



Instituto de Agroquímica y Tecnología de
Alimentos (IATA-CSIC)
Departamento de Biotecnología
Grupo de Biotecnología de Hongos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Producción heteróloga de monoterpenos en *Saccharomyces cerevisiae*: selección y mejora de cepas mediante técnicas de ingeniería metabólica

Tesis doctoral presentada por:

Juan Rico Molíns

*para optar al grado de doctor en
Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria*

Dirigida por:

Dra. Margarita L. Orejas Suárez

Valencia, febrero de 2015



Instituto de Agroquímica y Tecnología de
Alimentos (IATA-CSIC)
Departamento de Biotecnología
Grupo de Biotecnología de Hongos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

La Dra. Margarita L. Orejas Suárez, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA)

CERTIFICA:

Que la presente memoria “Producción heteróloga de monoterpenos en *Saccharomyces cerevisiae*: selección y mejora de cepas mediante técnicas de ingeniería metabólica” constituye la tesis doctoral de D. Juan Rico Molíns para optar al grado de doctor en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria por la Universidad Politécnica de Valencia. Asimismo, certifica haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Valencia, a febrero de 2015.

Fdo. Margarita L. Orejas Suárez

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 sintasas 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 solo 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.

RESUM

Els monoterpens (C10) són isoprenoids habitualment utilitzats com additius aromàtics, són components importants de l'aroma dels vins i alguns tenen propietats antimicrobianes i/o beneficioses per a la salut. La producció eficient d'aquests metabòlits en microorganismes podria ser una alternativa més econòmica i respectuosa amb el medi ambient que les tècniques emprades en l'actualitat: síntesi química i/o extracció de fonts naturals.

A les plantes els monoterpens són produïts per monoterpeno sintases que utilitzen com a substrat geranil pirofosfat (GPP), sent aquest un intermediari comú de la ruta dels isoprenoids en microorganismes i organismes superiors, el que obri la possibilitat de produir-los en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, amb qualificatiu GRAS, i que ha sigut a més àmpliament utilitzat per a la biotransformació i producció d'enzims i metabòlits d'interès biotecnològic.

En aquest treball s'ha caracteritzat i millorat, mitjançant tècniques d'enginyeria metabòlica, la capacitat inherent que té aquest llevat per a la producció heteròloga de monoterpens (linalol, geraniol, etc.), que puguen millorar les característiques organolèptiques i/o funcionals de certs aliments en ser usats com additius o en augmentar la seua concentració durant el propi procés d'elaboració (p. ex. vinificació). Entre els resultats més destacats es troben la selecció de la soca vínica industrial T₇₃ per la seua major capacitat per a produir monoterpens, i la millora d'aquesta producció mitjançant la sobreexpressió desregulada de l'enzim Hmg1p (catalitza la formació de l'àcid mevalònic, MVA) i del gen *IDII* (codifica isopentenil pirofosfat isomerasa, que catalitza la isomerització dels substrats de la farnesil pirofosfat sintasa, FPPS). A més, la caracterització del rol de l'enzim FPPS en la disponibilitat de GPP per al seu aprofitament per l'enzim linalol sintasa de *Clarkia breweri*, va derivar en una producció de linalol 50 vegades major en soques en les que una versió modificada en el seu centre actiu (K197E), codificada per l'al·lel *erg20-2*, reemplaçava a l'enzim silvestre (codificada per *ERG20*); aconseguint una millora global de 80 vegades respecte a la producció de linalol inicial ($14,51 \pm 0,90 \mu\text{g/L}$), en sobreexpressar conjuntament el gen *IDII* i l'al·lel *erg20-2* en soques productores de linalol que no tenen la funció FPPS endògena ($1144,68 \pm 139,39 \mu\text{g/L}$).

Les soques productores de geraniol (expressen el gen *GES* que en *Ocimum basilicum* -alfàbrega- codifica geraniol sintasa) derivades de T₇₃ es van incloure en assajos de microvinificació i la concentració d'aquest monoterpè en el vi final no només va estar per sobre del seu llindar de percepció, sinó que es va produir una dispersió metabòlica del geraniol cap a altres monoterpens (linalol, nerol i citronehlo) i èsters (geranil i citronehllil acetat) aromàtics. A més, l'increment de la producció de monoterpens observat en condicions de laboratori en soques que sobreexpressen el gen *IDII* es va reproduir en aquests assajos, demostrant que la modificació de passos clau de la ruta MVA és una estratègia vàlida per modular i/o millorar l'aroma del vi.

SUMMARY

Monoterpenes (C₁₀) are isoprenoids usually employed as aromatic additives, are important components of wine aroma and some of them have antimicrobial and health beneficial properties. An efficient microbial production of these metabolites could be an inexpensive and environmentally friendly alternative to current techniques: chemical synthesis or extraction from natural sources.

They are usually produced in plants from geranyl pyrophosphate (GPP), a common intermediate of isoprenoid pathway in microorganisms and higher organisms; what opens the possibility of producing them in yeasts as *Saccharomyces cerevisiae*, qualified as GRAS, and that has been widely employed for biotransformation and production of enzymes and metabolites of biotechnological interest.

In this work, the inherent ability of this yeast for heterologous production of monoterpenes (linalool, geraniol, etc.) capable to improve organoleptic and/or functional properties of certain foods either being used as additives or produced during the elaboration process (e.g. vinification) has been characterized and improved by metabolic engineering approaches. Among the most relevant results we can find the selection of wine strain T₇₃ because of its better ability to produce monoterpenes, and the improvement of this production by overexpressing a deregulated version of Hmg1p (catalyzes mevalonic acid synthesis, MVA) and *IDII* (encodes isopentenyl pyrophosphate isomerase, that catalyzes the isomerization of farnesyl pyrophosphate synthase -FPPS- substrates). In addition, characterization of the FPPS role in GPP availability for the *Clarkia breweri* linalool synthase resulted in a 50 times increased production in yeast strains with wild-type enzyme (encoded by *ERG20*) replaced by one modified in its active site (K197E), encoded by *erg20-2* allele; reaching a global improvement of 80 times the basal linalool production ($14.51 \pm 0.90 \mu\text{g/L}$) when coexpressing *IDII* gene and *erg20-2* allele in linalool producing strains lacking endogenous FPPS activity ($1144.68 \pm 139.39 \mu\text{g/L}$).

Geraniol producing strains (bearing *Ocimum basilicum* -sweet basil- *GES* gene that encodes geraniol synthase) derived from T₇₃ were included in microvinification assays and geraniol concentration was over its perception threshold and a metabolic dispersion to other monoterpene (linalool, nerol and citronellol) and aromatic esters (geranyl and citronellyl acetate) was also detected. Increased monoterpene production established in *IDII* overexpressing strains under laboratory conditions was reproduced in these assays, demonstrating that the modification of key steps of MVA pathway is a valid strategy to modulate and/or improve wine aroma.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de la presente tesis doctoral se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Departamento de Biotecnología de los Alimentos del IATA (CSIC), beneficiándose de este modo de las instalaciones y servicios proporcionados por el centro y la institución. Dicho proceso formativo e investigador no hubiera sido posible de no ser además por la concesión, por parte del Ministerio de Educación y Ciencia, de una beca FPI (Ref. BES2006-13745) asociada al proyecto titulado “Ingeniería metabólica de la ruta de isoprenoides para la producción de monoterpenos en levaduras y hongos filamentosos” (AGL2005-02542) y a la financiación del proyecto CSD2007-0063 dentro del programa (Consolider – Ingenio) por parte de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Asimismo, me gustaría agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación la admisión y financiación de mi solicitud para realizar una estancia investigadora dentro del programa predoctoral FPI previamente mencionado en el “Wine Research Centre, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver, Canada”.

Dejando de lado los agradecimientos oficiales, me gustaría destacar la figura de la Dra. Margarita L. Orejas. Su incansable esfuerzo y dedicación hicieron posible en primer lugar que existiera la posibilidad de realizar este estudio predoctoral bajo su tutela, y a lo largo de mi período formativo ha mantenido y me ha transmitido siempre una gran pasión por la investigación a la vez que me ha infundido los valores del rigor científico. Por esto y mucho más, pero sobre todo por darme esta oportunidad, GRACIAS.

No quiero dejar de lado en ningún caso al que ha sido mi tutor en el programa de doctorado en “Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria”, el Dr. Daniel Vidal (UPV), cuya ayuda ha sido precisada en numerosas ocasiones para solventar dudas y gestiones de tipo administrativo, facilitando sobremanera la comunicación y la resolución favorable de dichos procesos.

Este trabajo se ha visto además enormemente favorecido por la colaboración desinteresada de numerosos investigadores de diferentes instituciones. Empezando por el Profesor Eran Pichersky, de la Universidad de Michigan, que nos facilitó los plásmidos que contienen las secuencias codificantes de las monoterpeno sintasas aquí utilizadas. De igual manera agradezco los plásmidos y cepas de levadura cedidos por los Doctores Agustín Aranda, Marcellí del

Olmo y Emilia Matallana de la Universidad de Valencia y el Dr. Julio Polaina del (IATA-CSIC). Los ensayos de microvinificación se llevaron a cabo usando mosto cedido por los Doctores Braulio Esteve (Universitat Rovira i Virgili) y José Manuel Guillamón (IATA-CSIC).

Mención aparte merece el Dr. José Vicente Gil, de la Universidad de Valencia, al cual debo agradecer por compartir sus conocimientos relativos a la técnica de cromatografía de gases y espectrometría de masas, así como por las discusiones científicas mantenidas en torno a los ensayos de microvinificación y por permitirnos el acceso a los incubadores instalados en su laboratorio a tal fin.

No sería justo dejar fuera de este apartado a mis compañeros en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos. En primera instancia me gustaría agradecer al Dr. Andrew P. Maccabe por su asesoramiento a nivel experimental y también por sus correcciones y sugerencias lingüísticas a la hora de redactar documentos en inglés. La Doctora Lluïsa Ventura me ayudó en numerosos aspectos durante mi estancia en el laboratorio, proporcionándome muy valiosos consejos e información sobre buenas prácticas de seguridad e higiene en un laboratorio de investigación a la par que se ocupaba en gran medida de los aspectos logísticos. Al Dr. Michel Flipphi he de agradecerle su dedicación para enseñarme al detalle la técnica northern para la detección de ARN, que fue de gran utilidad en mis ensayos. A Óscar Herrero por sus consejos relativos a la detección de monoterpenos y el trabajo previo realizado que condujo al establecimiento de desarrollos experimentales que facilitaron el diseño y ejecución de mis propios ensayos. Al ahora Doctor Juan Antonio Tamayo, por su excelente acogida, ayudándome sobre todo en mis inicios a integrarme tanto científica como socialmente en el laboratorio y el departamento. Por último, pero no por ello menos importante, la Doctora Ester Pardo, con la que he compartido una estrecha colaboración en algunos de los desarrollos experimentales que forman parte de este trabajo, y junto con la que he aprendido el valor de la dedicación y la constancia.

También me gustaría agradecer a los Doctores Gaspar Pérez, Vicente Monedero y María Jesús Yebra por la experiencia adquirida bajo su tutela previa al comienzo de mi proyecto de tesis doctoral. Dicha experiencia me abrió en primera instancia las puertas hacia la carrera investigadora y me preparó para mi posterior adaptación al proyecto de investigación inherente a mi tesis doctoral. Aún más, siempre se han mostrado predispuestos a la colaboración y a prestarme ayuda cuando la he necesitado durante esta etapa.

Mi estancia en el “Wine Research Centre” ocupa un lugar especial dentro de mi experiencia predoctoral a nivel profesional por la fenomenal acogida

recibida por parte del Dr. Hennie J.J. van Vuuren y el soporte científico y técnico que el Dr. Zongli Luo y Lina Mandilao me proporcionaron, pero también a nivel personal por el magnífico emplazamiento del campus universitario y el compañerismo del Dr. Christopher Walkey y Calvin Adams.

Por supuesto toda esta experiencia no sería lo mismo sin el factor humano, he tenido la suerte de compartir gran parte de este tiempo con personas fabulosas rodeándome a diario en las dependencias del IATA. Por nombrar algunas de las que no he citado todavía aquí me acuerdo especialmente de Enric, Meri, Ricardo, Amparo, María, Rosana, Alicia, Jordi, Peris, Roberto, Silvia, Montse, Mario, Álvaro, Sergio, Ana, David, Pedro y tantos otros que me resulta imposible enumerar a todos ellos.

También durante mi fase de redacción pasé mucho tiempo en las instalaciones del IVIA donde me recibieron como a uno más y me ofrecieron su apoyo y su amistad. Entre los que me acompañaron durante este período se encuentran Dani, Silvia, Bego, Josep, Neus, Belén y Vidal.

Cerrando el apartado de amistades, me gustaría acordarme también de mis amigos de la Falla “El Cid” y de “La Soroixa”, por haberme mostrado su apoyo incondicional, pese a que para la mayoría este mundillo científico queda un poco alejado de su realidad diaria.

No cabe duda en ningún caso de que toda esta experiencia no habría tenido lugar si no fuera porque cuento con unos padres maravillosos que se han esforzado durante toda mi vida, y aún lo hacen, para procurarme las mejores oportunidades tanto a nivel educativo como personal y no hay palabras en el mundo que puedan mostrar mi agradecimiento, porque los conocimientos se adquieren en la escuela pero la educación es mucho más que eso. ¡¡Gracias PAPÁS!!

Sin dejar el ámbito familiar tengo que agradecer a mi única hermana por su apoyo constante a lo largo de mi vida y por esa maravillosa familia que ha formado junto con mí cuñado Pedro con el que tantas vivencias he compartido y esos dos sobrinos tan vivaces que no cambiaron únicamente su vida sino la de todos.

Quisiera terminar este apartado agradeciendo sobremanera a mi esposa, junto con la que he crecido como persona mientras nuestra relación se afianzaba en paralelo al desarrollo de este trabajo, por su amor, apoyo y comprensión en los buenos momentos pero también en los no tan buenos cuando la ciencia pone a prueba tu entereza. Durante mis estudios de doctorado nuestra relación brotó y se asentó con la convivencia y el matrimonio para florecer en los últimos tiempos con el nacimiento de nuestro primer hijo, Arnau, que es sin duda el símbolo más valioso de nuestro amor.

A Arnau

“Para que el desconocimiento sea un ápice menor.”

