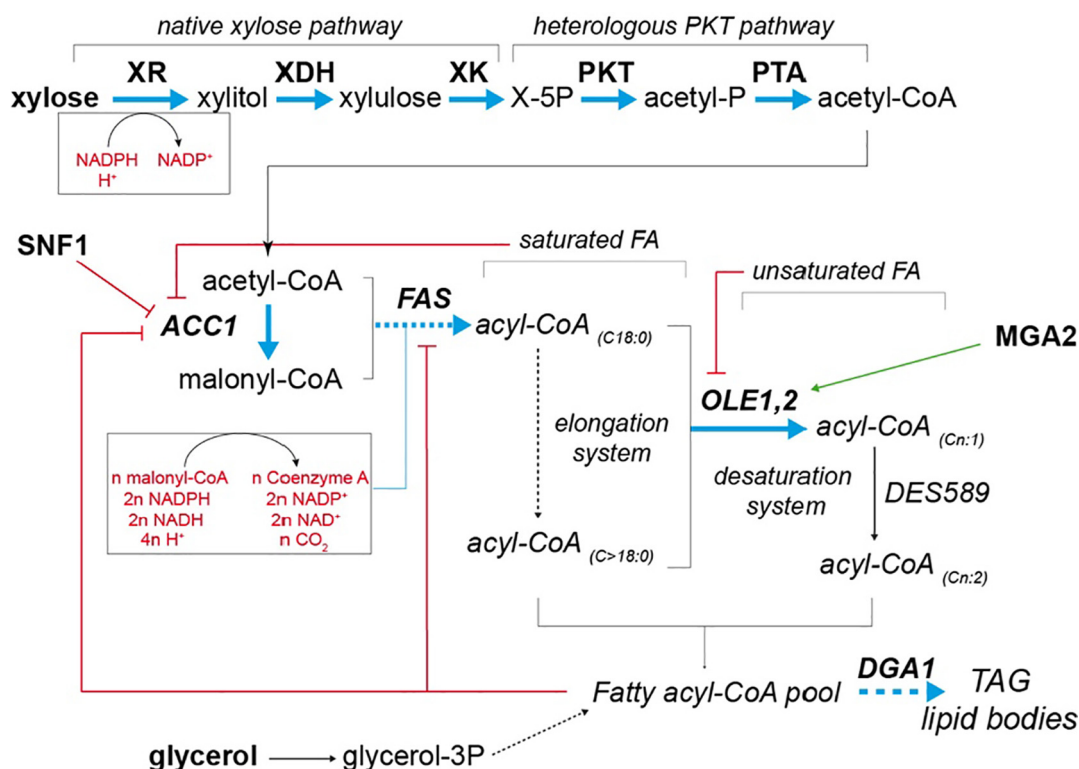


Fig. 1. Schematic representation of the biosynthesis of lipids. A simplified model of the biosynthesis of lipids from xylose is depicted. Engineered targets are indicated in bold. Negative regulation is indicated by red lines; positive regulation is indicated by green lines. Blue arrows denote metabolic steps that were activated in this work. The cofactor balances of XR and FAS reactions are shown in red. XR, xylose reductase; XDH, xylitol dehydrogenase; XK, xylulose kinase; PKT, phosphoketolase; PTA, phosphotransacetylase; ACC1, acetyl-CoA carboxylase; FAS, FA synthase; OLE1, 2, $\Delta 9$ desaturase; DGA1, diacylglycerol acyltransferase. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Díaz-Fernández et al., 2017). *A. gossypii* spore isolation and sporulation conditions were as described previously (Jiménez et al., 2005). Cultures were grown at 28 °C and 200 r.p.m. using either MA2-rich medium (Jiménez et al., 2005) or AFM-rich medium (Aguiar et al., 2014) with the indicated carbon sources. Concentrations of 250 mg/L for geneticin (G418) (Gibco-BRL) were used where indicated.

2.2. Gene manipulation

For the overexpression of an additional copy of *DGA1*, an overexpression integrative cassette was constructed using a Golden Gate assembly method as previously described (Ledesma-Amaro et al., 2018). The integrative module comprised recombinogenic flanks targeting the *AFR171W* locus and a *loxP-KanMX-loxP* selection marker. The *DGA1* ORF was placed under the *AgGPD1* promoter (P_{AgGPD1}) and the *AgPGK1* (T_{AgPGK1}) terminator sequences. For the overexpression of a feedback resistant form of *Acc1* an overexpression integrative cassette targeting the *ACC1* gene was designed. First, an overexpression plasmid was constructed *in vitro* comprising recombinogenic flanks targeting the *ACC1* locus, a *loxP-KanMX-loxP* selection marker, the P_{AgGPD1} promoter and the *ACC1* wild-type coding sequence (3799 nt). Second, site-directed mutagenesis by inverse PCR was followed to sequentially introduce T1975G (S559A) and T3463G (S1155A) mutations using mutagenic primer pairs. The final construct was linearized and the transformation cassette was obtained by enzymatic restriction with *NotI*. The expression of a truncated form of *Mga2* was carried out by deleting the C-terminal part (residues 850-1139) of *AgMga2* as previously described (Lozano-Martínez et al., 2017).

Spores of *A. gossypii* were transformed with the corresponding cassettes as described previously (Jiménez et al., 2005), and positive clones were selected in G418-containing medium. Homokaryon clones were obtained by sporulation of the primary transformants. The correct genomic integration of each cassette was confirmed by analytical PCR followed by DNA sequencing. The *loxP* repeated inverted sequences present in the *loxP-KanMX-loxP* marker enabled the selection marker to be eliminated by expressing a Cre recombinase and subsequently reused (Aguiar et al., 2014; Serrano-Amatriain et al., 2016).

