

RESUMEN

Los monoterpenos (C10) son isoprenoides habitualmente utilizados como aditivos aromáticos, son componentes importantes del aroma de los vinos y algunos tienen propiedades antimicrobianas y/o beneficiosas para la salud. La producción eficiente de estos metabolitos en microorganismos podría ser una alternativa más económica y respetuosa con el medio ambiente que las técnicas empleadas en la actualidad: síntesis química y/o extracción de fuentes naturales.

En las plantas los monoterpenos son producidos por monoterpeno sintetas que utilizan como sustrato geranyl pirofosfato (GPP), siendo éste un intermediario común de la ruta de isoprenoides en microorganismos y organismos superiores, lo que abre la posibilidad de producirlos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene el calificativo GRAS, y que ha sido además ampliamente utilizada para la biotransformación y producción de enzimas y metabolitos de interés biotecnológico.

En este trabajo se ha caracterizado y mejorado, mediante técnicas de ingeniería metabólica, la capacidad inherente que tiene esta levadura para la producción heteróloga de monoterpenos (linalol, geraniol, etc.), que puedan mejorar las características organolépticas y/o funcionales de ciertos alimentos al ser usados como aditivos o al aumentar su concentración durante el propio proceso de elaboración (p. ej. vinificación). Entre los resultados más destacados están la selección de la cepa vínica industrial T₇₃ por su mayor capacidad para producir monoterpenos, y la mejora de dicha producción mediante la sobreexpresión desregulada de la enzima Hmg1p (cataliza la formación del ácido mevalónico, MVA) y del gen *IDII* (codifica isopentenil pirofosfato isomerasa, que cataliza la isomerización de los sustratos de la farnesil pirofosfato sintasa, FPPS). Además, la caracterización del rol de la enzima FPPS en la disponibilidad de GPP para su aprovechamiento por la enzima linalol sintasa de *Clarkia breweri*, derivó en una producción de linalol 50 veces mayor en cepas en las que una versión modificada en su centro activo (K197E), codificada por el alelo *erg20-2*, reemplazaba a la enzima silvestre (codificada por *ERG20*); alcanzándose una mejora global de 80 veces respecto a la producción de linalol inicial ($14,51 \pm 0,90 \mu\text{g/L}$), al sobreexpresar conjuntamente el gen *IDII* y el alelo *erg20-2* en cepas productoras de linalol que carecen de la función FPPS endógena ($1144,68 \pm 139,39 \mu\text{g/L}$).

Las cepas productoras de geraniol (expresan el gen *GES* que en *Ocimum basilicum* - albahaca- codifica geraniol sintasa) derivadas de T₇₃ se incluyeron en ensayos de microvinificación y la concentración de este monoterpeno en el vino final no sólo estuvo por encima de su umbral de percepción, sino que se produjo una dispersión metabólica del geraniol hacia otros monoterpenos (linalol, nerol y citronelol) y ésteres (geranyl y citronelil acetato) aromáticos. Además, el incremento de la producción de monoterpenos observado en condiciones de laboratorio en cepas que sobreexpresan el gen *IDII* se reprodujo en estos ensayos, demostrando que la modificación de pasos clave de la ruta MVA es una estrategia válida para modular y/o mejorar el aroma del vino.