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Terpenos	3
1.1. Clasificación general	3
1.2. Función biológica	4
1.3. Aplicaciones y comercialización	5
1.4. Métodos de obtención.....	6
1.5. Biosíntesis. Ruta del ácido mevalónico y ruta del metil-eritritol fosfato.....	7
1.6. Ingeniería metabólica de las rutas de biosíntesis	11
2. Monoterpenos	16
2.1. Clasificación.....	16
2.2. Función biológica	16
2.3. Aplicación industrial	18
2.4. Procesos de obtención	19
2.5. Biosíntesis. Monoterpeno sintasas	19
2.6. Ingeniería metabólica. Producción en plantas y microorganismos.....	20
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.1. Herramientas moleculares	24
3.2. Ruta de síntesis de isoprenoides.....	26
3.3. <i>S. cerevisiae</i> y la fermentación vínica.....	28
4. El aroma del vino	29
4.1. Aroma primario o varietal.....	29
4.2. Aroma secundario. Papel de <i>S. cerevisiae</i>	31
4.3. Aroma terciario. Procesos postfermentativos	32
4.4. Estrategias de mejora del aroma del vino.....	32
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. Microorganismos	41
1.1. Bacterias	41
1.2. Levaduras	41
2. Plásmidos	46
3. Oligonucleótidos	48
4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	53
4.1. <i>E. coli</i>	53

4.1.1.	LB.....	53
4.1.2.	MTB	53
4.2.	<i>S. cerevisiae</i>	53
4.2.1.	Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.....	53
4.2.1.1.	SD.....	53
4.2.1.2.	YPD	54
4.2.1.3.	Medio de esporulación	54
4.2.1.4.	Análisis de la estabilidad plasmídica	54
4.2.2.	Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación	55
5.	Manipulación de ácidos nucleicos	55
5.1.	Construcción de plásmidos.....	55
5.1.1.	pGEM-T Easy	55
5.1.2.	Digestión.....	56
5.1.3.	Tratamientos enzimáticos.....	56
5.1.4.	Purificación de fragmentos de ADN	56
5.1.5.	Ligación.....	57
5.2.	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	57
5.2.1.	Extracción rápida	57
5.2.2.	Recuperación de plásmidos.....	57
5.3.	Recuperación de plásmidos de <i>S. cerevisiae</i>	58
5.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
5.4.1.	PCR en gradiente	58
5.4.2.	PCR de fusión.....	58
5.4.3.	PCR asimétrica	59
5.5.	Secuenciación de fragmentos de ADN	59
5.6.	Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa	60
5.7.	Extracción de ADN de <i>S. cerevisiae</i>	60
5.7.1.	Extracción rápida de ADN de <i>S. cerevisiae</i>	60
5.7.2.	Extracción de ADN total.....	60
5.7.3.	Extracción de ADN genómico	61
5.8.	Análisis de fragmentos de ADN por el método Southern.....	61
5.9.	Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i>	62
5.10.	Análisis de ARN por el método northern.....	62
6.	Manipulación de proteínas.....	63
6.1.	Extracción de las proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i>	63
6.2.	Cuantificación de proteínas	63
6.3.	Determinación de actividades enzimáticas.....	63
7.	Detección y cuantificación de terpenos	63
7.1.	Cromatografía de gases	63
7.2.	Espectrometría de masas	64
8.	Métodos de transformación de microorganismos	64

8.1. <i>E. coli</i>	64
8.1.1. Preparación de células termocompetentes	64
8.1.2. Transformación por choque térmico	65
8.2. <i>S. cerevisiae</i>	65
9. Análisis bioinformáticos	66
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 67
I. Caracterización de la capacidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción heteróloga de monoterpenos.....	69
I.1. Evaluación del potencial productor de distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i>	69
I.1.1. Construcción de plásmidos episomales para expresar los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en <i>S. cerevisiae</i>	71
I.1.2. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que expresan los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	73
I.1.3. Producción de linalol en cepas de laboratorio haploides de <i>S. cerevisiae</i> que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	74
I.1.4. Producción de linalol en cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i> que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	76
I.1.5. Producción de geraniol en cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i> que expresan el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	80
I.2. Selección de un vector de expresión adecuado para la producción de monoterpenos en <i>S. cerevisiae</i>	86
I.2.1. Construcción de una batería de plásmidos para la expresión de los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en <i>S. cerevisiae</i>	89
I.2.2. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> desde distintos plásmidos de expresión	91
I.2.3. Producción de monoterpenos de la cepa vínica T ₇₃ -4 con los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> integrados en el locus <i>URA3</i>	92
I.2.4. Producción de linalol en la cepa de laboratorio W303-1A con el número de copias del gen <i>LIS</i> incrementado por complementación con el marcador <i>LEU2-d</i>	94
I.2.5. Producción de linalol en cepas derivadas de T ₇₃ con el número de copias del gen <i>LIS</i> incrementado por complementación con el marcador <i>LEU2-d</i>	97

II. Optimización de la producción de monoterpenos mediante técnicas de ingeniería metabólica	101
II.1. Sobreexpresión de la región catalítica de la enzima Hmg1p	101
II.1.1. Construcción de plásmidos para la coexpresión del alelo ^{cat} <i>hmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> en <i>S. cerevisiae</i>	103
II.1.2. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresan el alelo ^{cat} <i>hmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	104
II.1.3. Producción de monoterpenos en cepas derivadas de BQS252 y T ₇₃ -4 que sobreexpresan el alelo ^{cat} <i>hmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	105
II.2. Caracterización del efecto que tiene la sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> sobre la producción heteróloga de monoterpenos en <i>S. cerevisiae</i>	107
II.2.1. Construcción de plásmidos para sobreexpresar en <i>S. cerevisiae</i> el gen <i>IDI1</i> junto con los genes <i>LIS</i> o <i>GES</i> , con y sin el alelo ^{cat} <i>hmg1</i>	109
II.2.2. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresan el gen <i>IDI1</i> y los genes <i>LIS</i> o <i>GES</i> , en presencia o ausencia del alelo ^{cat} <i>hmg1</i>	111
II.2.3. La sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> incrementa la producción de linalol en la cepa de laboratorio BY4741Lis	111
II.2.4. La delección del gen <i>MOD5</i> no afecta a la producción de linalol en la cepa de laboratorio BY4741 que expresa el gen <i>LIS</i> ni cuando ésta se combina con la sobreexpresión del gen <i>IDI1</i>	113
II.2.5. La mejora de la producción de monoterpenos derivada de la sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> se mantiene en la cepa vónica T ₇₃ -4, previamente seleccionada como la mejor adaptada a la producción heteróloga de estos metabolitos	114
II.2.6. La sobreexpresión conjunta del alelo ^{cat} <i>hmg1</i> y del gen <i>IDI1</i> no incrementa la capacidad de producir linalol en cepas derivadas de T ₇₃ -4 que expresan la linalol sintasa de <i>C. breweri</i>	118
II.3. Manipulación de la síntesis y actividad de la enzima FPPS de <i>S. cerevisiae</i>	120
II.3.1. Construcción de plásmidos para la coexpresión en <i>S. cerevisiae</i> de los alelos <i>ERG20</i> o <i>erg20-2</i> y el gen <i>LIS</i> , con y sin el gen <i>IDI1</i> o el alelo ^{cat} <i>hmg1</i>	122

II.3.2. Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresan el gen <i>LIS</i> y los alelos <i>ERG20</i> o <i>erg20-2</i> , con y sin el alelo ^{cat} <i>hmg1</i> o el gen <i>IDI1</i>	124
II.3.3. La sobreexpresión de los alelos <i>ERG20</i> o <i>erg20-2</i> reduce la producción de linalol en cepas derivadas de T ₇₃ -4 que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	127
II.3.4. La reducción a la mitad del número de copias del gen <i>ERG20</i> en una cepa diploide, cuadruplica la producción de linalol	129
II.3.5. Caracterización genética del locus <i>ERG20</i> de la cepa T ₇₃	130
II.3.6. La coexpresión del alelo ^{cat} <i>hmg1</i> o el gen <i>IDI1</i> junto con el gen <i>LIS</i> en cepas hemizigotas para el gen <i>ERG20</i> tiene un efecto sinérgico sobre la producción de linalol	134
II.3.7. La producción de linalol se incrementa en cepas haploides <i>erg20::kanMX4</i> cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo <i>erg20-2</i>	136
II.3.8. La sobreexpresión del alelo ^{cat} <i>hmg1</i> en cepas haploides <i>erg20::kanMX4</i> cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo <i>erg20-2</i> no aumenta la producción de linalol	139
II.3.9. La sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> en cepas haploides cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo <i>erg20-2</i> mejora la producción de linalol	141
III. Modulación del perfil aromático del vino mediante fermentación con cepas modificadas de <i>S. cerevisiae</i> productoras <i>de novo</i> de monoterpenos	145
III.1. Ensayos de microvinificación con la cepa vínica T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i> que expresa el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	147
III.1.1. La expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> no afecta a la capacidad fermentativa de la cepa vínica T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	147
III.1.2. La expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en la cepa T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i> da lugar a la producción <i>de novo</i> de seis caracteres varietales en el vino	150
III.2. Regulación de los niveles de terpenoides presentes en el vino mediante fermentación mixta y técnicas de ingeniería metabólica	154

III.2.1. La fermentación mixta con T ₇₃ -4Ges y cepas de <i>S. cerevisiae</i> no productoras de monoterpenos sirve para modular los niveles de terpenoides.....	154
III.2.2. La sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> incrementa la producción <i>de novo</i> de terpenoides en condiciones de microvinificación.....	156
DISCUSIÓN GENERAL	161
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del mercado mundial de aromas y fragancias.....	6
Figura 2. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte I)	8
Figura 3. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte II)	10
Figura 4. Cronograma de hitos relacionados con la ingeniería metabólica de terpenos	12
Figura 5. Genes implicados en la ruta de síntesis de terpenos de cadena corta en <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 6. Plásmidos empleados para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que expresen los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	73
Figura 7. Producción de linalol en cepas de laboratorio y cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	76
Figura 8. Curvas de crecimiento (línea continua) y producción de linalol (línea discontinua) de las cepas YR162 (T ₇₃ -4Lis); YR175 (BQS252Lis) e YR295 (ICV16 <i>ura3</i> Lis)	78

Figura 9. Análisis del crecimiento y expresión del gen <i>LIS</i> de las cepas FY1679Lis (YR201; YR202), BQS252Lis (YR174; YR175) y T ₇₃ -4Lis (YR162; YR154).....	79
Figura 10. Producción de terpenoides derivada de la expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en las cepas BQS252, ICV16 <i>ura3</i> y T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	81
Figura 11. Plásmidos integrativos generados para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que expresen los genes <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	89
Figura 12. Plásmidos episomales para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que expresen el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	90
Figura 13. Esquema de las integraciones plasmídicas en el locus <i>URA3</i> de la cepa T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	91
Figura 14. Producción de monoterpenos en la cepa T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	93
Figura 15. Producción de monoterpenos en la cepa W303-1A de <i>S. cerevisiae</i> transformada con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_ <i>leu2d</i>	96
Figura 16. Producción de monoterpenos en cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ portadoras de los plásmidos YIp211Lis, YEp195Lis y YEp195Lis_ <i>leu2d</i>	98
Figura 17. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresen el alelo <i>cat</i> <i>hmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	104
Figura 18. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de <i>cat</i> <i>Hmg1p</i>	105
Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del alelo <i>cat</i> <i>hmg1</i> en cepas que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	106
Figura 20. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que sobreexpresen el gen <i>IDI1</i> , el alelo <i>cat</i> <i>hmg1</i> , el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	110
Figura 21. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>IDI1</i> , con o sin la delección del gen <i>MOD5</i> , en el fondo genético BY4741Lis	112
Figura 22. Producción de linalol en cepas derivadas de T ₇₃ -4 que sobreexpresan el gen <i>IDI1</i> junto con el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	115

Figura 23. Producción de monoterpenos en cepas derivadas de T_{73} -4 que sobreexpresan el gen <i>IDI1</i> junto con el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	116
Figura 24. Efecto de la coexpresión del alelo $_{cat}hmg1$ y el gen <i>IDI1</i> sobre la producción de linalol	119
Figura 25. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresen los alelos <i>ERG20</i> y <i>erg20-2</i> junto con el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	123
Figura 26. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresen los alelos <i>ERG20</i> y <i>erg20-2</i> junto con los genes <i>LIS</i> , <i>IDI1</i> y $_{cat}hmg1$	124
Figura 27. Representación del proceso de esporulación y selección de las cepas haploides derivadas de Y21258	126
Figura 28. Análisis genético de las cepas haploides derivadas de Y21258	127
Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de los alelos <i>ERG20</i> y <i>erg20-2</i> sobre la producción de linalol en la cepa T_{73} -4	128
Figura 30. Producción de linalol en la cepa Y21258	131
Figura 31. Alineamiento de las secuencias del gen <i>ERG20</i> de la cepa T_{73} y S288C.....	132
Figura 32. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de la enzima $_{cat}Hmg1p$ o del gen <i>IDI1</i> en la cepa Y21258Lis.....	135
Figura 33. Incremento de la producción de linalol mediante la complementación de la delección del gen <i>ERG20</i> con el alelo <i>erg20-2</i>	137
Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de los alelos <i>erg20-2</i> y $_{cat}hmg1$ sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus <i>ERG20</i>	140
Figura 35. Efecto de la sobreexpresión de los alelos <i>erg20-2</i> e <i>IDI1</i> sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus <i>ERG20</i>	142
Figura 36. Mejora global de la producción de linalol a partir de la cepa de laboratorio BY4743	143

Figura 37. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ que expresan el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	148
Figura 38. Efecto de la cofermentación con cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras y no productoras de geraniol	155
Figura 39. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ que sobreexpresan conjuntamente los genes <i>IDI1</i> y <i>LIS</i>	157
Figura 40. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ que sobreexpresan conjuntamente los genes <i>IDI1</i> y <i>GES</i>	158
Figura 41. Representación de los cambios globales en el perfil terpénico de los vinos producidos por cepas modificadas derivadas de T ₇₃ : YR70 (YEplac195); YR377 (YE _p 195Ges); YR379 (YE _p 195Ges_Ids)	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de estrategias de ingeniería metabólica para la producción de terpenos en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	15
Tabla 2. Clasificación de los monoterpenos	17
Tabla 3. Uso habitual de monoterpenos y derivados como aditivos en la industria alimentaria	18
Tabla 4. Relación de algunos de los genes que codifican monoterpeno sintetas	21
Tabla 5. Percepción sensorial de algunos monoterpenos y derivados .	30
Tabla 6. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo	41
Tabla 7. Listado de plásmidos utilizados en este estudio	46

Tabla 8. Oligonucleótidos	49
Tabla 9. Valores de concentración absoluta y concentración relativa derivados de la expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en las cepas BQS252, ICV16 <i>ura3</i> y T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	84
Tabla 10. Valores de producción de monoterpenos en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ -4 que sobreexpresan el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> desde los plásmidos YEp195Ges y YIp211Ges.....	95
Tabla 11. Valores de producción absoluta (µg/L) y concentración relativa (%) de los compuestos derivados de la expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en cepas derivadas de T ₇₃ -4 que sobreexpresan el gen <i>IDI1</i>	117
Tabla 12. Análisis metabólico parcial de los vinos producidos por las cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de T ₇₃ -4 que expresan el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	149
Tabla 13. Concentración de terpenoides detectada en vinos de la variedad Parellada fermentados con cepas derivadas de T ₇₃	151
Tabla 14. Terpenoides derivados de la expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en la cepa T ₇₃	153

INTRODUCCIÓN

1. TERPENOS

“Nombre común a ciertos hidrocarburos que se encuentran en los aceites volátiles obtenidos de las plantas, principalmente de las coníferas y de los frutos cítricos.”

Real Academia Española (RAE)

“Lípidos simples no saponificables de naturaleza isoprenoide y constituidos por unidades del hidrocarburo de cinco átomos de carbono isopreno y frecuentemente átomos de oxígeno.”

Diccionario de Química, Ediciones Generales ANAYA

“Biomoléculas constituidas por la unión de un número variable de unidades del hidrocarburo isopreno. Pueden ser moléculas lineales o cíclicas, o presentar ambos tipos de estructuras.”