2.3. Preparation and detoxification of corn cob hydrolysate (CCh)

Corn cob was mixed with water at liquid solid ratio of 8 g/g and submitted to hydrothermal treatment under non-isothermal conditions (Tmax of 205 °C), following the operational conditions previously described (Garrote et al., 2008), in a 2 L stainless steel reactor (Parr Instruments Company) equipped with Parr PDI temperature controller (model 4848). After treatment, autohydrolysis liquor was recovered by filtration and submitted to dilute acid treatment (0.5% w/w H₂SO₄ for 165 min at 125 °C), as described elsewhere (Rivas et al., 2006). The CCh was neutralized with CaCO₃ until pH 5.

Inhibitor compounds (namely, furfural, HMF and phenolic compounds) were removed using activated charcoal and ionic exchange resins (Cunha et al., 2019). CCh was mixed with activated charcoal (10 g of hydrolysate/g of activated charcoal) for 60 min in agitation for phenolic compounds removal. After that, the hydrolysate was

submitted to ion exchange resins treatment. Hydrolysate was mixed with Amberlite IR-120 resin (H + form) at ratio of 10 g of resin/g of hydrolysate for 60 min in agitation. Then, the cationic resin was removed by filtration and the hydrolysate was mixed with Mto-Dowex anionic resin (OH⁻ form) at ratio 20 g of resin/g of acetic acid.

Finally, the pH of the detoxified CCh was adjusted to 6.8 with KOH (5 M) before sterilization by filtration and then CCh was added to the media at a final concentration of 50% v/v, in order to keep the concentration of xylose within the range of 10–15 g/L.

2.4. Preparation and detoxification of crude glycerol

Crude glycerol was kindly provided by CVR-Centre for Waste Valorisation (Guimarães, Portugal) and, before use, it was prepared as previously described (Ruhál et al., 2011) with slight modifications. The raw material was first diluted in distilled water (1:4 v/v) to reduce its viscosity. Then, the pH of the mixture was adjusted to 3 with HCl (6 M) to convert soap into free FA. The precipitates formed were separated from the mixture by centrifugation at 7000 r.p.m. for 10 min. Next, the pH was adjusted to 12 with KOH (5 M) and the suspension filtrated in order to remove suspended debris. Subsequently, the pH of the filtrate was adjusted to 6.8–7.0. Finally, the methanol contained in the solution was removed by autoclaving and the concentration of glycerol quantified by HPLC. Crude glycerol was then added to the medium at a final concentration of 1% w/v.

2.5. Lipid production conditions

Mycelia of each strain was scrapped off agar-solidified MA2 after 2.5 days of growth and treated with 7.5 mg/mL of lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) until obtaining homogeneously dispersed mycelia (\approx 1 h). After washing and resuspension in culture medium (1.5 mL/plate), 1 mL of this pre-inoculum was used to inoculate 250 mL shake-flasks containing 50 mL of medium. Initial characterization of the generated strains was performed in AFM containing 2% w/v xylose or 1% w/v xylose plus 1% w/v glucose/glycerol as main carbon sources. Medium formulations containing low-cost substrates and AFM-based supplement (10 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone and 1 g/L myo-inositol) were further evaluated as production media (Table 1). *A. gossypii* cultures were carried out in an orbital-shaker at 28 °C and 200 r.p.m. and samples were taken at defined time intervals to monitor growth (through CDW determination of lyophilized biomass samples), sugar/glycerol consumption and lipid accumulation.

2.6. Total lipid extraction for quantitative analysis

Mycelial biomass from liquid cultures was collected by filtration, lyophilized and the dry cell weight of each sample was determined. Lipid extraction from 10 to 15 mg of the lyophilized biomass was carried out with chloroform/methanol by applying a modification of the Folch's method (Schneider and Daum, 2006): equal volumes of methanol and chloroform were added to the mycelium powder and mixed vigorously. Then, 1/2 vol of 1 M NaCl was added, mixed vigorously and centrifuged for 5 min at 2000 r.p.m. The lower organic phase was

Table 1

Low-cost substrate media formulations used for microbial lipid production.

Media	Concentration (g/L)				
	Xylose	Sucrose	Glucose	Fructose	Glycerol
50% CCh ^a plus 4% sugarcane molasses ^b	15.1 ± 1.4	20.3 ± 5.4	2.6 ± 0.7	–	–
50% CCh ^b plus 1% crude glycerol ^a	12.9 ± 0.3	–	–	–	13.5 ± 0.5

(–) not present.

^a CCh and crude glycerol were prepared as indicated in the Materials and Methods section.

^b Sugarcane molasses were used without detoxification as kindly provided by RAR: Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A. (Porto, Portugal).

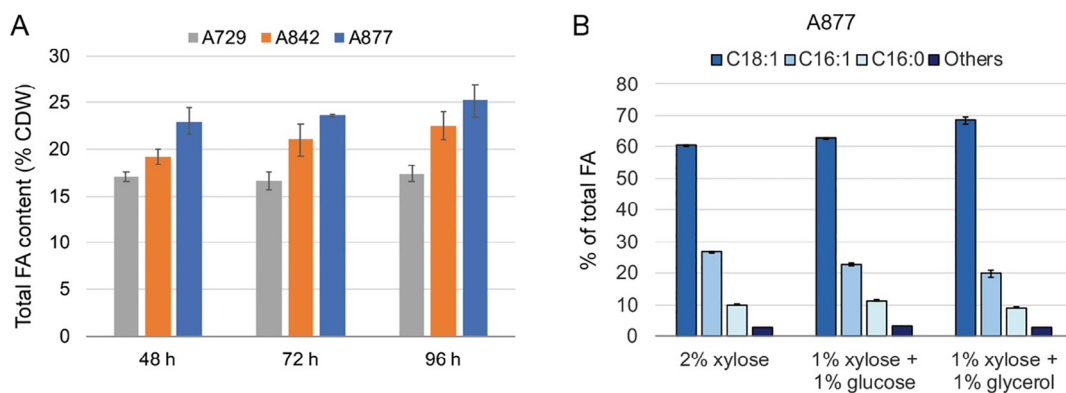


Fig. 2. Lipid production by engineered strains of *A. gossypii* grown in synthetic media. A, total lipid content of the strains A729, A842 and A877 grown in AFM media containing 2% xylose as carbon source. B, lipid profile of the A877 strain grown in AFM media containing different combinations of carbon sources. The results are the means of three independent experiments. The error bars represent the standard deviations.

collected and dehydrated by addition of an excess of anhydrous sodium thiosulfate. Finally, the samples were filtered and the total lipid content was determined gravimetrically after evaporation of organic solvents using a rotary evaporator.

2.7. Lipid extraction for GC–MS analyses

Lyophilized biomass (5–10 mg) was ground in screw-capped glass tubes (Duran) using a glass rod and resuspended in 1 mL of a solution of 2.5% (v/v) sulfuric acid in methanol containing 50 µg of internal standard. The tubes were then closed with Teflon caps and incubated at 80 °C for 100 min, making sure that no evaporation of solvent occurred. The reaction was stopped with 1 mL of 1 M NaCl and 0.5 mL of n-hexane was added to the mixture. Fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted into the organic phase by vigorous stirring. The tubes were then centrifuged at room temperature for 5 min at 2500 r.p.m. and approximately 0.3 mL of the upper organic phase was collected into 2 mL glass vials closed with Teflon caps. Just before analysis, the samples were dehydrated by addition of an excess of anhydrous sodium thiosulfate and transferred to new vials containing 200 µL glass inserts.

GC–MS was carried out in a Scion SQ™ 436 GC–MS (Bruker), using a SLB-IL 100 column (30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.20 µm of film; Supelco). For the analyses, helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min, and 1 µL of sample was automatically injected with the following programmed split ratio: initial split ratio of 1:20 for 0.01 min, which was then turned off for 0.49 min, next a split ratio of 1:100 was used for 0.5 min, after which it was switched again to 1:20 indefinitely. The injector temperature was 250 °C and the interface temperature was 200 °C. The oven program was as follows: initial temperature of 90 °C for 5 min, a ramp of 12 °C/min to 190 °C, and a ramp of 4 °C/min to 230 °C. MS detection was from 50 to 500 Da. The FAs were identified by comparison with the FAMES of the commercial standard FAME37 (Supelco). The total quantification of FAs was carried out following the method of standard internal pattern using 50 µg/mL of heptadecanoic acid C17:0 (Sigma).

2.8. HPLC analyses

Samples from liquid cultures were analysed by HPLC for sugars (xylose, glucose, fructose, sucrose) and glycerol determination. Xylose, xylitol and glycerol were quantified using a refractive index detector (Jasco) Aminex HPX-87 (BioRad, USA) column and eluted with 0.005 M H₂SO₄ flow rate 0.6 mL/min at 60 °C. Sucrose, xylose, glucose and fructose were quantified using a refractive index detector (Jasco) and a Prevail Carbohydrate ES column. A mixture of acetonitrile:water (75:25 v/v) pumped at 0.9 mL/min was used as mobile phase at 30 °C.

3. Results and discussion

3.1. Rewiring the regulation of lipid metabolism in *A. gossypii*

An engineered strain of *A. gossypii* (A729) with improved lipogenic capacity using xylose as carbon source was used as a parental strain (Díaz-Fernández et al., 2017). This strain was previously engineered to overexpress the native xylose-utilizing pathway of *A. gossypii* (*GRE3*, xylose reductase; *XYL2*, xylitol dehydrogenase; *XKS1*, xylulose kinase). In addition, channeling of metabolic flux towards lipid biosynthesis was achieved in the A729 strain by heterologous overexpression of a phosphoketolase pathway (*xpkA*, xylulose-5P phosphoketolase, from *Aspergillus nidulans* and *pta*, phosphotransacetylase, from *Bacillus subtilis*).

Envisioning the further improvement of the lipogenic capacity of this xylose-utilizing strain, three metabolic engineering strategies were carried out to alleviate the feedback inhibition over *Acc1* and *FAS* in *A. gossypii* (Fig. 1). The first strategy involved the overexpression of a mutant allele of *ACC1* to abolish posttranslational regulation of *Acc1*. It has been shown that substitution of the residues Ser659 and Ser1157 by non-phosphorylatable residues resulted in an enhanced activity of *Acc1* in *Saccharomyces cerevisiae* (Shi et al., 2014). Both Ser659 and Ser1157 residues are conserved in the *A. gossypii* *Acc1* enzyme. Consequently, an overexpression cassette was constructed for the genomic replacement of the *ACC1* with a mutant *acc1* allele, where the residues Ser659 and Ser1157 were mutated to Ala. The second strategy was aimed at reducing saturated FAs, by increasing the activity of the $\Delta 9$ desaturase, to prevent their inhibitory effect over *Acc1*. It has been shown that the overexpression of the endogenous *OLE1/OLE2* genes, coding for $\Delta 9$ desaturases, did not enhance the lipid biosynthesis in *A. gossypii* (Lozano-Martínez et al., 2016). However, the expression of a cytosolic C-terminal truncated form of *Mga2* (*mga2- Δ C-term*), which is a positive regulator of *OLE1,2*, resulted in a significant increase of the total lipid content in *A. gossypii* (Lozano-Martínez et al., 2017). Therefore, the expression of the *mga2- Δ C-term* allele was combined with the overexpression of the *acc1*^{S659A, S1157A} in the engineered strain A842. With these modifications, the total lipid content of this strain increase up to 1.3 fold compared to the parental strain A729 when both strains were grown in AFM containing 2% (w/v) xylose (Fig. 2A). A third strategy was further designed as a metabolic sink for the fatty acyl-CoA pool through the overexpression of an additional copy of *DGAI*, which is considered a lipogenic enhancer (Blazek et al., 2014). Hence, the reduction of the fatty acyl-CoA pool by its redirection towards the biosynthesis of triacylglycerols (TAG) should contribute to diminish the negative regulatory effects of the acyl-CoAs in the engineered strain A877, which combines all the genetic manipulations described (Fig. 1). Accordingly, the total lipid content of this strain reached 25.2 ± 1.7%