Diccionario de Biología, Ediciones Generales ANAYA

1.1. Clasificación general

Los terpenos o terpenoides constituyen una de las familias de compuestos más grandes de la Naturaleza con más de 30.000 miembros (Connolly y Hill, 1991). A finales del siglo XIX Wallach propuso la unidad de isopreno de 5 átomos de carbono como precursor de todos los terpenos, por lo que también se conocen como isoprenoides.

La clasificación general de los terpenos los agrupa según el número de moléculas de isopreno que los componen. Los terpenos de 10 carbonos (C10), descubiertos a mediados del siglo XIX, fueron inicialmente considerados los de cadena más corta y se les dio el nombre de monoterpenos; estableciéndose a partir de entonces la nomenclatura general, sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) o politerpenos. El isopreno y sus derivados de 5 carbonos (C5) se integraron posteriormente en esta clasificación como hemiterpenos.

Con el avance de las técnicas analíticas durante el siglo XX se produjo un incremento exponencial del número de estructuras químicas descritas y, a principios de siglo se estableció la “regla del isopreno”, que posteriormente se completaría con la conocida como “regla biogenética del isopreno” expuesta

por Ruzicka en 1953, que fue perfeccionada en años sucesivos (Lynen *et al.*, 1958; Chaykin *et al.*, 1958 y Bloch *et al.*, 1959). Esta regla considera que los terpenos están compuestos por un número exacto de moléculas de isopreno y, por lo tanto, los que no cumplen esta premisa se denominan terpenos irregulares.

Cada grupo se subdivide a su vez en función de sus características químicas y/o estructurales. De este modo encontramos terpenos saturados e insaturados, lineales y cíclicos, y un sinnúmero de subdivisiones derivadas del elevado número de compuestos que forman parte de esta familia tan heterogénea de la que aún siguen descubriéndose nuevos miembros.

1.2. Función biológica

Durante mucho tiempo se pensó que los terpenos eran productos de desecho del metabolismo secundario de las plantas. Sin embargo, la caracterización química y estructural de estos compuestos ha derivado en las últimas décadas en el descubrimiento de algunas de sus funciones biológicas. A pesar de que aún se desconoce la función de la mayor parte de los terpenos, éstos cubren ya un amplio rango de actividades, en consonancia con su enorme variabilidad estructural.

Los primeros en ser asociados a una función biológica fueron los tetraterpenos (carotenoides), como pigmentos fotosintéticos o antioxidantes (revisado por Demmig-Adams *et al.*, 1996), y los esteroides, como componentes de la membrana celular y la señalización hormonal (Demel y de Kruffy, 1976). La caracterización funcional de los terpenos de cadena corta resulta más complicada dada su naturaleza generalmente volátil y su presencia en mezclas complejas (principalmente resinas y aceites esenciales de plantas). Se han encontrado indicios de que, en plantas, éstos participan activamente en defensa, señalización y/o comunicación intra- e interespecífica (revisado por Langenheim, 1994). La capacidad antibacteriana y/o antifúngica de los terpenos y sus derivados (Rastogi *et al.*, 1998; Lunde y Kubo, 2000), así como sus propiedades como repelentes de parásitos de plantas (Messchendorp *et al.*, 2000) e incluso de peces depredadores de esponjas marinas (Paul *et al.*, 1997), está sobradamente demostrada. Sin embargo, comprobar su implicación en funciones defensivas en el entorno natural no es una cuestión trivial; pese a ello se ha relacionado la presencia de determinados terpenos en plantas con una mejora de la protección frente a parásitos y patógenos

(Dussourd y Hoyle, 2000; Papadopoulou *et al.*, 1999). También se ha descrito la implicación de determinados terpenos en estrategias defensivas desarrolladas por algas, insectos, corales, moluscos y peces (Quintana *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2006; Paul y Ritson-Williams, 2008; Erickson *et al.*, 2006), y sobre todo en animales marinos sedentarios.

Como ya se apuntaba, los terpenos pueden actuar también como señalizadores en la comunicación intra- o interespecífica de plantas e insectos principalmente. Dado que los terpenos son compuestos mayoritarios en flores y frutos, sería lógico pensar que pudieran estar implicados en la atracción de polinizadores; de hecho, algunos insectos son capaces de detectar estos compuestos (Raguso y Light, 1998). Además, otras partes de las plantas como hojas y raíces producen también mezclas de terpenos capaces de atraer a depredadores y parásitos de herbívoros (Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990; Kessler y Baldwin, 2001; Rasmann *et al.*, 2005), o de iniciar un proceso de señalización para poner sobre aviso a los tejidos o incluso a las plantas circundantes (Heil y Silva-Bueno, 2007; Baldwin *et al.*, 2006; Dicke y Bruin, 2001; Ton *et al.*, 2007).

1.3. Aplicaciones y comercialización

Su aprovechamiento se remonta al antiguo Egipto, cuando algunos aceites esenciales ricos en terpenos se utilizaban en rituales religiosos por sus propiedades aromáticas, y desde entonces su uso en fragancias y preparaciones curativas se ha dilatado a lo largo de la historia.

La gran variedad y versatilidad, en cuanto a propiedades bioactivas y sensoriales, de los terpenos y sus derivados constituyen la clave para su aplicación actual en cosmética, limpieza, barnices, alimentación, y en la industria farmacéutica como agentes antibacterianos, antiparasitarios o anticancerígenos. Por nombrar algunos ejemplos, el escualeno tiene importancia en las industrias farmacéutica y cosmética; la coenzima Q-10 tiene funciones cardioprotectoras, crioprotectoras y neuroprotectoras; la vitamina D₂, cuya deficiencia puede causar problemas óseos, es un derivado económicamente importante del ergosterol; el taxol es un diterpeno efectivo contra determinados cánceres; el amorfadieno es un sesquiterpeno intermediario en la síntesis de la droga antimalaria artemisinina. Otros compuestos derivados de la ruta incluyen carotenoides, insecticidas, gomas, etc.

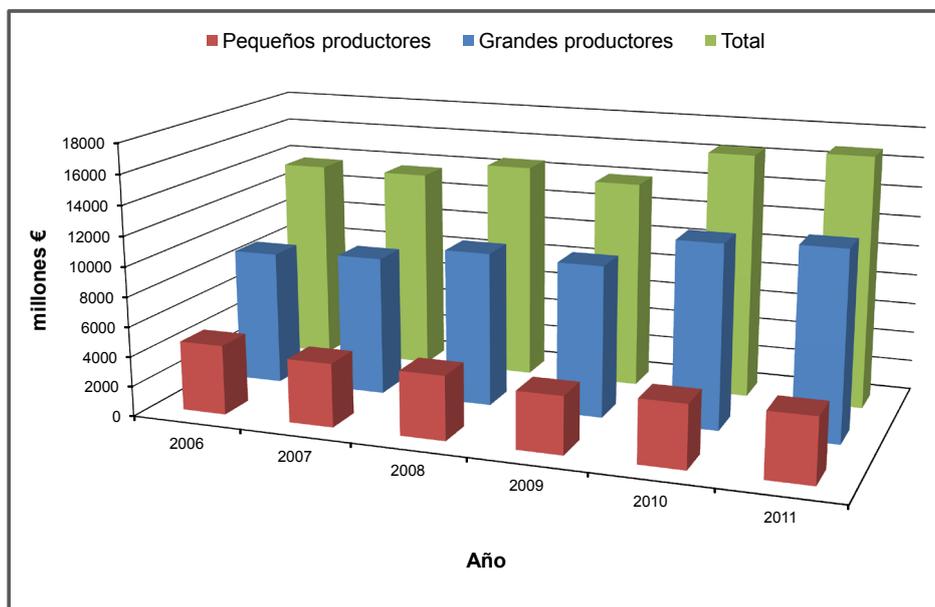


Figura 1. Evolución del mercado mundial de aromas y fragancias. Datos obtenidos de Leffingwell y asociados (<http://www.leffingwell.com>).

A mediados del siglo XIX se consiguieron sintetizar compuestos como el metilsalicilato, el cinnamaldehído, el benzaldehído, o la vanilina, estableciendo el inicio de la industria aromática moderna. Esta industria mueve aproximadamente 15.000 millones de euros anuales con un promedio de crecimiento anual del 4-5% (Figura 1). Los terpenos aromáticos y sus derivados son compuestos habitualmente utilizados dentro de esta industria por lo que la mejora y abaratamiento de los procesos de obtención y purificación de los mismos son objeto de estudio continuo.

1.4. Métodos de obtención

Los terpenos son fáciles de encontrar como componentes mayoritarios de los aceites esenciales producidos por las raíces, hojas o flores de plantas. A pesar de que estos son generalmente mezclas complejas, suponen una de las principales fuentes para la obtención de compuestos bioactivos y/o aromáticos.

Para aislarlos de los tejidos vegetales se utilizan, entre otras técnicas, el exprimido, el “enfleurage” (maceración de flores en grasas), la extracción con disolventes volátiles o la destilación por arrastre de vapor; siendo

esta última la más extendida por su rendimiento, pureza y bajo coste. Una técnica alternativa, desarrollada más recientemente, consiste en la utilización de fluidos en estado supercrítico para arrastrar los volátiles, el principal problema que se plantea es el elevado coste de las instalaciones necesarias para su aplicación industrial (Starmans y Nijhuis, 1996). Los terpenos se obtienen posteriormente por destilación fraccionada, cromatografía de gases o cromatografía líquida.

La principal alternativa a la obtención a partir de fuentes naturales es la producción de terpenos por síntesis química total o parcial. Sin embargo, la aplicación industrial de los terpenos producidos sintéticamente se ve en muchas ocasiones drásticamente limitada por la complejidad y número de las reacciones químicas implicadas en dicho proceso.

La producción biotecnológica utilizando microorganismos presenta una serie de ventajas respecto a los métodos anteriores. A diferencia de la extracción a partir de fuentes naturales, es independiente de las condiciones de cultivo de las plantas productoras, simplifica la extracción, se puede escalar el proceso a nivel industrial y es una fuente inagotable de producto. Por otra parte, si la comparamos con la síntesis química, la producción a partir de microorganismos permite modificaciones selectivas de grupos funcionales, funcionalización de carbonos inertes, quiralidad específica y resolución de racematos. Además, el proceso es respetuoso con el medio ambiente y puede adaptarse a la utilización de productos de desecho. A pesar de las ventajas que presenta, todavía son pocos los terpenos producidos por este método debido a la necesidad de aislar microorganismos productores y a las bajas concentraciones obtenidas en la mayoría de los casos.

1.5. Biosíntesis. Ruta del ácido mevalónico y ruta del metil-eritritol fosfato

Los terpenos son producidos en los tres dominios de la vida a partir de los mismos precursores universales, el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Ruzicka, 1953). En la actualidad se conocen dos rutas independientes (Figura 2) que dan lugar a la síntesis de estos compuestos, la ruta del ácido mevalónico (MVA), descubierta a mediados del siglo XX cuando se demostró la implicación de este compuesto en la síntesis de colesterol (Tavormina *et al.*, 1956) y la ruta del metil-eritritol fosfato (MEP), que da lugar a la síntesis de IPP y DMAPP a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Rohmer, 1999).

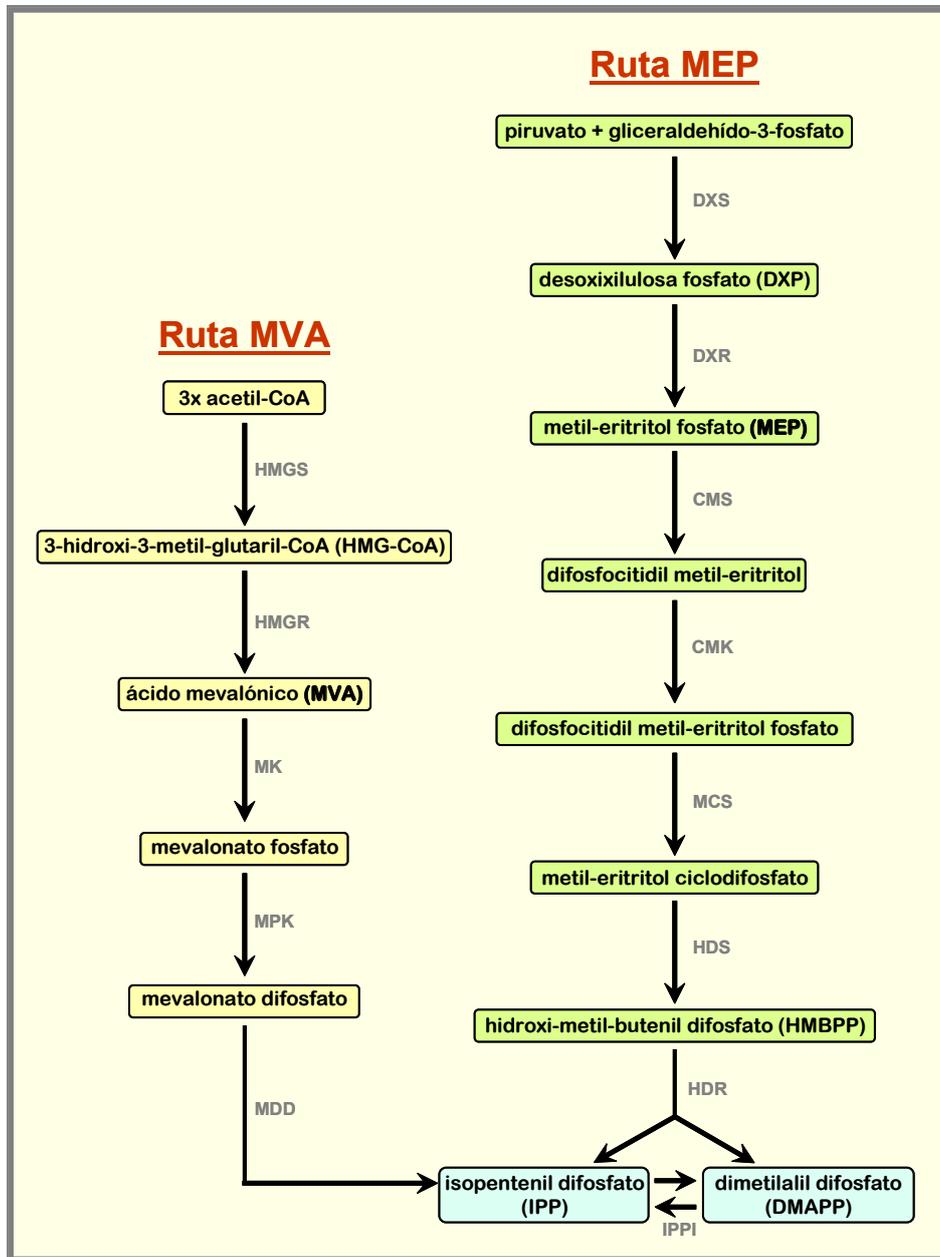


Figura 2. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte I). Enzimas ruta MVA: HMGS (HMG-CoA sintasa); HMGR (HMG-CoA reductasa); MK (mevalonato kinasa); MPK (mevalonato fosfato kinasa); MDD (mevalonato difosfato descarboxilasa); IPPI (isopentenil difosfato isomerasa). Enzimas ruta MEP: DXS (DXP sintasa); DXR (DXP reductoisomerasa); CMS (MEP citidil transferasa); CMK (difosfocitidil metil-eritritol kinasa); MCS (metil-eritritol ciclodifosfato sintasa); HDS (HMBPP sintasa); HDR (HMBPP reductasa).