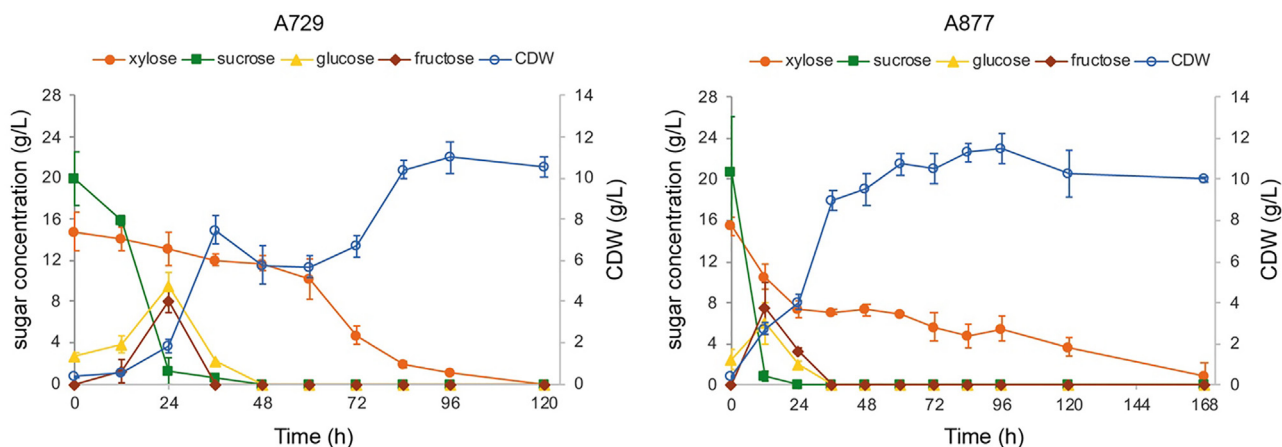


Fig. 3. Utilization of CCh plus sugarcane molasses by engineered strains of *A. gossypii*. Biomass production (CDW) and sugar consumption of the strains A729 (left panel) and A877 (right panel) grown in 50% CCh plus 4% sugarcane molasses. The results are the means of three independent experiments. The error bars represent the standard deviations.

of CDW, which is 1.5 fold the lipid content in the parental strain grown under the same conditions (Fig. 2A). When grown in AFM containing a mixture of 1% w/v xylose plus 1% w/v glucose/glycerol instead of 2% xylose, the maximum amount of lipids accumulated by the strain A877 remained similar ($27.9 \pm 3.2\%$ in xylose plus glucose and $28 \pm 1.9\%$ in xylose plus glycerol), as well as its FA profile (Fig. 2B). However, the mixture of xylose with glucose/glycerol allowed attaining lipid titers higher than those attained with xylose alone (1.4 ± 0.2 g_{Lipids}/L in xylose + glucose and 1.7 ± 0.1 g_{Lipids}/L in xylose + glycerol vs 0.8 ± 0.1 g_{Lipids}/L in xylose).

Simulations performed with the genome-scale metabolic model of *S. cerevisiae* indicated that the combination of xylose metabolism through the phosphoketolase pathway (which is heterologously expressed in the *A. gossypii* strain A877) with glucose metabolism through glycolysis could lead to an increase in the yield of lipids per substrate consumed, as compared to xylose metabolism alone (Caspeta and Nielsen, 2013). In agreement with these predictions, the mixture of xylose with glucose increased the yield of biomass (and lipids), from 42.6 ± 0.7 (and 10.7 ± 0.7) g/mol_{xylose} to 106.3 ± 3.0 (and 26.2 ± 2.8) g/mol_{xylose + glucose}, which justifies the observed increase in lipid titer in xylose + glucose cultures as compared to xylose cultures.

On the other hand, the overproduction of microbial lipids mostly depends on both the availability of immediate precursors and the continuous supply of NADPH as reducing power (Ratledge, 2004), which is also required for xylose reduction by xylose reductase (XR) (Fig. 1). Glycerol can be metabolized through glycerol-3-phosphate, which is the first committed precursor of the triglyceride biosynthetic pathway and therefore can be readily utilized for lipid biosynthesis (Wang et al., 2001; Zheng and Zou, 2001) (Fig. 1). The genome of *A. gossypii* encodes syntenologs of the yeast genes that are responsible of glycerol dissimilation (Gomes et al., 2014). Therefore, the combination of xylose with glycerol, a carbon source that besides being a direct source of important precursors for lipid biosynthesis (Fig. 1) also owns a higher degree of reduction than sugars, should positively contribute to lipid production by *A. gossypii* A877. Accordingly, the mixture of xylose with glycerol led to a slight increase in the yield of lipids (from 10.7 ± 0.7 g/mol_{xylose} to 12.9 ± 0.3 g/mol_{xylose + glycerol}), whereas the biomass yield remained similar (42.6 ± 0.7 g/mol_{xylose} vs 47.6 ± 3.6 g/mol_{xylose + glycerol}).

Altogether, these results suggest that the A877 strain is a promising biocatalyst for the production of microbial lipids from xylose-rich lignocellulosic hydrolysates mixed with other low-cost carbon sources. Multi-wastes valorization approaches have recently been described as a promising strategy for improvement of lignocellulosic-based processes (Cunha et al., 2018). Hence, further characterization of the growth

kinetics and the lipogenic capacity of this strain was devised using different formulations of industrial by-products.

3.2. Utilization of CCh and sugarcane molasses for the production of microbial lipids in *A. gossypii*

Lipid production from agroindustrial wastes has emerged as a promising alternative for the development of sustainable processes. Hence, the valorization of industrial wastes represents an important challenge for the biotechnological production of high-value metabolites. Recently, several low-cost and renewable carbon sources such as lignocellulosic hydrolysates, molasses and crude glycerol have been tested for single cell oil production by oleaginous yeast and filamentous fungi (Chaiyaso et al., 2019; Ganatsios et al., 2017; Gong et al., 2016; Ruan et al., 2012). Therefore, additional experiments focused on the characterization of the engineered strains in culture media formulations containing CCh and sugarcane molasses, which mainly contained xylose and sucrose, respectively.

CCh was prepared and detoxified to minimize the concentration of growth inhibitors such as organic acids and furan compounds (Cunha et al., 2019). Then, flask cultures in medium containing 50% v/v of detoxified CCh plus 4% w/v of sugarcane molasses were carried out with the strains A729 and A877. The initial concentration of carbohydrates in culture media are indicated in Table 1. The biomass production and sugar consumption were recorded until the carbon source was exhausted (Fig. 3). The results show that both strains were able to use the xylose and sucrose from the culture media for cell growth (Fig. 3); with sucrose being consumed more efficiently than xylose by both strains. Remarkably, the strain A729 was able to consume all the sugars after 4–5 days of culture, in contrast to the strain A877 that lasted 7 days until the carbon source was exhausted (Fig. 3). It is worthy to mention that the strain A729 suffered a sporulation and re-growth cycle when the hexose sugars were depleted in the culture media (36–48 h). This effect might be explained by a different utilization rate of hexose and pentose sugars in the A729 and A877 strains. Hence, the absence of sporulation might have contributed to increase the yield of biomass in the strain A877, which was higher than that in the strain A729 (Table 2).

Total lipid production of the two engineered strains was measured at different time-points during the stationary phase. As shown in the Fig. 4A, the strain A877 reached $38.1 \pm 1.5\%$ of CDW in lipid content at the end of the culture, which represents an increase of about 2.4-fold with regard to the parental strain. Noteworthy, the lipid titer achieved by strain A877 in this medium was about 2.7-fold higher than that achieved in synthetic AFM containing xylose plus glucose (Table 2).

Table 2
Yields and titers for the engineered strains A729 and A877 in low-cost substrate media formulations.

Strain	Media	Lipid Titer ^a (g _{Lipids} /L)	Lipid Yield (g _{Lipids} /mol)	Biomass Yield (g _{CDW} /mol)
A729	AFM 2% xylose	0.96 ± 0.03	8.8 ± 0.3	51.5 ± 2.8
	50% CCh + 4% molasses	1.8 ± 0.1	12.0 ± 0.8	73.8 ± 5.2
	50% CCh + 1% glycerol	1.7 ± 0.1	7.9 ± 0.4	45.5 ± 5.3
A877	AFM 2% xylose	0.8 ± 0.1	10.7 ± 0.7	42.6 ± 0.7
	AFM 1% xylose + 1% glucose	1.4 ± 0.2	26.2 ± 2.8	106.3 ± 3
	AFM 1% xylose + 1% glycerol	1.7 ± 0.1	13.8 ± 0.9	55.5 ± 2.4
	50% CCh + 4% molasses	3.9 ± 0.1	30.7 ± 0.9	90.7 ± 5.9
	50% CCh + 1% glycerol	3.0 ± 0.2	15.4 ± 0.8	53.2 ± 3.1

^a For both strains, the maximum lipid titers reached are shown, time at which the presented parameters were calculated. Since the medium formulations contain more than one carbon source, yields were determined per mol of substrate consumed.

The improved lipid titer can be explained by a higher concentration of sucrose/glucose in the CCh + molasses culture media (Table 1) that promoted a higher biomass density during the first 48 h of culture. These results demonstrate that co-fermentation of xylose-rich hydrolysates together with sucrose-rich molasses is a novel and efficient strategy for the production of microbial lipids in *A. gossypii*. Indeed, lipid accumulation is highest when mixed CCh-molasses are used, compared with cultures containing either CCh or molasses alone. In agreement with these results, the co-fermentation of sweet potato vine hydrolysate and molasses by *Trichosporon fermentans* was reported to increase its lipid content, as compared with fermentation of pure molasses (Shen et al., 2015).

In this regard, the mixture of xylose with glucose was shown above to promote the increase in lipid (and biomass) yields in strain A877. Moreover, it has been reported that the utilization of xylose in *A. gossypii* at early stages of culture can be hindered by an insufficient amount of biomass, thus causing an extended lag-phase (Díaz-Fernández et al., 2017). However, during the co-fermentation of xylose-rich and sucrose-rich wastes, the invertase activity of *A. gossypii*, which is responsible for the hydrolysis of sucrose (Aguilar et al., 2014), releases hexose sugars to strongly promote cell growth at early stages of culture, consequently decreasing the lag phase.

The consumption of xylose in the strain A877 at high biomass densities might be compromised by the availability of reducing power. Specifically, NADPH is extensively required for increased production of lipids in the rewired biosynthetic FA metabolism of strain A877, and therefore it might be lacking for the activity of XR, the first enzyme involved in the metabolism of xylose (Fig. 1). In addition, the results might indicate that, once biomass has reached high densities, carbon flux from pentose sugars would be mainly directed for lipid production (Caspeta and Nielsen, 2013).

The co-utilization of composite sugars derived from pentose-rich hydrolysates and molasses have been also introduced for the production of ethanol in *S. cerevisiae* as well as co-cultures of *S. cerevisiae* and *Pichia*

stipitis (Brar et al., 2019), thereby further supporting the strategy for the valorization of mixed formulations of industrial by-products.

3.3. Utilization of CCh and waste glycerol for the production of microbial lipids in *A. gossypii*

The transesterification of vegetable oils and animal fats from different bioprocesses, such as the production of biodiesel, generates crude glycerol as a by-product. Hence, an increasing demand of biodiesel will produce an excess of glycerol that can be considered as a promising feedstock for microbial fermentations (da Silva et al., 2009). In this context, the mixture of lignocellulosic hydrolysates and biodiesel-derived glycerol has been reported as an interesting strategy for the increase of lipid production (Gong et al., 2016). Therefore, considering our promising results in synthetic medium, we decided to characterize the performance of our engineered strains in culture media containing both CCh and crude glycerol.