Tras su descubrimiento se asumió que la ruta MVA era la responsable universal de la producción de IPP y DMAPP en todos los organismos. Sin embargo, esta ruta se encuentra principalmente en eucariotas y arqueas (Kuzuyama, 2002; Boucher *et al.*, 2004), mientras que la ruta MEP es la principal vía de síntesis en bacterias (Lange *et al.*, 2000; Croteau *et al.*, 2000). Esta norma general presenta notables excepciones, dado que algunas bacterias poseen los genes que codifican enzimas de la ruta MVA (Voynova *et al.*, 2004; Steussy *et al.*, 2006), y que en algunos eucariotas como las plantas coexisten ambas rutas. Estas excepciones se han relacionado con fenómenos de transferencia horizontal desde arqueas o eucariotas (Boucher y Doolittle, 2000; Wilding *et al.*, 2000) y con la endosimbiosis de las cianobacterias que dieron lugar a la aparición de plastidios en eucariotas fotosintéticos y protistas del filo apicomplexa (Lange *et al.*, 2000). La evolución y divergencia de las rutas de síntesis de isoprenoides es todavía fuente de controversia y recientemente se ha propuesto un escenario en el que la ruta MVA estaría presente en el ancestro común de arqueas, bacterias y eucariotas (Lombard y Moreira, 2011).

El IPP y DMAPP producidos por ambas rutas son sustrato de las prenil transferasas, enzimas que conjugan estos compuestos (C5) elongando el esqueleto de carbono. La geranil pirofosfato sintasa (GPPS) cataliza la unión de una molécula de DMAPP con otra de IPP para producir geranil pirofosfato (GPP; C10) precursor de los monoterpénos; la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) añade una nueva molécula de IPP para formar el farnesil pirofosfato (FPP; C15), precursor de los sesquiterpenos, y un nuevo IPP es añadido por la geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) dando lugar al precursor de los diterpenos, el geranilgeranil pirofosfato (GGPP; C20) (Figura 3) (Wang y Ohnuma, 1999). La síntesis de escualeno, precursor de los triterpenos (C30), se produce por condensación de dos moléculas de FPP, y dos moléculas de GGPP se unen para dar lugar al precursor de los carotenos, el fitoeno (C40). Estos intermediarios de la ruta son modificados por enzimas especializadas en la producción de terpenos, conocidas como terpeno sintasas o terpeno ciclasas.

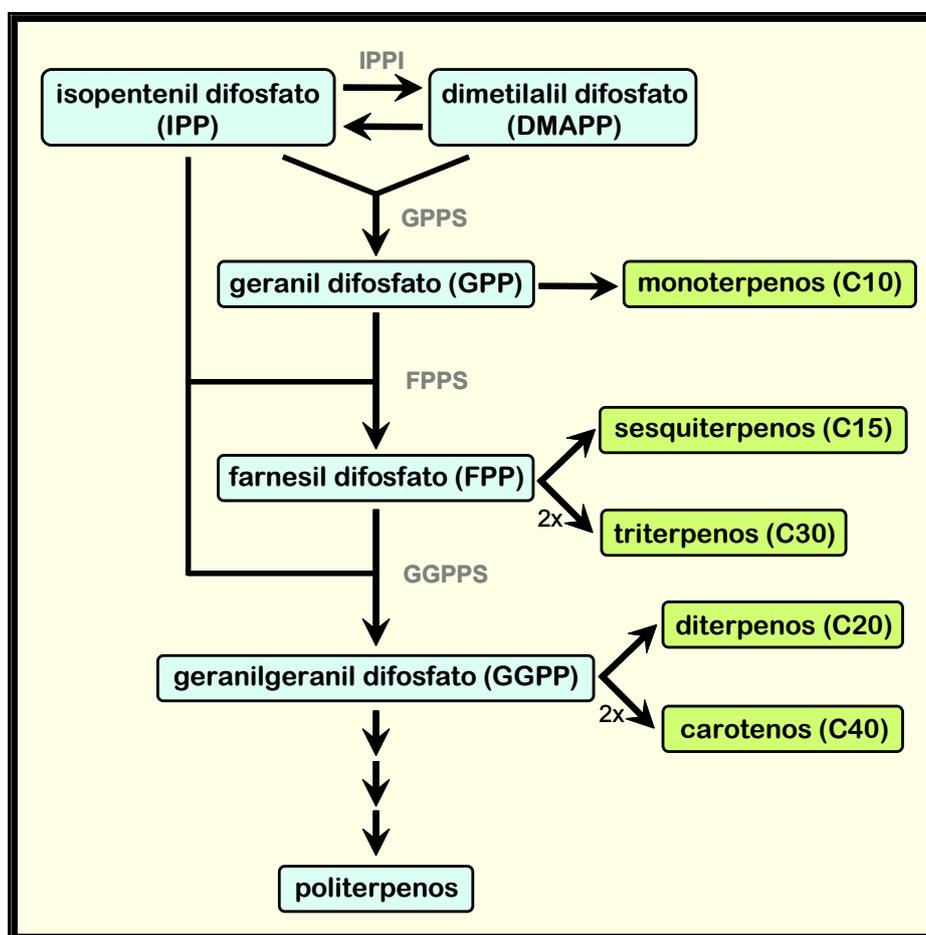


Figura 3. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte II). GPPS (GPP sintasa); FPPS (FPP sintasa); GGPPS (GGPP sintasa); 2x (dos moléculas del precursor).

En los últimos 25 años se han caracterizado numerosas terpeno sintasas; la R-limoneno, R- y S-linalol, alfa- y beta-farneseno, nerolidol, valenceno y geranil geraniol sintasas son sólo algunos ejemplos (Nualkaew *et al.*, 2006; Cseke *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1999; Maruyama *et al.*, 2001; Lücker, Bowen *et al.*, 2004; Crock *et al.*, 1997; Pechous y Whitaker, 2004; Nagegowda *et al.*, 2008). Muchas de estas enzimas producen específicamente uno o unos pocos terpenos, e incluso es habitual la producción específica de una de sus formas isoméricas como en el caso de las R- y S-linalol sintasas o las alfa- y beta-farneseno sintasas. Esta elevada especificidad convierte a estas enzimas en herramientas idóneas para la producción de compuestos de interés, dado el elevado grado de pureza del producto de sus reacciones.

1.6. Ingeniería metabólica de las rutas de biosíntesis

Para explicar en qué consiste la ingeniería metabólica primero se debe establecer lo que se entiende por ingeniería genética, ya que la primera es en gran medida una aplicación y/o consecuencia de la segunda.

Ingeniería genética: “Tecnología de la manipulación y transferencia del ADN de unos organismos a otros, que posibilita la creación de nuevas especies, la corrección de defectos génicos y la fabricación de numerosos compuestos útiles.”

Real Academia Española (RAE)

Así pues, en base a esta definición general, la ingeniería metabólica es una especialidad en la cual la ingeniería genética, o tecnología del ADN recombinante, se utiliza con el propósito de modificar la cantidad y/o pureza de los metabolitos producidos por rutas metabólicas endógenas, o generar productos alternativos mediante la introducción de rutas de síntesis procedentes de otros organismos.

Ingeniería metabólica: “Mejora de las actividades celulares mediante la manipulación de las funciones enzimáticas, de transporte y regulatorias a través del uso de la tecnología del ADN recombinante”.

Bailey, 1991

La ingeniería metabólica nace en el momento en el que es posible alterar flujos de síntesis o degradación de compuestos, o de desviar intermediarios hacia la producción de metabolitos distintos a los sintetizados de forma natural. Esta especialidad se practica desde hace tiempo, pero su avance ha sido relativamente lento debido a la dificultad que entraña la manipulación de las redes metabólicas, ampliamente interconectadas. Por ello, a pesar de su larga trayectoria, no ha sido sino en los últimos años cuando se ha dado un salto de calidad gracias a los avances en las técnicas genómicas (secuenciación, anotación de genes y genomas y análisis transcripcional y traduccional), que unidas al desarrollo de la metabolómica, bioinformática e ingeniería de proteínas han permitido la aparición de numerosas estrategias de mejora, llegando a acuñarse el término “biología sintética” para referirse a las modificaciones que originan nuevas funciones y/o

actividades en el organismo hospedador. Algunos de los principales hitos en la ingeniería metabólica de terpenos han sido recopilados y ordenados cronológicamente en la Figura 4.

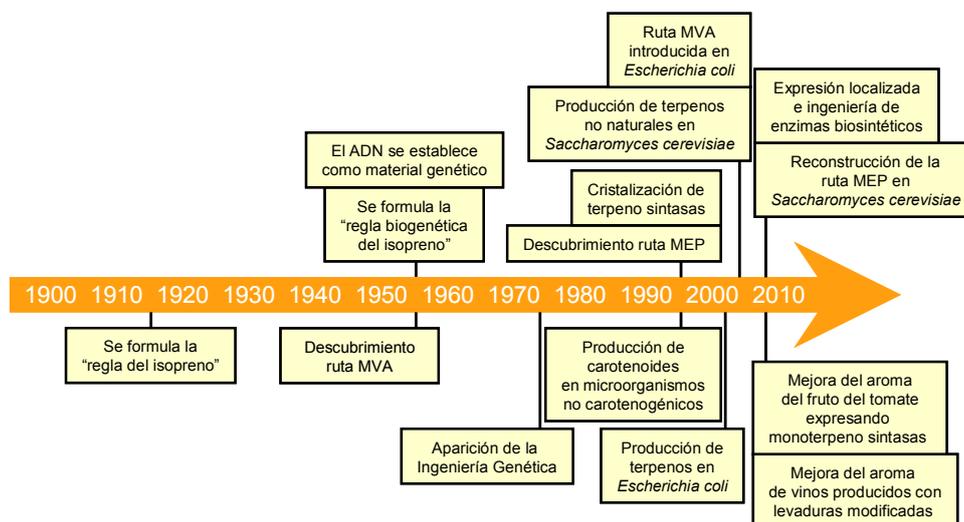


Figura 4. Cronograma de hitos relacionados con la ingeniería metabólica de terpenos. Adaptado y modificado de Khosla y Keasling, 2003.

Tal y como se ha comentado anteriormente, las dos rutas de síntesis de terpenos están presentes y son funcionales en plantas. La ruta MEP se encuentra localizada en los plastidios, mientras que las enzimas de la ruta MVA actúan en el citosol; sin embargo, se ha descrito que existe cierto intercambio de intermediarios entre ambas rutas para optimizar la disponibilidad de IPP y DMAPP (Adam y Zapp, 1998; Arigoni *et al.*, 1999). Las estrategias llevadas a cabo en plantas para incrementar y/o modular los niveles de determinados terpenos son de lo más variado, tanto por las estrategias de ingeniería metabólica en sí mismas como por la diversidad de productos posibles. Para alcanzar estos objetivos el primer escollo es la disponibilidad de precursores, por lo que determinar los puntos de control de las diferentes rutas de síntesis es crucial, y su desregulación es habitualmente la base de muchas estrategias para mejorar la producción de cualquier compuesto.

Por citar alguno de los pasos clave, en la ruta MEP, la sobreexpresión o represión de la desoxixilulosa fosfato (DXP) sintasa, que cataliza el primer paso de la ruta, es suficiente para cambiar los niveles de varios isoprenoides en *Arabidopsis thaliana* (Estévez *et al.*, 2001); esta actividad

se encuentra además regulada negativamente por la acumulación de DXP (Wolfertz *et al.*, 2004). La sobreexpresión de la siguiente enzima de la ruta, la desoxixilulosa fosfato reductoisomerasa (DXR), conllevó a un aumento de los niveles de monoterpenos producidos por la menta (Mahmoud y Croteau, 2001), y los niveles de taxadieno, diterpeno intermediario en la síntesis de taxol (anticancerígeno), se vieron considerablemente incrementados al sobreexpresar la hidroximetilbutenil difosfato reductasa (HDR) en plantas que expresan taxadieno sintasa (Botella-Pavía *et al.*, 2004).

Asimismo, el paso limitante en la ruta MVA es el catalizado por la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR) que da lugar al mevalonato o ácido mevalónico (MVA); la sobreexpresión y/o desregulación de esta enzima da lugar a un incremento sustancial de la síntesis de esteroides en tabaco (Chappell *et al.*, 1995; Hey *et al.*, 2006). Por otra parte, la sobreexpresión de la enzima FPPS en *Artemisia annua* lleva consigo un aumento en la producción de artemisinina (Chen *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2006), sin embargo los niveles acumulados de esta droga antimalaria nunca llegaron a suponer más del 1% del peso seco de las hojas, viéndose limitada su producción por el proceso de síntesis o por posibles efectos adversos sobre la fisiología celular.

Las dificultades añadidas que se derivan de la manipulación genética de plantas, así como los problemas subyacentes al aislamiento y purificación de algunos de los compuestos producidos hacen necesaria la búsqueda de métodos alternativos para su obtención. Los microorganismos se perfilan como una buena alternativa para simplificar el proceso, destacando *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* por su facilidad de manejo, cultivo y las herramientas moleculares disponibles. Así pues, se han establecido sistemas en los cuales estos microorganismos funcionan a modo de ‘factoría celular’ para la producción de compuestos con aplicaciones biotecnológicas y/o biomédicas, entre los que se encuentran numerosos terpenos.

Algunos genes que codifican terpeno sintasas han sido clonados e introducidos en estos hospedadores microbianos, evaluando su capacidad productora y realizando modificaciones en las rutas de síntesis con el fin de optimizar la producción (Tabla 1). Estas estrategias han seguido planteamientos similares a los aplicados en mejora de plantas, desregulando el flujo a través de la ruta, modulando la expresión y/o actividad de algunas enzimas, reguladores transcripcionales o importando parcial o totalmente rutas de síntesis al microorganismo de interés.

Cuando se desarrollan este tipo de estrategias en *S. cerevisiae* hay que tener presente que carece por completo de la ruta MEP. Este hecho convierte a la ruta MVA en el objeto de la mayoría de las modificaciones enfocadas a la síntesis de terpenos y esteroides en dicho microorganismo. En los últimos años, diversas estrategias de mejora han sido abordadas con éxito en este microorganismo, construyéndose entre otras, cepas mejoradas para la producción de geraniolgeraniol (Tokuhiro *et al.*, 2009), del triterpeno β -amirina (Kirby *et al.*, 2008) y de amorfadieno (Ro *et al.*, 2006), cuya aplicación como intermediario en el proceso de síntesis de artemisinina lo hace especialmente valioso en la lucha contra la malaria.

Actualmente existen empresas especializadas en la producción de terpenos mediante sistemas de fermentación industriales basados en levaduras optimizadas para la producción de dichos compuestos. Por citar algunos ejemplos, la empresa Allylix, Inc. produce los sesquiterpenos nootkatona y valenceno y los distribuye como aditivos alimentarios y perfumes (<http://www.allylix.com>), mientras que la empresa Amyris, Inc. ha centrado sus esfuerzos en la producción de beta-farneseno, otro sesquiterpeno de aplicación comercial en cosméticos, detergentes, perfumes y lubricantes industriales (<http://www.amyris.com>).