Analysis of the growth performance of strains A729 and A877 in media containing 50% v/v of detoxified CCh plus 1% w/v of crude glycerol (Fig. 5 and Table 2) revealed that while strain A729 showed a simultaneous co-utilization of glycerol and xylose, the strain A877 exhibited a lower consumption rate for xylose. Simultaneous assimilation of glycerol and sugars at the beginning of the culture was also observed in the co-fermentation of corn stover hydrolysate and molasses for lipid production by *Cryptococcus curvatus* (Gong et al., 2016). This effect concurred with the accumulation of xylitol in the strain A729, which might reflect the saturation of the enzymatic activity of xylitol dehydrogenase (XDH). In contrast, the strain A877, which has a higher lipogenic capacity than A729, did not accumulate xylitol (Fig. 5). These results might be explained in the context of the availability of NADPH as reducing power both for the activity of XR and for the biosynthesis of lipids. A lower demand of NADPH for FA biosynthesis in the A729 strain might promote an increase of the XR enzymatic activity, which is dependent of NAD(P)H, thereby contributing to the saturation of XDH.

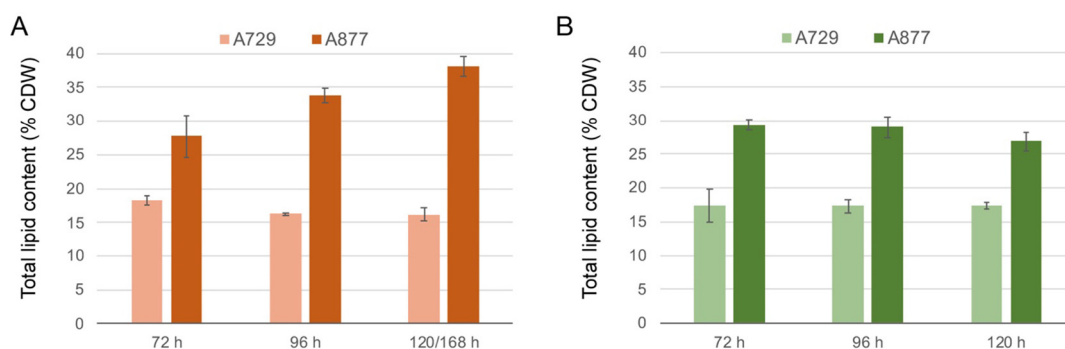


Fig. 4. Lipid production by engineered strains of *A. gossypii* using industrial wastes. A, total lipid content of the strains A729 and A877 grown in 50% CCh plus 4% sugarcane molasses. B, total lipid content of the strains A729 and A877 grown in 50% CCh plus 1% crude glycerol. The results are the means of three independent experiments. The error bars represent the standard deviations.

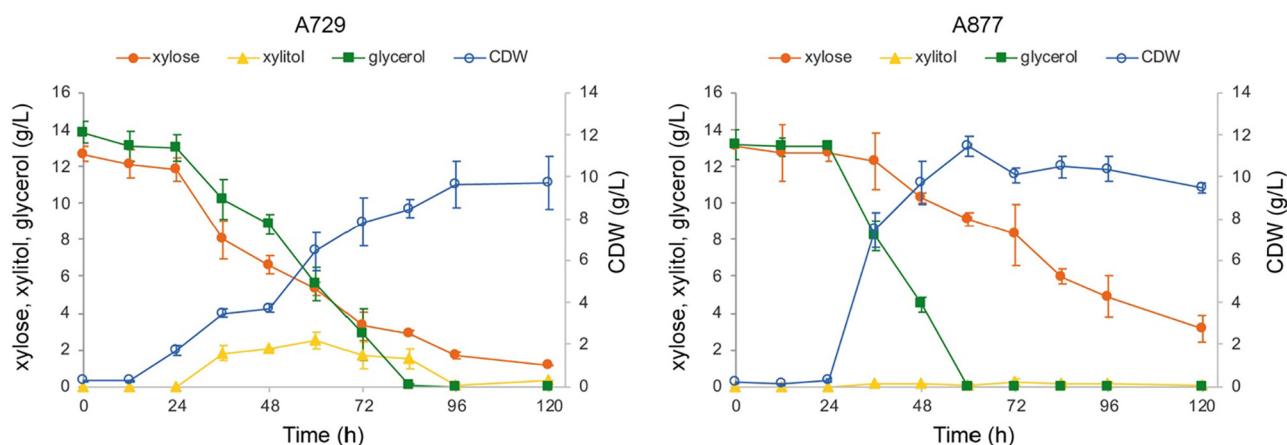


Fig. 5. Utilization of CCh plus crude glycerol by engineered strains of *A. gossypii*. Biomass production (CDW), xylose and glycerol consumption, and xylitol production of the strains A729 (left panel) and A877 (right panel) grown in 50% CCh plus 1% crude glycerol. The results are the means of three independent experiments. The error bars represent the standard deviations.

Conversely, the higher lipogenic capacity of the strain A877 might restrict the supply of NAD(P)H for XR, thus limiting the consumption of xylose and, moreover, preventing the accumulation of xylitol. In this regard, the use of heterologous enzymes for xylose utilization with different cofactor requirements, such as XR and XDH from innate xylose-fermenting yeasts (Cunha et al., 2019), might help to increase the xylose consumption rate of the strain A877.

The production of lipids from CCh and crude glycerol was measured at different time-points of the cultures. In agreement with the previous results, the strain A877 showed higher titer of total lipids than the strain A729 (Table 2 and Fig. 4B). The strain A877 was able to accumulate $29.3 \pm 0.8\%$ of CDW in lipid content (lipid titer of 3 g/L) using CCh and crude glycerol, thus demonstrating the efficiency of this strain for the utilization of mixed waste by-products. In this medium, a higher degree of mycelial lysis can contribute to the slight decrease of lipid content at late time-points (Fig. 4B), which may contribute to the generally lower yields obtained in this medium as compared to CCh plus sugarcane molasses (Table 2). The increased mycelial lysis in CCh plus glycerol can be a consequence of a lower content of the carbon source (Table 1). In addition, the concentration of carbon source that was consumed either for biomass or lipid production was significantly lower compared to CCh plus sugarcane molasses.