En cuanto a la legislación actual, en lo pertinente al uso de organismos modificados genéticamente (OMG) para la producción de alimentos o aditivos alimentarios N° 1830/2003 del Parlamento Europeo, establece que los alimentos o ingredientes alimentarios producidos a partir de OMGs deberán ser debidamente etiquetados para su correcta trazabilidad, lo cual deja la utilización de aromas, y más concretamente de monoterpenos producidos por OMGs al amparo de la aceptación social, y la establece como una herramienta válida para el desarrollo de nuevas y más eficientes plataformas de producción.

Tabla 1. Ejemplos de estrategias de ingeniería metabólica para la producción de terpenos en *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Microorganismo	Producto	Estrategia de mejora	Referencia
<i>E. coli</i>	Toruleno	Expresión heteróloga de enzimas carotenogénicas	Lee, Momen <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i>	Carvona	Expresión heteróloga de genes de biosíntesis	Carter <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i>	Astaxantina	Sobreexpresión de la IPP1 endógena y la GGPPS de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> junto con el operón crtBIYZW de <i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i>	Licopeno	Identificación y eliminación de genes que afectan a la síntesis de licopeno	Alper <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coli</i>	Amorfadieno	Importación de la ruta MVA de <i>S. cerevisiae</i> y expresión heteróloga de amorfadieno sintasa	Martin <i>et al.</i> , 2003
<i>S. cerevisiae</i>	Amorfadieno	Sobreexpresión de HIMGR y <i>upc2-1</i> junto con la amorfadieno sintasa de <i>Artemisia annua</i>	Ro <i>et al.</i> , 2006
<i>S. cerevisiae</i>	Precursor de taxol	Expresión heteróloga de genes de biosíntesis de taxoides	Dejong <i>et al.</i> , 2006
<i>S. cerevisiae</i>	Valenceno, cubebol y patchulol	Expresión heteróloga de genes de biosíntesis de sesquiterpenos. Represión de <i>ERG9</i>	Asadollahi <i>et al.</i> , 2008
<i>S. cerevisiae</i>	β -caroteno	Expresión heteróloga de genes de biosíntesis de carotenos en cepas industriales	Yan <i>et al.</i> , 2012

2. MONOTERPENOS

2.1. Clasificación

Como se ha explicado anteriormente, los terpenos compuestos por dos unidades de isopreno son clasificados dentro del grupo de los monoterpenos; que engloba compuestos de diferentes características químicas y estructurales (Tabla 2).

2.2. Función biológica

Algunos monoterpenos, al igual que ocurre con otras clases de terpenos de bajo peso molecular, son tóxicos para insectos, hongos, bacterias y virus (Lee, Peterson *et al.*, 2003; Hammer *et al.*, 2003; Friedman *et al.*, 2002; Astani *et al.*, 2009), y se ha demostrado su eficacia como repelentes de moluscos, insectos y mamíferos (Frank *et al.*, 2002; Szczepanik *et al.*, 2005; Vourc'h *et al.*, 2002). Estas propiedades sugieren que, en el entorno natural, los monoterpenos podrían estar implicados en mecanismos de defensa.

Generalmente los monoterpenos son producidos por plantas como parte de mezclas complejas en las que se sospecha que la combinación de éstos y otros terpenos, y su proporción, desempeña un papel clave para mejorar su funcionalidad; aunque por el momento los beneficios reportados por este hecho son objeto de discusión y controversia (revisado por Gershenzon y Dudareva, 2007). Un estudio realizado con plantas transgénicas de *A. thaliana* que emiten grandes cantidades del monoterpeno linalol demostró la capacidad de éste para repeler el ataque de áfidos (Aharoni *et al.*, 2003). En relación con otra de las funciones asignadas a los terpenos de cadena corta, se ha observado que los receptores de una de las especies polinizadoras de la planta del tabaco responden entre otros a la presencia de monoterpenos (Shields y Hildebrand, 2001), lo que sugiere que estos compuestos podrían estar implicados también en funciones de comunicación.

Fuera del reino vegetal, también se han encontrado monoterpenos como parte de sustancias defensivas secretadas por determinadas clases de insectos (Laurent *et al.*, 2003; Quintana *et al.*, 2003). Así como también se ha descrito la producción *de novo* de monoterpenos por parte de especímenes macho de escarabajos de la corteza (Coleoptera: Scolytidae); los cuales estarían implicados en la comunicación intraespecífica mediante feromonas (Gilg *et al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación de los monoterpenos.

Monoterpenos regulares		
I. Acíclicos	S-Linalol $C_{10}H_{18}O$	 C11389
	Geraniol $C_{10}H_{18}O$	 C01500
II. Monocíclicos		
II.a. Hidrocarburos saturados	α -Felandreno $C_{10}H_{16}$	 C09875
II.b. Hidrocarburos oxigenados	α -Terpineol $C_{10}H_{18}O$	 C11393
III. Bicíclicos		
III.a. Hidrocarburos saturados	α -Pineno $C_{10}H_{16}$	 C06308
III.b. Hidrocarburos oxigenados	Mirtenol $C_{10}H_{16}O$	 C11938
Monoterpenos irregulares		
Hidrocarburos saturados	Canfeno $C_{10}H_{16}$	 C06076
Hidrocarburos oxigenados	δ -Fenchona $C_{10}H_{16}O$	 C11387

2.3. Aplicación industrial

Los monoterpenos son un grupo muy variado de compuestos volátiles, de bajo peso molecular, que tienen un gran valor económico, y por ello han recibido mucha atención tanto en investigación clínica como en nutrición. Se utilizan frecuentemente como aditivos aromáticos en alimentos y perfumes (Mulder-Krieger *et al.*, 1988; Wise y Croteau, 1999; Croteau *et al.*, 2000). Además, algunos monoterpenos como limoneno, alcohol perílico, geraniol, linalol, cineol o mentol entre otros presentan potencial para su aplicación clínica, por lo que podrían ser utilizados como nutracéuticos (Crowell y Gould, 1994; Crowell, 1999; Gould, 1997; Mills *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995; Pattnaik *et al.*, 1997), confiriendo simultáneamente características aromáticas y funcionales al producto final.

Tabla 3. Uso habitual de monoterpenos y derivados como aditivos en la industria alimentaria.

Compuesto	Bebidas alcohólicas ^a	Bebidas sin alcohol ^a	Repostería ^a	Productos cárnicos ^a	Consumo anual ^b
Linalol	0,24	3,57	11,90	18,72	10.000
Geraniol	0,93	3,49	17,00	3,99	900
Nerol	-	3,16	5,00	-	230
Citronelol	1,03	1,30	6,47	-	1.700
Linalil acetato	0,55	5,53	15,67	0,23	1.600
Geranil acetato	0,70	3,37	16,38	0,15	1.800
Neril acetato	-	0,70	4,00	-	550
Citronelil acetato	2,75	3,99	10,36	-	300

Datos obtenidos de Feranoli, 2002. ^aCantidades utilizadas habitualmente expresadas en ppm; ^bKg.

A pesar de su valor comercial, resulta complicado encontrar una fuente fiable donde consten los datos de producción y utilización de estos compuestos, variando además de forma significativa entre las fuentes. A pesar de ello, existe una tendencia común que da a entender que la producción y comercialización de estos compuestos está en auge; según los datos recopilados por Schwab *et al.*, 2008, la producción mundial de linalol y derivados se incrementó un 25% en el período 1996-2006, pasando de 6.000 a 8.000 toneladas métricas; en el caso del geraniol y sus derivados el aumento de la producción es aún más significativo, cuadruplicándose la producción y pasando de 3.500 a 12.000 toneladas métricas en el mismo período.

Una gran parte del linalol y el geraniol producidos son utilizados por sus propiedades aromáticas y/o antimicrobianas en las industrias cosméticas, de higiene o limpieza. También son utilizados junto con otros monoterpenos y sus derivados como aditivos en alimentos y bebidas (Tabla 3).

2.4. Procesos de obtención

Como ya se ha comentado, los terpenos de cadena corta suelen obtenerse de fuentes naturales o por síntesis química. Los monoterpenos como el linalol y el geraniol no son una excepción: el linalol se obtiene principalmente por destilación fraccionada de los aceites esenciales de palo de rosa y cilantro, mientras que el geraniol se obtiene mediante técnicas similares utilizando los aceites esenciales de citronela y palmarosa como fuentes mayoritarias.

Por su parte, la síntesis química puede ser parcial o total, dependiendo del compuesto de partida. Así pues, la síntesis parcial del linalol se realiza a partir de α - o β -pineno. El α -pineno sufre una serie de transformaciones que dan lugar a cis- y trans-pinanol, los cuales se aíslan por destilación fraccionada y son convertidos por pirólisis a S-(+)-linalol y R-(-)-linalol respectivamente. En el caso de la síntesis a partir de β -pineno, éste se transforma en mirceno, que a su vez se convierte en una mezcla de geranil, neril y linalil cloruro al reaccionar con ácido clorhídrico. Esta mezcla de cloruros se somete a una transformación que da un rendimiento del 80% de linalil acetato, posteriormente el linalol se obtiene por saponificación del éster. Mediante este proceso es posible obtener además una fracción con un 98% de pureza de geraniol. El geraniol y el nerol pueden ser también obtenidos a partir del linalol, convertido a linalil borato, que se reorganiza en geraniol borato y nerol borato y a partir de los cuales se obtienen los alcoholes por hidrólisis.

Para la síntesis química total del linalol, se necesita sintetizar en primer lugar 2-metil-2-hepten-6-ona que se hace reaccionar con acetileno para producir dehidrolinalol, a partir del cual se obtiene una mezcla racémica de dl-linalol (Sathikge, 2008).

2.5. Biosíntesis. Monoterpeno sintasas

Prácticamente todos los monoterpenos derivan del GPP, que a su vez se forma a partir de la unión de una molécula de IPP y otra de DMAPP, y su gran diversidad se debe a la actividad de distintas monoterpeno sintasas que catalizan la formación de cientos de monoterpenos diferentes (Dewick, 1999). En las

últimas 2 décadas se han purificado y caracterizado algunas monoterpeno sintetas y además los genes que las codifican han sido identificados. Dado que la gran mayoría de estos compuestos los producen las plantas, es precisamente en éstas donde se han centrado los esfuerzos para caracterizar dichos genes entre los que se encuentran el gen *LIS* de *Clarkia breweri*, que fue uno de los primeros que se descubrió (Dudareva *et al.*, 1996), y el gen *GES* de *Ocimum basilicum* (Iijima *et al.*, 2004); estos genes codifican una S-linalol sintasa y una geraniol sintasa respectivamente. En la Tabla 4 se recopilan algunos de los genes codificantes de monoterpeno sintetas identificados en los últimos 20 años.

El grado de pureza de los monoterpenos sintetizados por estas enzimas es bastante elevado, llegando a producirse única y específicamente uno de los isómeros de un determinado monoterpeno, manteniéndose por tanto la especificidad de producto, tal como se ha señalado para el conjunto de las terpeno sintetas.

2.6. Ingeniería metabólica. Producción en plantas y microorganismos

Como principales productores naturales de monoterpenos, las plantas representan *a priori* una buena plataforma para la sobreproducción de los mismos. Por ello, la mayoría de los esfuerzos realizados en ingeniería metabólica para la síntesis de monoterpenos se han dirigido a la modificación de los perfiles de producción de estos compuestos en plantas, abordando así dos objetivos, por una parte la caracterización de los mecanismos implicados en su producción y por otra la mejora de ésta. Así pues, además de las estrategias de desregulación de enzimas clave de las rutas de síntesis MVA y MEP mencionadas anteriormente, se han desarrollado con éxito algunas estrategias para la producción de monoterpenos. La enzima S-linalol sintasa de *C. breweri* se ha expresado en petunia, tomate, clavel y *A. thaliana* (Lewinsohn *et al.*, 2001; Lückner *et al.*, 2001; Lavy *et al.*, 2002; Aharoni *et al.*, 2003), incrementando así la producción del monoterpeno linalol y de sus derivados hidroxilados o glicosilados. La expresión de otras monoterpeno sintetas para la producción de limoneno, γ -terpineno y α -pineno en plantas de menta y tabaco condujo a su vez a alteraciones en el patrón de volátiles producidos por dichas plantas (Diemer *et al.*, 2001; Lückner, Schwab *et al.*, 2004). En 2006 Aharoni *et al.*, estudiaron el efecto de expresar la enzima FaNES, procedente de *Fragaria ananassa* (fresa), en plantas de patata y *A. thaliana*, enzima que tiene la peculiaridad de sintetizar linalol a partir de GPP y nerolidol a partir de FPP con la misma eficiencia; dicha expresión

Tabla 4. Relación de algunos de los genes que codifican monoterpeneo sintetas.

Nº de acceso Genbank	Productos principales	Nombre	Especies	Referencias
AAO61228	α -Pineno	Pt30	<i>Pinus taeda</i>	Phillips <i>et al.</i> , 2003
AAO61225	α -Pineno	Pt1	<i>Pinus taeda</i>	Phillips <i>et al.</i> , 2003
CAD57092	α -Pineno	FvPINS	<i>Fragaria vesca</i>	Aharoni <i>et al.</i> , 2004
AAX07267	α -Pineno	PmeTPS1	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Huber <i>et al.</i> , 2005
AAB71085	β -Pineno	Ag3	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1997
AAK58723	β -Pineno	QH6	<i>Artemisia annua</i>	Lu <i>et al.</i> , 2002
AAM53945	β -Pineno	Cl(-) β PINS	<i>Citrus limon</i>	Lücker <i>et al.</i> , 2002
BAD27260	β -Pineno	CitMTSL62	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada <i>et al.</i> , 2004
AAS47692	β -Pineno	PaTPS-Pin	<i>Picea abies</i>	Martin <i>et al.</i> , 2004
AAB70707	Canfeno	Ag6	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1999
AAF61453	β -Felandreno	Ag8	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1999
AAG01140	(R)-Limoneno	dLMS	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	Maruyama <i>et al.</i> , 2001
AAL17636	(R)-Limoneno	Arles	<i>Agastache rugosa</i>	Maruyama <i>et al.</i> , 2002
AAM53944	(R)-Limoneno	Cl(+) β LIMS1	<i>Citrus limon</i>	Lücker <i>et al.</i> , 2002
AAM53946	(R)-Limoneno	Cl(+) β LIMS2	<i>Citrus limon</i>	Lücker <i>et al.</i> , 2002
BAD27256	(R)-Limoneno	CitMTSE1	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada <i>et al.</i> , 2004
ABB73044	(R)-Limoneno	LaLIMS	<i>Lavandula angustifolia</i>	Landmann <i>et al.</i> , 2007
AAC37366	(S)-Limoneno	LC5.2	<i>Mentha spicata</i>	Colby <i>et al.</i> , 1993
AAG31438	(S)-Limoneno	PFLC1	<i>Perilla frutescens</i>	Yuba <i>et al.</i> , 1996
AAB70907	(S)-Limoneno	Ag10	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1997
AAF61455	(S)-Limoneno	Ag11	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1999
AAS47694	(S)-Limoneno	PaTPS-Lim	<i>Picea abies</i>	Martin <i>et al.</i> , 2004
AAF13357	(R)-Linalol	QH1	<i>Artemisia annua</i>	Jia <i>et al.</i> , 1999
AAF13356	(R)-Linalol	QH5	<i>Artemisia annua</i>	Jia <i>et al.</i> , 1999
AAL99381	(R)-Linalol	-	<i>Mentha citrata</i>	Crowell <i>et al.</i> , 2002
AAS47693	(R)-Linalol	PaTPS-Lin	<i>Picea abies</i>	Martin <i>et al.</i> , 2004
ABB73045	(R)-Linalol	LaLINS	<i>Lavandula angustifolia</i>	Landmann <i>et al.</i> , 2007
AAX69063	(R)-Linalol	LeMTS1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	van Schie <i>et al.</i> , 2007
AAC49395	(S)-Linalol	LIS	<i>Clarkia breweri</i>	Dudareva <i>et al.</i> , 1996
AAO85533	(S)-Linalol	At1g61680	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2003
CAD57081	(S)-Linalol #	FaNES1	<i>Fragaria ananassa</i>	Aharoni <i>et al.</i> , 2004
CAD57106	(S)-Linalol #	FaNES2	<i>Fragaria ananassa</i>	Aharoni <i>et al.</i> , 2004
ABR24418	(S)-Linalol #	AmNES/LIS-2	<i>Antirrhinum majus</i>	Nagegowda <i>et al.</i> , 2008
JN412075.1	Linalol	TPS39	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Falara <i>et al.</i> , 2011
AAR11765	Geraniol	GES	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima <i>et al.</i> , 2004

Nº de acceso Genbank	Productos principales	Nombre	Especies	Referencias
CAD29734	Geraniol	CtGES	<i>Cinnamomum tenuipilum</i>	Yang <i>et al.</i> , 2005
AAY88965	Geraniol	PcTps-C	<i>Perilla citriodora</i>	Ito y Honda, 2007
ABB30218	Geraniol	PfTPS-PL	<i>Perilla frutescens</i>	Ito y Honda, 2007
JN408072.1	Geraniol	OeGES1	<i>Olea europaea</i>	Vezzaro <i>et al.</i> , 2012
AAO61227	α -Terpineol	Pt10	<i>Pinus taeda</i>	Phillips <i>et al.</i> , 2003
AAS79351	α -Terpineol	VvTPS1891	<i>Vitis vinifera</i>	Martin y Bohlmann, 2004
AAS79352	α -Terpineol	VvTPS4568	<i>Vitis vinifera</i>	Martin y Bohlmann, 2004
ACC66282	α -Terpineol	Mg17	<i>Magnolia grandiflora</i>	Lee y Chappell, 2008
ACF24767	α -Terpineol	SamonoTPS1	<i>Santalum album</i>	Jones <i>et al.</i> , 2008
AAL59230	α -Terpineol	STC1-B73	<i>Zea mays</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008
ABR09292	α -Terpineol	TPS26-B73	<i>Zea mays</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008

(#) FaNES1, FaNES2 y AmNES/LIS2 son enzimas bifuncionales, capaces de producir el sesquiterpeno nerolidol además de linalol. Adaptado y modificado de Degenhardt *et al.*, 2009.

resultó en un incremento significativo de la producción de S-linalol por parte de ambas, y al mismo tiempo se incrementaron también los niveles de algunos de sus derivados tanto en forma libre como glicosilada. Entre la plétora de modificaciones que se han realizado, una de las que más llama la atención es la expresión del gen *GES* de *Ocimum basilicum* (albahaca) bajo el control de un promotor que se activa durante el proceso de maduración del fruto en plantas de tomate (Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007); como resultado de esta expresión dirigida de la geraniol sintasa se obtuvo un incremento de los niveles de geraniol en el fruto maduro, pero además se desencadenaron una serie de bioconversiones que resultaron determinantes para el enriquecimiento de su aroma y provocaron una mejor aceptación respecto al fruto no modificado.

El éxito de las estrategias empleadas en plantas para la mejora de la producción de monoterpenos es un buen punto de partida para el desarrollo de sistemas efectivos de producción de estos compuestos. No obstante, el metabolismo de los terpenos, incluidos los monoterpenos, en plantas es bastante complejo, por lo que prácticamente en todos los ensayos realizados se han observado modificaciones del monoterpeno de interés, en perjuicio de su cantidad y pureza.

Hace ya tiempo que los microorganismos se perfilan como alternativa para la producción de compuestos de alto valor añadido. Los primeros alimentos fermentados proceden de la gastronomía china y datan de hace más de 6.000 años. La técnica se ha extendido hasta nuestros días donde los

productos fermentados por microorganismos son parte de nuestra cultura y nuestro día a día, ampliamente representados por bebidas como el vino y la cerveza, los productos lácteos o los cereales. Una de las principales modificaciones que tienen lugar durante la fermentación es la producción de aromas que dan al producto final las propiedades organolépticas que le caracterizan, consiguiendo productos mejor aceptados por los consumidores (Vandamme, 2003). Basándose precisamente en esta capacidad que presentan algunos microorganismos para producir aromas durante la fermentación, se han caracterizado y desarrollado métodos de producción de compuestos aromáticos que han sido posteriormente escalados para su producción industrial. La ingeniería metabólica ha entrado con fuerza en este sector dado que, realizando las modificaciones pertinentes, se puede conseguir que un determinado microorganismo se convierta en productor eficiente del compuesto deseado, evitándose de este modo los inconvenientes ocasionados tanto por el aislamiento como por el manejo de los microorganismos productores naturales. Hoy en día no existen todavía muchos estudios en los que se haya mejorado la producción de monoterpenos en microorganismos, y los que hay tienen todavía mucho margen de mejora, por lo que constituye un campo de investigación abierto y muy prometedor en vista de los precedentes obtenidos con otras clases de terpenos.

La mayoría de los trabajos se han realizado durante la última década y muchos en paralelo al desarrollo de este trabajo de tesis doctoral. En 2003, Carter *et al.*, reconstruyeron la ruta de síntesis de carvona de *Mentha spicata* en *E. coli*, acumulándose 5 mg/L del intermediario limoneno en medio de laboratorio al sobreexpresar de forma conjunta los genes que codifican las enzimas geranyl difosfato sintasa y limoneno sintasa. La enzima FaNES (linalol/nerolidol sintasa en *F. ananassa*) se expresó en *Lactococcus lactis* obteniéndose niveles de linalol por encima del umbral de detección (~10 µg/L) al fermentar leche desnatada suplementada con glucosa (Hernández *et al.*, 2007). Posteriormente se demostró que *S. cerevisiae* es capaz de producir monoterpenos mediante expresión heteróloga de monoterpeno sintasas, la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* dio lugar a la producción de geraniol en cepas de laboratorio, mientras la expresión del gen *LIS* de *C. breweri* en cepas de laboratorio y cepas vínicas industriales resultó en la producción de S-linalol tanto en condiciones de laboratorio como durante el proceso de fermentación alcohólica del mosto de uva (Oswald *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008).

3. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Dominio: Eukarya
Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Clase: Ascomycetes

Orden: Saccharomycetales
Familia: Saccharomycetaceae
Género: Saccharomyces
Especie: *Saccharomyces cerevisiae*

3.1. Herramientas moleculares

La levadura *S. cerevisiae* es uno de los organismos más estudiados por su facilidad de manejo y velocidad de reproducción, es un modelo eucariota sencillo que permite observar y reproducir procesos similares a los que tienen lugar en organismos superiores. Esta levadura fue el primer eucariota cuyo genoma fue secuenciado (Goffeau *et al.*, 1997) por completo y se conocen, si no todos, la mayor parte de sus genes (alrededor de 6.000).

En sus orígenes, en la década de 1970, la manipulación genética de esta levadura se centraba en tratar de averiguar la función de algunos genes mediante aproximaciones reduccionistas, pero con la secuenciación de su genoma a finales del siglo pasado este enfoque cambió para tratar de comprender el funcionamiento global de la célula eucariota. Así pues, la manipulación genética de la levadura del vino, del pan y la cerveza, ha evolucionado de forma vertiginosa en los últimos 40 años.

Desde que se desarrollaron las primeras técnicas para transformar esta levadura mediante la formación de esferoplastos (Hinnen *et al.*, 1978), se han utilizado la electroporación (Delorme, 1989), la transformación con cationes alcalinos (Ito *et al.*, 1983), la conjugación (Heinemann y Sprague, 1989) y la infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Bundock *et al.*, 1995). La levadura *S. cerevisiae* presenta también una gran versatilidad en el modo en que su ADN puede ser manipulado, el ADN exógeno no replicante ha de integrarse para estabilizarse, y bajo esta condición surgieron los plásmidos integrativos (YIp) (Hinnen *et al.*, 1978); aunque este hecho les proporciona una gran estabilidad, tiene por contrapartida un reducido número de copias. Para mantener el ADN exógeno en forma de plásmido, éste debe contener alguna región que le permita replicarse; los plásmidos episomales (YE_p) fueron los primeros de estas características y se obtuvieron por fusión de un plásmido de *E. coli* con un plásmido natural de la levadura que contiene un origen de replicación de 2 micras (2 μ) (Beggs, 1978), obteniendo plásmidos que se mantienen en un elevado número de copias en la levadura. En 1979 Struhl *et al.*, aislaron

un fragmento de ADN de 1,4 kb, que contiene el gen *TRP1*, de una región próxima al centrómero del cromosoma IV de la levadura, y generaron los plásmidos replicativos (YRp) que no necesitan ser integrados en el genoma. Estos plásmidos son capaces de replicarse, pero su estabilidad es muy baja; un año más tarde se clonaron fragmentos próximos al centrómero del cromosoma III de la levadura en plásmidos YRp y se aislaron transformantes estables, apareciendo de este modo los plásmidos centroméricos (YCp) (Clarke y Carbon, 1980). En determinadas circunstancias es necesaria la manipulación de secuencias de ADN más grandes, lo cual se hizo posible gracias a los cromosomas artificiales de levadura (YAC), que aparecieron al agregar telómeros a los YRp (Szostack y Blackburn, 1982), y que pueden mantenerse en su conformación lineal.

Estos y otros vectores pueden expresar además una gran variedad de marcadores de selección. Por una parte encontramos vectores que contienen genes de resistencia a antibióticos, entre los más utilizados están los que confieren resistencia a geneticina o cicloheximida (Slaninová *et al.*, 1995; del Pozo *et al.*, 1991), mientras por la otra existen varios marcadores que se basan en la complementación de las auxotrofias presentes en las diferentes cepas de laboratorio de uso común, entre estos últimos los más usados son *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* y *URA3*; este último además permite la selección negativa de los transformantes, ya que las cepas con el alelo silvestre son incapaces de crecer en presencia de ácido fluoro-orótico, mientras que las cepas *ura3⁻* son resistentes (Boeke *et al.*, 1984). En los casos de los marcadores *URA3* y *LEU2* existen versiones en las que el promotor del gen está incompleto, *URA3-d* y *LEU2-d* (Okkels, 1996; Erhart y Hollenberg, 1983), por lo que la célula requiere de un mayor número de copias del plásmido para complementar la auxotrofia. Éstas y otras características de los vectores de expresión desarrollados facilitan sobremedida el diseño y ejecución de estrategias de ingeniería genética en *S. cerevisiae*. A efectos del presente trabajo son de especial interés los vectores descritos por Gietz y Sugino en 1988 (YEplac195; YEplac181; YIplac211).

La levadura *S. cerevisiae* es también el único organismo en el que se han construido y comercializado dos colecciones completas de mutantes, disruptiendo de forma sistemática todas las pautas abiertas de lectura conocidas. Esta tarea fue llevada a cabo por dos consorcios, el consorcio europeo EUROFAN (Dujon, 1998) y el consorcio SGDP, que implicaba laboratorios europeos y estadounidenses (Winzeler *et al.*, 1999). Las colecciones resultantes abren múltiples posibilidades a la hora de realizar ensayos comparativos de todos y cada uno de los genes de la levadura en las condiciones deseadas, y han sido la base para el desarrollo de colecciones

de dobles mutantes y para el diseño de la técnica de SGA (Synthetic Genetic Array) dedicada a la búsqueda de letalidades o deficiencias sintéticas para establecer relaciones entre genes (Tong *et al.*, 2001).

Los primeros ensayos de expresión global se realizaron con un “array” que contenía la mayor parte de los genes de *S. cerevisiae* (DeRisi *et al.*, 1997; Lashkari *et al.*, 1997), y la empresa Affymetrix desarrolló un “array” comercial con todos los genes de esta levadura. Desde entonces se han realizado innumerables ensayos en los que se han descrito los cambios en el transcriptoma de *S. cerevisiae* según las condiciones ambientales, cepas y/o mutantes de interés.

Además de las herramientas aquí mencionadas existen muchas más que facilitan el trabajo con este microorganismo y aumentan su potencial biotecnológico.

3.2. Ruta de síntesis de isoprenoides

Como se ha mencionado anteriormente, la única ruta descrita para la producción de terpenos en *S. cerevisiae* es la ruta MVA. Ésta es además el inicio de la ruta de síntesis de ergosterol, compuesto equivalente al colesterol, que juega un papel fundamental en la formación de las membranas celulares, por lo que cualquier proceso que dificulte o anule su síntesis puede derivar en células de levadura inviables. Ésta es probablemente una de las causas de la estricta regulación a la que se ven sometidas algunas de las enzimas implicadas en dicha ruta; la enzima HMGR, que es una de las mejor caracterizadas en este aspecto, presenta por ejemplo tasas de síntesis y degradación que varían en respuesta a la acumulación y/o consumo de algunos de los intermediarios de la ruta (Burg y Espenshade, 2011). Se han encontrado dos genes en el genoma de la levadura, *HMG1* y *HMG2*, que dan lugar a dos isoformas de esta enzima con diferente función y localización, Hmg1p y Hmg2p. La enzima principal, a la que se le atribuye aproximadamente el 80% de la actividad celular (Basson *et al.*, 1987), es la codificada por el gen *HMG1*. Esta enzima tiene una conformación estructural dividida en dos grandes dominios, el dominio catalítico, próximo al extremo carboxi-terminal, y el dominio regulador, cercano al extremo amino-terminal de la proteína, que además presenta varios dominios transmembrana que anclan la proteína al retículo endoplásmico (Bochar *et al.*, 1999).

Una de las peculiaridades que presenta esta ruta en la levadura es la carencia de una enzima especializada en la síntesis de GPP, formándose éste únicamente como intermediario transitorio en la reacción de síntesis de FPP catalizada por la enzima FPPS, codificada por el gen *ERG20* (Anderson, Yarger *et al.*, 1989). Las cepas mutantes en este gen presentaban mutaciones adicionales

que les permitían crecer en ausencia de ergosterol, siendo capaces además de excretar cantidades detectables del monoterpene geraniol (Chambon *et al.*, 1990). La caracterización del mutante con el alelo *erg20-2*, resultado de sustituir la lisina en la posición 197 por ácido glutámico, demostró que este cambio puntual en el centro activo alteraba la relación GPP:FPP, que en la cepa silvestre es 25:75 hasta prácticamente invertirla alcanzando una relación 70:30 (Blanchard y Karst, 1993); lo que supone un incremento de la cantidad de GPP intracelular en las cepas mutantes.