Similar studies have reported the co-fermentation of crude glycerol together with fresh yeast extract or ammonium sulfate, using the oleaginous *Y. lipolytica* and obtaining lipid titers ranging from 0.8 to 1.3 g/L (Poli et al., 2014). Also, the importance of providing a higher intracellular NADH/NAD⁺ ratio, through the co-utilization of glycerol and mixed sugars has been described for the production of 1,3-propanediol in *Clostridium diolis* (Xin et al., 2016).

The lipid titers obtained in this work are within the range of previous reports using flask cultures (Donot et al., 2014; Jagtap and Rao, 2018; Lazar et al., 2018). For example, lipid titers ranging from 1.1 g/L to 6.7 g/L have been obtained using *Y. lipolytica* flask cultures [see (Lazar et al., 2018) and references therein]. Moreover, the optimization of culture conditions in a fed-batch bioreactor would increase significantly the lipid production of the *A. gossypii* engineered strains. Indeed, previous works reported the optimization of culture parameters such as the oxygenation conditions and inoculum densities in bioreactors to increase lipid titers over two orders of magnitude, depending of the carbon source and the fermentation conditions [see (Lazar et al., 2018) and references therein]. The results hereby presented show the feasibility of using *A. gossypii* as a cell factory for the valorization of industrial waste by-products. Moreover, these results pave the way for additional valorization processes as alternative genomic manipulations can determine the use of engineered strains for the production of other

high-added value compounds.

4. Conclusions

This work reports engineered strains of *A. gossypii* able to accumulate 30–40% of CDW in lipid content using wastes as raw materials. The utilization of CCh, sugarcane molasses and crude glycerol for the production of microbial lipids represents an excellent strategy for the valorization of industrial by-products. Downstream optimization in a controlled bioreactor would increase titer, yield, and productivity of the engineered strains. The use of *A. gossypii* as biocatalyst allows the exploitation of these industrial wastes not only for lipid biosynthesis, but also for the production of other high-added value compounds such as riboflavin, folic acid or nucleosides.

Funding

This work was supported by: the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grant numbers BIO2014-56930-P and BIO2017-88435-R) and the Junta de Castilla y León (grant number SA016P17); the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) under the scope of the strategic funding of UID/BIO/04469/2019, PhD grant PD/BD/113812/2015 to R. Silva (Doctoral Program in Applied and Environmental Microbiology), the MultiBiorefinery project (POCI-01-0145-FEDER-016403) and the BioTecNorte operation (NORTE-01-0145-FEDER-000004) funded by the European Regional Development Fund under the scope of Norte2020 - Programa Operacional Regional do Norte. DDF was recipient of USAL predoctoral fellowship from the University of Salamanca.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank María Dolores Sánchez and Silvia Domínguez for excellent technical help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122054>.