El gen *IDI1* codifica la enzima IPPI (Anderson, Muehlbacher *et al.*, 1989), que cataliza la isomerización de IPP a DMAPP. Sin embargo, la regulación de esta enzima y del gen que la codifica no ha sido estudiada en profundidad, a pesar de la importancia de estos compuestos como precursores de los esqueletos terpénicos. El DMAPP se incorpora también como intermediario en la ruta de síntesis y modificación de ARN de transferencia mediante la enzima codificada por el gen *MOD5* (Dihanich *et al.*, 1987), compitiendo por este compuesto con la ruta de síntesis de isoprenoides (Figura 5).

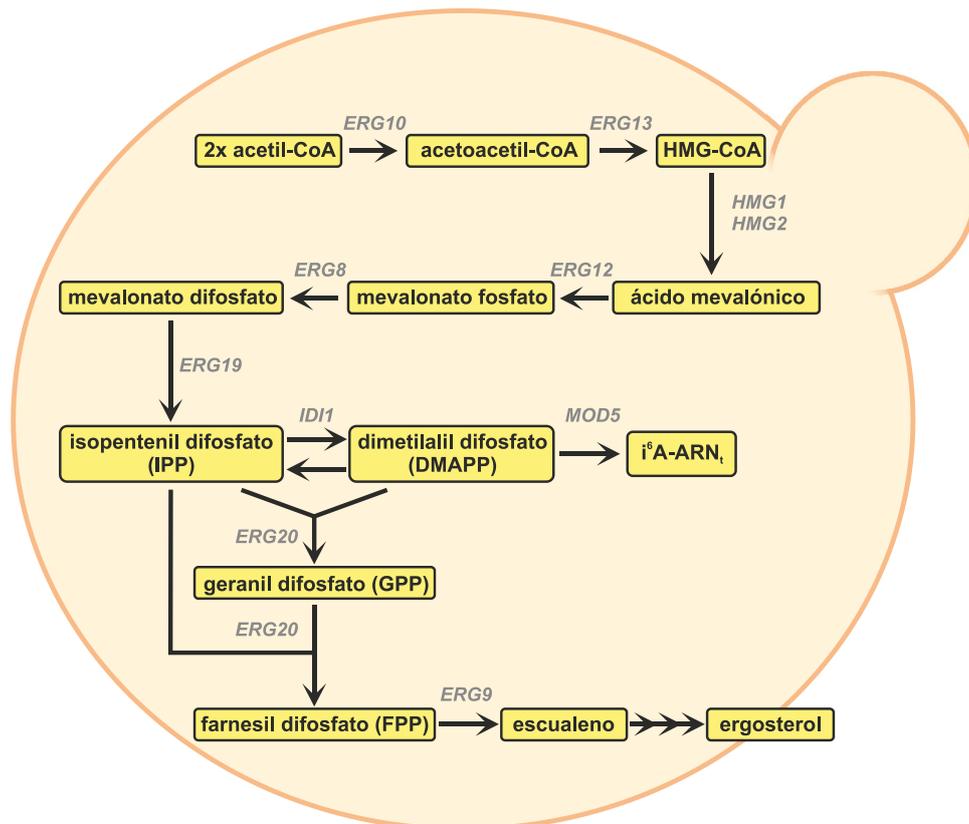


Figura 5. Genes implicados en la ruta de síntesis de terpenos de cadena corta en *S. cerevisiae*.

Pese a que los intermediarios precursores se encuentran presentes en su metabolismo, las levaduras y más concretamente *S. cerevisiae*, no se caracterizan por su capacidad para producir terpenos de cadena corta como son los monoterpenos y los sesquiterpenos; algunos trabajos les otorgaban la capacidad de producir tan solo 2 µg/L del sesquiterpeno farnesol (Hock *et al.*, 1984), mientras que ensayos posteriores han detectado pequeñas cantidades de monoterpenos producidos por cepas industriales de levadura, aunque estas producciones no han estado nunca por encima de los 5 µg/L (Carrau *et al.*, 2005). La principal causa para una producción tan limitada de terpenos de cadena corta, y más concretamente de monoterpenos, podría ser la ausencia de terpeno sintetasas en *S. cerevisiae*. Si a este hecho le sumamos la ausencia de una enzima especializada en la síntesis de GPP, parece lógica la poca relevancia de estos compuestos en el metabolismo de la levadura. Sin embargo, existen indicios de que los monoterpenos pueden integrarse en algunos procesos metabólicos de la levadura, produciéndose biotransformaciones de linalol, geraniol, nerol y α -terpineol (King y Dickinson, 2000; Gamero *et al.*, 2011) en condiciones de laboratorio; durante el proceso de vinificación, el geraniol puede ser también bioconvertido a citronelol por acción de la levadura (Gramatica *et al.*, 1982) y estos monoterpenos pueden ser además transformados en ésteres por enzimas con actividad alcohol acetil transferasa, y al menos 5 genes distintos codifican esta clase de enzimas en el genoma de *S. cerevisiae*, *ATF1* (Fujii *et al.*, 1994), *ATF2* (Nagasawa *et al.*, 1998), *SLII* (Momoi *et al.*, 2004), *EEB1* y *EHT1* (Saerens *et al.*, 2006).

3.3. *S. cerevisiae* y la fermentación vínica

La fermentación del mosto de la uva para producir vino se remonta al menos a los tiempos del imperio egipcio. Tradicionalmente las primeras fases de esta fermentación las han llevado a cabo los microorganismos presentes en la uva, principalmente levaduras. La especie *Kloeckera apiculata* es la más abundante en los granos de la uva (Fugelsang y Edwards, 2007), donde aparecen también otras levaduras de bajo poder fermentativo y escasa resistencia al etanol pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rodotorula* (Fleet y Heard, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Aunque la presencia de *S. cerevisiae* en la uva es escasa, se encuentra de manera recurrente entre la microbiota existente en los equipos de vinificación de las bodegas (Fleet y Heard, 1993; Fleet, 2007; Martini y Martini, 1990). Durante la fermentación espontánea del mosto de la uva se dan una serie de

sucesiones microbiológicas de tal manera que las levaduras presentes en la uva son las que dan inicio al proceso de fermentación y aproximadamente a partir del segundo día, las levaduras del genero *Saccharomyces*, principalmente *S. cerevisiae* comienzan a imponerse sobre el resto para acabar siendo la principal responsable de la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Estos cambios se deben fundamentalmente al incremento de la concentración de etanol, las condiciones de anaerobiosis, el uso de sulfitos en los tratamientos prefermentativos y la resistencia mostrada por *S. cerevisiae* a las altas temperaturas (Fleet y Heard, 1993; Fleet, 2007).

La fermentación espontánea conlleva algunos efectos no deseados como pueden ser la alteración de las propiedades del vino por parte de determinados microorganismos, el largo período de adaptación al medio y fermentaciones demasiado largas o inacabadas. Con el fin de evitar o reducir estos efectos la inoculación de los mostos con levaduras se esta imponiendo de un tiempo a esta parte, lo que facilita además la reproducibilidad de las fermentaciones (Bauer y Pretorius, 2000; Fleet y Heard, 1993). Las técnicas de aislamiento y caracterización molecular de levaduras han permitido identificar las cepas características de cada región y preparar inóculos de levadura seca activa que puedan ser utilizados en función de las características deseadas para el proceso de fermentación y propiedades del producto final (Querol y Ramón, 1996). El seguimiento durante la fermentación de las cepas inoculadas demuestra además que éstas son las que se imponen (Delteil y Aizac, 1988), por lo que la elección de la cepa utilizada marcará significativamente las propiedades del vino producido; este hecho abre las puertas no sólo a la selección de cepas naturales, sino también a la utilización de cepas modificadas en función de las características deseadas.

4. EL AROMA DEL VINO

“Del latín *vinum*, el **vino** es una bebida alcohólica que se hace a partir de la uva. El proceso implica la fermentación alcohólica del zumo o mosto a través de la acción metabólica de levaduras.”

Copyright © 2013 significado.de

4.1. Aroma primario o varietal

Existen una serie de factores interdependientes que influyen notablemente en el aroma primario de los vinos. Entre ellos encontramos, la variedad

de vid cultivada, el tipo de suelo, la exposición al sol y otras condiciones climatológicas, los tratamientos pre- y postcosecha y las técnicas empleadas durante el cultivo y la recolección (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Lacey *et al.*, 1991). Todos estos factores son en buena parte responsables de las diferencias existentes entre los vinos de distintas “denominaciones de origen”, estableciéndose el potencial de los vinos resultantes en función de las concentraciones de azúcares, nitrógeno, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, minerales y aromas presentes en las uvas vendimiadas.

La concentración de los compuestos volátiles de distintos cultivos varietales cambia considerablemente, dando lugar a patrones aromáticos muy diversos en los vinos producidos. Además hay que tener en cuenta que la mayoría de los compuestos aromáticos se concentran en la piel de los granos, por lo que la concentración en el producto final dependerá del procesado prefermentativo al que sean sometidos. En el caso de vinos tintos y rosados tiene lugar un proceso de maceración previo o simultáneo al comienzo de la fermentación, lo que favorece la liberación de estos compuestos y por tanto su presencia en el producto final; por el contrario, en la elaboración de vinos blancos esta maceración es escasa o nula, por lo que la mayor parte de los compuestos presentes en la piel se pierden antes del comienzo de la fermentación.

Tabla 5. Percepción sensorial de algunos monoterpenos y derivados.

Compuesto	Aroma	Umbral de percepción^a
Linalol	Dulce, fresco, cítrico	4-10
Geraniol	Dulce, olor a rosas	4-75
Nerol	Dulce, floral, ligeramente amargo	680-2200
Citronelol	Fresco, amargo, rosal	11-2200
Linalil acetato	Dulce, frutal	1000
Geranil acetato	Fruta dulce, rosa	9-460
Neril acetato	Azahar, rosa	2000-8500
Citronelil acetato	Fresco, frutal	1000

^aDatos obtenidos de Feranoli, 2002 expresados en µg/L.

La fracción aromática procedente de la uva está principalmente constituida por ésteres del ácido acético y monoterpenos fundamentalmente linalol, geraniol, nerol, citronelol, α -terpineol y hotrienol (Rapp y Mandery, 1986). Estos monoterpenos se encuentran bien en su forma libre y volátil, en la que son importantes para determinar el aroma del vino, o bien en alguna de sus

formas conjugadas, formando glicósidos no volátiles que no influirán en la percepción aromática. En la mayor parte de los casos, la fracción conjugada es considerablemente superior a la fracción libre, siendo necesaria la liberación química o enzimática del aglicón, en este caso un monoterpeneo, para que éste contribuya al aroma del vino. La presencia de estos monoterpeneos en el mosto, principalmente linalol y geraniol, confiere notas dulces, florales y afrutadas a su aroma (Tabla 5) y se ha demostrado que su coexistencia con otros monoterpeneos como el nerol o el citronelol tiene el efecto de incrementar su percepción (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). También cabe destacar que estos monoterpeneos se cuentan entre las moléculas y/o grupos de moléculas consideradas factores de impacto y se considera que los cambios en su concentración pueden modificar el equilibrio aromático del vino (Escudero *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2002). El linalol fue el primer componente aromático del que se demostró su contribución al aroma de algunos vinos Moscatel (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). Su aportación al aroma característico de algunas variedades gallegas y de las notas florales de otras variedades blancas está sobradamente demostrada (Arrhenius *et al.*, 1996; Lee y Noble, 2003; Campo *et al.*, 2005; Palomo *et al.*, 2006; Vilanova y Sieiro, 2006).

4.2. Aroma secundario. Papel de *S. cerevisiae*

La elaboración del vino es un proceso complejo cuyo resultado depende, como se ha comentado anteriormente, de múltiples factores. Sin embargo, destaca por su importancia la fermentación alcohólica, llevada a cabo mayoritariamente por la levadura *S. cerevisiae*. Durante este proceso el 95% de los azúcares (≈ 200 g/L), se convierte en etanol y dióxido de carbono, productos finales de dicha fermentación. El 5% restante es utilizado por la levadura para la síntesis de material celular y otros compuestos, generalmente volátiles (Lambrechts y Pretorius, 2000) entre los que destacan los ésteres y los alcoholes (Rapp y Mandery, 1986). Entre los alcoholes producidos por la levadura destacan el etanol y el glicerol, y en cantidades menores, pero significativas, se sintetizan dioles, alcoholes superiores alifáticos y aromáticos. La formación de ésteres tiene lugar en paralelo a la fermentación alcohólica, y a pesar de estar presentes en bajas concentraciones, éstas son suficientes para determinar el aroma secundario del vino.

La levadura influye por lo tanto en el aroma del vino producido, por ello a lo largo de la historia se han seleccionado levaduras que además de dar lugar a fermentaciones vigorosas sin azúcares residuales mejoren las propiedades organolépticas.

4.3. Aroma terciario. Procesos postfermentativos

Una vez completada la fermentación alcohólica del vino, éste puede ser sometido a una serie de tratamientos, como el envejecimiento en barrica o en botella, que marcarán la evolución de su aroma. El envejecimiento en barrica da lugar a una serie de interacciones entre los compuestos del vino y compuestos de la madera, pudiendo producirse degradaciones enzimáticas o físico-químicas, compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina o lactonas (Masuda y Nishimura, 1971), acetaldehídos o acetales son productos típicos de este proceso. Cuando el envejecimiento del vino tiene lugar en botella, los cambios observados son producto de la interacción entre los propios compuestos del vino; son características de este proceso la reducción de la concentración de ésteres de acetato, a excepción del acetato de etilo, el succinato de dimetilo y los ésteres etílicos de caproato y caprilato. También hay un descenso significativo de monoterpenos como linalol, geraniol y citronelol, aumentando por el contrario las concentraciones de algunos de sus derivados como el óxido de nerol, hotrienol, hidroxilinalol e hidroxicitronelol (Rapp y Mandery, 1986).

4.4. Estrategias de mejora del aroma del vino

A lo largo de la historia se han realizado muchas mejoras en el proceso de producción de vino, es evidente que se han desarrollado un gran número de estrategias biotecnológicas que facilitan el proceso de fermentación y la reproducibilidad del mismo. A su vez, como marcador determinante de la calidad del vino se ha cuidado de manera especial la evolución de su aroma. El proceso de maduración, combinando por ejemplo distintos tiempos y maderas en el envejecimiento en barrica, es una estrategia de mejora o transformación del aroma del vino en sí mismo. También se han abordado mejoras en la calidad de los granos de uva, mediante técnicas de cultivo específicas, selección pre- y postcosecha, además de los procesos de maceración realizados en función de las características buscadas en el mosto inicial.