References

- Aguiar, T.Q., Dinis, C., Magalhães, F., Oliveira, C., Wiebe, M.G., Penttilä, M., Domingues, L., 2014. Molecular and functional characterization of an invertase secreted by *Ashbya gossypii*. *Mol. Biotechnol.* 56, 524–534. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9726-9>.
- Aguiar, T.Q., Silva, R., Domingues, L., 2015. *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: a historical perspective and emerging biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1774–1786. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.001>.
- Aguiar, T.Q., Silva, R., Domingues, L., 2017. New biotechnological applications for *Ashbya gossypii*: challenges and perspectives. *Bioengineered* 8, 309–315. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1234543>.
- Blazek, 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.* <https://doi.org/10.1038/ncomms4131>.
- Brar, K.K., Agrawal, D., Chadha, B.S., Lee, H., 2019. Evaluating novel fungal secretomes for efficient saccharification and fermentation of composite sugars derived from hydrolysate and molasses into ethanol. *Bioresour. Technol.* 273, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.004>.
- Caspetta, L., Nielsen, J., 2013. Economic and environmental impacts of microbial biodiesel. *Nat. Biotechnol.* 31, 789–793. <https://doi.org/10.1038/nbt.2683>.
- Chaiyasong, T., Manowattana, A., Techapun, C., Watanabe, M., 2019. Efficient bioconversion of enzymatic corn cob hydrolysate into biomass and lipids by oleaginous yeast *Rhodospiridium paludigenum* KM281510. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1591985>.
- Cunha, M., Romaní, A., Carvalho, M., Domingues, L., 2018. Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation. *Bioresour. Technol.* 250, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.023>.
- Cunha, J.T., Soares, P.O., Romaní, A., Thevelein, J.M., Domingues, L., 2019. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnol. Biofuels* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>.
- da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.
- Díaz-Fernández, D., Lozano-Martínez, P., Buey, R.M., Revuelta, J.L., Jiménez, A., 2017. Utilization of xylose by engineered strains of *Ashbya gossypii* for the production of microbial oils. *Biotechnol. Biofuels* 10, 3. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0685-9>.
- Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavler, A., Gaffney, T.D., Phillipsen, P., 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science* (80-) 304, 304–307. <https://doi.org/10.1126/science.1095781>.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Strub, C., Schorr-Galindo, S., 2014. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: production and genetics. *Biomass Bioenergy* 68, 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.016>.
- European Commission, 2018. A sustainable Bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment Updated Bioeconomy Strategy. Doi: 10.2777/478385.
- Ganatsios, V., Koutinas, A.A., Bekatorou, A., Panagopoulos, V., Banat, I.M., Terpoi, A., Kopsahelis, N., 2017. Porous cellulose as promoter of oil production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using mixed agroindustrial wastes. *Bioresour. Technol.* 244, 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.163>.
- Garrote, G., Yáñez, R., Alonso, J.L., Parajó, J.C., 2008. Coproduction of oligosaccharides and glucose from corn cobs by hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 1336–1345. <https://doi.org/10.1021/ie071201f>.
- Gomes, D., Aguiar, T.Q., Dias, O., Ferreira, E.C., Domingues, L., Rocha, I., 2014. Genome-wide metabolic re-annotation of *Ashbya gossypii*: new insights into its metabolism through a comparative analysis with *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *BMC Genomics* 15, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-810>.
- Gong, Z., Zhou, W., Shen, H., Zhao, Z.K., Yang, Z., Yan, J., Zhao, M., 2016. Co-utilization of corn stover hydrolysates and biodiesel-derived glycerol by *Cryptococcus curvatus* for lipid production. *Bioresour. Technol.* 219, 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.021>.
- Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2019. Lignocellulosic biorefineries in Europe: current state and prospects. *Trends Biotechnol.* 37, 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.002>.
- Jagtap, S.S., Rao, C.V., 2018. Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9015–9036. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9294-9>.
- Jiménez, A., Santos, M.A., Pompejus, M., Revuelta, J.L., 2005. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5743–5751. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5743-5751.2005>.
- Jiménez, A., Muñoz-Fernández, G., Ledesma-Amaro, R., Buey, R.M., Revuelta, J.L., 2019. One-vector CRISPR/Cas9 genome engineering of the industrial fungus *Ashbya gossypii*. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13425>.
- Lazar, Z., Liu, N., Stephanopoulos, G., 2018. Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends Biotechnol.* 36, 1157–1170. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.06.007>.
- Ledesma-Amaro, R., Buey, R.M., Revuelta, J.L., 2015a. Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*. *Microb. Cell Fact.* 14, 58. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0234-4>.
- Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martínez, P., Jiménez, A., Revuelta, J.L., 2015b. Engineering *Ashbya gossypii* for efficient biolipid production. *Bioengineered* 6, 119–123. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1011525>.
- Ledesma-Amaro, R., Jiménez, A., Revuelta, J.L., 2018. Pathway grafting for polyunsaturated fatty acids production in *Ashbya gossypii* through golden gate rapid assembly. *ACS Synth. Biol.* 7, 2340–2347. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00287>.
- Lennen, R.M., Pfleger, B.F., 2013. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 1044–1053. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.028>.
- Lozano-Martínez, P., Ledesma-Amaro, R., Revuelta, J.L., 2016. Engineering *Ashbya gossypii* for the production of ricinoleic and linoleic acid. *Chem. Eng. Trans.* <https://doi.org/10.33031/CET1649043>.
- Lozano-Martínez, P., Buey, R.M., Ledesma-Amaro, R., Jiménez, A., Revuelta, J.L., 2017. Engineering *Ashbya gossypii* strains for de novo lipid production using industrial by-products. *Microb. Biotechnol.* 10, 425–433. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12487>.
- Neess, D., Bek, S., Engelsby, H., Gallego, S.F., Færgeman, N.J., 2015. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: role of acyl-CoA binding proteins. *Prog. Lipid Res.* 59, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.001>.
- Pfleger, B.F., Gossing, M., Nielsen, J., 2015. Metabolic engineering strategies for microbial synthesis of oleochemicals. *Metab. Eng.* 29, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.009>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>.
- Qiao, K., Imam Abidi, S.H., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N., Kumaran Ajikumar, P., Stephanopoulos, G., 2015. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.* 29, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.005>.
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A.P., Wei, D., 2017. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour. Technol.* 245, 1507–1519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>.
- Ratledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807–815. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends Biotechnol.* 34, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>.
- Revuelta, J.L., Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martínez, P., Díaz-Fernández, D., Buey, R.M., Jiménez, A., 2017. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7>.
- Rivas, B., Torre, P., Domínguez, J.M., Converti, A., Parajó, J.C., 2006. Purification of xylylitol obtained by fermentation of corn cob hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4430–4435. <https://doi.org/10.1021/jf053156x>.
- Ruan, Z., Zhanotti, M., Wang, X., Ducey, C., Liu, Y., 2012. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 110, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.053>.
- Ruhal, R., Aggarwal, S., Choudhury, B., 2011. Suitability of crude glycerol obtained from biodiesel waste for the production of trehalose and propionic acid. *Green Chem.* 13, 3492–3498. <https://doi.org/10.1039/c1gc15847c>.
- Schneider, R., Daum, G., 2006. Extraction of yeast lipids. In: Xiao, W. (Ed.), *Yeast Protocol. Humana Press, Totowa, NJ*, pp. 41–45. Doi 10.1385/1-59259-958-3:041.
- Schwechheimer, S.K., Park, E.Y., Revuelta, J.L., Becker, J., Wittmann, C., 2016. Biotechnology of riboflavin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7256-z>.
- Serrano-Amatriain, C., Ledesma-Amaro, R., López-Nicolás, R., Ros, G., Jiménez, A., Revuelta, J.L., 2016. Folic acid production by engineered *Ashbya gossypii*. *Metab. Eng.* 38, 473–482. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.011>.
- Shen, Q., Lin, H., Wang, Q., Fan, X., Yang, Y., Zhao, Y., 2015. Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of *Trichosporon fermentans* in high-density molasses fermentation. *Bioresour. Technol.* 176, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.045>.
- Shi, S., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J., 2014. Improving production of malonyl coenzyme A-derived metabolites by abolishing Snf1-dependent regulation of Accl1. *MBio* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01130-14>.
- Silva, R., Aguiar, T.Q., Coelho, E., Jiménez, A., Revuelta, J.L., Domingues, L., 2019. Metabolic engineering of *Ashbya gossypii* for deciphering the de novo biosynthesis of γ -lactones. *Microb. Cell Fact.* 18, 62. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1113-1>.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B.A., 2001. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.* 19, 201–223. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X).
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D., 1994. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*
- Xin, B., Wang, Y., Tao, F., Li, L., Ma, C., Xu, P., 2016. Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium diolis*. *Syst. Res. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep19044>.
- Zheng, Z., Zou, J., 2001. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 41710–41716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104749200>.