Sin embargo, el aroma de fondo se atribuye mayoritariamente a compuestos aromáticos derivados del metabolismo de *S. cerevisiae* (Mauricio y Ortega, 1993; Lilly *et al.*, 2000), lo que confiere un especial interés a la modulación del denominado “aroma secundario”. Probablemente por ello, y por el conocimiento que se tiene de la levadura del vino, las modificaciones a este nivel han cobrado cuerpo en los últimos tiempos. La caracterización y selección de levaduras, como en el caso de la cepa T₇₃ (Querol *et al.*, 1992),

con diferentes capacidades metabólicas y fermentativas constituyen un punto de partida ideal para la mejora del aroma secundario, que puede ser de algún modo dirigido al seleccionar la cepa que llevará a cabo la fermentación. En base a este conocimiento inicial, se han desarrollado estrategias de mejora de estas cepas mediante evolución dirigida, creación de híbridos intra- e interespecíficos (Bellon *et al.*, 2011; Pérez-Través *et al.*, 2012) y levaduras modificadas genéticamente. En este aspecto, se han desarrollado una serie de trabajos dirigidos a mejorar la síntesis de compuestos aromáticos durante el proceso de la fermentación alcohólica, por citar algunos, el aumento de los niveles de alcohol isoamílico debido a la sobreexpresión de los genes *LEU2*, *LEU4*, *BAT2* o *BAP2* (Hirata e Hiroi, 1991; Hirata, *et al.*, 1992; Eden *et al.*, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2001) o el incremento en los niveles de ésteres de acetato mediante la sobreexpresión de las actividades alcohol acetil transferasa codificadas por los genes *ATF1* y *ATF2* (Lilly *et al.*, 2000; Mason y Dufour, 2000); en este sentido también se han abordado estrategias de selección y caracterización de levaduras no *Saccharomyces* que de forma natural producen cantidades significativas de ésteres de acetato cuya presencia en un inóculo iniciador mixto junto con *S. cerevisiae* ha mostrado su potencial para incrementar las cantidades de estos compuestos en el vino final (Rojas *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2008).

Los monoterpenos, compuestos característicos en la determinación del aroma primario, se encuentran en su mayor parte en su forma no volátil en el mosto: 'precursores'. Éstos difieren en el tipo y número de azúcares a los que están unidos, y también en los tipos de enlace que los unen. Esta diversidad supone una dificultad añadida a la hora de liberarlos eficazmente, ya que se necesitan varias reacciones químicas y/o enzimáticas. Además, *S. cerevisiae* no posee una actividad glicosidasa eficiente, por lo que la mayoría de los monoterpenos conjugados presentes en el mosto continúan en este estado tras la vinificación. El aprovechamiento de estos conjugados para incrementar la concentración de monoterpenos volátiles en el vino ha sido objeto de estudio durante años. Se ha experimentado con la adición de enzimas con actividad glicosidasa durante el proceso de vinificación, la expresión de genes homólogos y heterólogos que codifican dichas enzimas en *S. cerevisiae*, se han estudiado las condiciones fisiológicas óptimas para la actividad de estas enzimas, etc. Entre las estrategias desarrolladas en *S. cerevisiae* se encuentran la expresión homóloga de la exoglucanasa codificada por el gen *EXG1* (Gil *et al.*, 2005) y las expresiones heterólogas de una endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (Pérez-González *et al.*, 1993), una α -L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* o una β -glucosidasa de *Candida molischiana* (Sánchez-

Torres *et al.*, 1996; Sánchez-Torres *et al.*, 1998) con objeto de incrementar la fracción terpénica volátil; también cabe destacar la expresión de una xilanasa de *Aspergillus nidulans* (Ganga *et al.* 1999) y la ramnosidasa A de *Aspergillus aculeatus* (Manzanares *et al.*, 2003) que demostraron ser herramientas válidas para mejorar el aroma del vino producido por las cepas modificadas de *S. cerevisiae*.

Sin embargo, existen una serie de limitaciones inherentes a la utilización de este tipo de aproximaciones, cada actividad glicosidasa es específica de un determinado grupo de glicósidos. La coexpresión de varias actividades por medio de la levadura o la cofermentación con varias levaduras modificadas puede mejorar los resultados obtenidos (Manzanares *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, sin publicar). En cualquier caso, estas estrategias están supeditadas a la existencia de concentraciones relativamente elevadas de los precursores en el mosto, y éstas pueden variar como se ha comentado anteriormente según la variedad de uva o dependiendo de la temporada, lo que limita la reproducibilidad de los vinos, objetivo que hoy en día se valora positivamente en la industria vitivinícola.

De especial interés para nuestro trabajo es la expresión en *S. cerevisiae* de genes que en plantas codifican monoterpeno sintasas, capaces de incrementar los niveles de un determinado monoterpeno por encima del umbral de percepción olfativa durante el proceso de vinificación (Herrero *et al.*, 2008), permaneciendo intacta la capacidad fermentativa de la levadura modificada. De este modo se ha demostrado que, levaduras mejoradas en la producción *de novo* de compuestos aromáticos, tales como los monoterpenos, podrían ser útiles como herramientas para complementar y/o mejorar el perfil volátil de vinos producidos a partir de variedades neutras, o para modular el aroma de vinos con perfiles más complejos. Todo ello sería además compatible con las técnicas tradicionales, dado que la mejora no supondría ningún cambio en el proceso de vinificación y además sería *a priori* reproducible gracias a las modernas técnicas de inoculación; independientemente de la variedad o añadida al proceder los monoterpenos directamente del metabolismo de la levadura.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

● Optimización de la producción de monoterpenos en *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos concretos

- I. Ingeniería metabólica de distintas etapas de la ruta de isoprenoides, con capacidad para incrementar el reservorio de GPP, en cepas seleccionadas de *S. cerevisiae*.
 - I.a. Evaluación del potencial de distintas cepas para la producción heteróloga de monoterpenos.
 - I.b. Selección de un vector de expresión adecuado para la sobreproducción de monoterpenos.
 - I.c. Mejora de la producción de monoterpenos mediante técnicas de ingeniería metabólica.
 - I.c.1. Sobreexpresión desregulada de la enzima Hmg1p.
 - I.c.2. Sobreexpresión del gen *IDII*.
 - I.c.3. Deleción del gen *MOD5*.
 - I.c.4. Manipulación de la síntesis y actividad de la enzima FPPS.
- II. Modificación del perfil aromático del vino mediante fermentación con levaduras productoras *de novo* de monoterpenos.
 - II.a. Uso de levaduras que expresan los genes *LIS* (codifica linalol sintasa) de *Clarkia breweri* y/o *GES* (codifica geraniol sintasa) de *Ocimum basilicum* en microvinificaciones.
 - II.b. Evaluación del efecto de la sobreexpresión del gen *IDII* sobre la producción de monoterpenos en microvinificaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1. Bacterias

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α [*endA1*; *hsdR17*; *gyrA96*; *thi-1*; *relA1*; *supE44*; *recA1*; Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*)] (Hanahan, 1985) se empleó en todos los experimentos de clonación y amplificación de ADN plasmídico.

1.2. Levaduras

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 6. Éstas se han clasificado en dos grupos, cepas de laboratorio y cepas vínicas, detallándose en cada caso su nombre, genotipo y procedencia.

Tabla 6. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo	Procedencia
Cepas de laboratorio		
BQS252	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i>	Derivada de FY1679. Cedida por el Dr. Agustín Aranda (Universitat de València)
YR172	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEplac195	BQS252 transformada con YEplac195. Este trabajo
YR174; YR175	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEp195Lis	BQS252 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR509; YR510	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEp195Ges	BQS252 transformada con YEp195Ges. Este trabajo
YR176	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEp195Hmg	BQS252 transformada con YEp195Hmg. Este trabajo
YR191; YR192	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEp195Lis_Hmg	BQS252 transformada con YEp195Lis_Hmg. Este trabajo
BQS253	<i>MATα</i> ; <i>ura3-52</i>	Derivada de FY1679. Cedida por el Dr. Agustín Aranda
YR304	<i>MATα</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEplac195	BQS253 transformada con YEplac195. Este trabajo
YR296; YR297	<i>MATα</i> ; <i>ura3-52</i> ; YEp195Lis	BQS253 transformada con YEp195Lis. Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
FY1679	<i>MATa/α; ura3-52/ura3-52</i>	Thierry <i>et al.</i> , 1990. Cedida por el Dr. Agustín Aranda
YR195	<i>MATa/α; ura3-52/ura3-52; YEplac195</i>	FY1679 transformada con YEplac195. Este trabajo
YR201; YR202	<i>MATa/α; ura3-52/ura3-52; YEp195Lis</i>	FY1679 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
W303-1A	<i>MATa; ade2-1; can1-100; ura3-1; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1</i>	Thomas y Rothstein, 1989. Cedida por el Dr. Marcellí del Olmo (Universitat de València)
YR159	<i>MATa; ade2-1; can1-100; ura3-1; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1; YEplac195</i>	W303-1A transformada con YEplac195. Este trabajo
YR270; YR272	<i>MATa; ade2-1; can1-100; ura3-1; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1; YEp195Lis</i>	W303-1A transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR420	<i>MATa; ade2-1; can1-100; ura3-1; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1; YEp195leu2d</i>	W303-1A transformada con YEp195leu2d. Este trabajo
YR275; YR279	<i>MATa; ade2-1; can1-100; ura3-1; leu2-3,112; his3-11,15; trp1-1; YEp195Lis_leu2d</i>	W303-1A transformada con YEp195Lis_leu2d. Este trabajo
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998. Cedida por la Dra. Francisca Rández (IATA)
YR442	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YEplac195</i>	BY4741 transformada con YEplac195. Este trabajo
YR444	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YEp195Lis</i>	BY4741 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR446	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Yep195Idi</i>	BY4741 transformada con YEp195Idi. Este trabajo
YR448	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Yep195Lis_Idi</i>	BY4741 transformada con YEp195Lis_Idi. Este trabajo
Y07332	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; mod5::kanMX4</i>	EUROSCARF

Nombre	Genotipo	Procedencia
YR452; YR453	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>mod5::kanMX4</i> ; YEp195Lis	Y07332 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR456; YR457	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>mod5::kanMX4</i> ; YEp195Lis_Idi	Y07332 transformada con YEp195Lis_Idi. Este trabajo
BY4743	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998. Cedida por la Dra. Francisca Rández
YR350; YR351	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; YEp195Lis	BY4743 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
Y21258	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i>	EUROSCARF
YR316; YR317	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis	Y21258 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR318; YR319	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_Hmg	Y21258 transformada con YEp195Lis_Hmg. Este trabajo
YR398; YR399	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_Idi	Y21258 transformada con YEp195Lis_Idi. Este trabajo
YR366	<i>MATaα</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2	Y21258 transformada con YEp195Lis_erg2. Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
YR320; YR321	<i>MATa</i> α ; <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2_Hmg	Y21258 transformada con YEp195Lis_erg2_Hmg. Este trabajo
YR470; YR471	<i>MATa</i> α ; <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0; <i>ERG20/erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2_Idi	Y21258 transformada con YEp195Lis_erg2_Idi. Este trabajo
YR414; YR415	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YEp195Lis_erg2	Estirpe derivada de YR366 tras esporulación. Este trabajo
YR410; YR412	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2	Estirpe derivada de YR366 tras esporulación. Este trabajo
YR373; YR375	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YEp195Lis_erg2_Hmg	Estirpe derivada de YR320 tras esporulación. Este trabajo
YR370; YR371	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2_Hmg	Estirpe derivada de YR320 tras esporulación. Este trabajo
YR474; YR476	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YEp195Lis_erg2_Idi	Estirpe derivada de YR470 tras esporulación. Este trabajo
YR477; YR479	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>erg20::kanMX4</i> ; YEp195Lis_erg2_Idi	Estirpe derivada de YR470 tras esporulación. Este trabajo
Cepas vínicas		
ICV16 <i>ura3</i> ⁻	<i>ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP</i>	Jiménez-Martí <i>et al.</i> , 2009. Derivada de ICV16, DSM. Cedida por el Dr. Marcel-Í del Olmo
YR254	<i>ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP</i> ; YEplac195	ICV16 <i>ura3</i> ⁻ transformada con YEplac195. Este trabajo
YR294; YR295	<i>ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP/ura3</i> Δ :: <i>loxP</i> ; YEp195Lis	ICV16 <i>ura3</i> ⁻ transformada con YEp195Lis. Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
YR513; YR514	<i>ura3Δ::loxP/ura3Δ::loxP/ura3Δ::loxP</i> ; YEp195Ges	ICV16 <i>ura3</i> transformada con YEp195Ges. Este trabajo
T₇₃	Cepa vínica industrial	C.E.C.T. 1894; Querol <i>et al.</i> , 1992. Lallemand Inc.
T₇₃URA3/ura3Δ	<i>URA3/ura3Δ</i>	Colección del grupo de trabajo
T₇₃-4	<i>ura3::470/ura3::470</i>	Puig <i>et al.</i> , 1998. Derivada de T ₇₃ . Cedida por la Dra. Emilia Matallana (Universitat de València)
YR70	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195	T ₇₃ -4 transformada con YEp195. Colección del grupo de trabajo
YR154; YR162	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis. Este trabajo
YR377; YR378	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Ges	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Ges. Este trabajo
YR388	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; Ylplac211	T ₇₃ -4 transformada con Ylplac211. Este trabajo
YR390; YR391	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; Ylp211Lis	T ₇₃ -4 transformada con Ylp211Lis. Este trabajo
YR393; YR394; YR395	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; Ylp211Ges	T ₇₃ -4 transformada con Ylp211Ges. Este trabajo
YR166	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Hmg	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Hmg. Este trabajo
YR168; YR169	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis_Hmg	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis_Hmg. Este trabajo
YR385	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Idi	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Idi. Este trabajo
YR332; YR334	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis_Idi	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis_Idi. Este trabajo
YR379; YR380	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Ges_Idi	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Ges_Idi. Este trabajo
YR337; YR338	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis_Idi_Hmg	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis_Idi_Hmg. Este trabajo
YR225	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195ERG	T ₇₃ -4 transformada con YEp195ERG. Este trabajo
YR252; YR253	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis_ERG	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis_ERG. Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
YR227	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195erg2	T ₇₃ -4 transformada con YEp195erg2. Este trabajo
YR158; YR229	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; YEp195Lis_erg2	T ₇₃ -4 transformada con YEp195Lis_erg2. Este trabajo
T ₇₃ <i>ura3-leu2</i>	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; <i>leu2Δ::leu2Δ</i>	Derivada de T ₇₃ -4. Cedida por la Dra. Emilia Matallana
YR480	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; <i>leu2Δ::leu2Δ</i> ; YEp195leu2d	T ₇₃ <i>ura3-leu2</i> transformada con YEp195leu2d. Este trabajo
YR484; YR485	<i>ura3::470/ura3::470</i> ; <i>leu2Δ::leu2Δ</i> ; YEp195Lis_leu2d	T ₇₃ <i>ura3-leu2</i> transformada con YEp195Lis_leu2d. Este trabajo

2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos usados en este trabajo aparecen detallados a continuación; en los casos en los que los marcadores de selección son los mismos que en los plásmidos originales esta información no ha sido incluida.

Tabla 7. Listado de plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Descripción (marcador de selección)	Procedencia
pGEM-T Easy	Diseñado para el clonaje de productos de PCR (Amp ^r)	Promega (USA)
YEplac181	Plásmido episomal, origen de replicación de <i>S. cerevisiae</i> de 2μ (Amp ^r ; <i>LEU2</i>)	Gietz y Sugino, 1988. Cedido por el Dr. Julio Polaina (IATA)
YEplac195	Plásmido episomal, origen de replicación de <i>S. cerevisiae</i> de 2μ (Amp ^r ; <i>URA3</i>)	Gietz y Sugino, 1988. Cedido por el Dr. Julio Polaina
pG1-LIS	Plásmido episomal con la construcción <i>TDH3_p::LIS::PGK1_t</i> (Amp ^r ; <i>TRP1</i>)	Herrero <i>et al.</i> , 2008
YEp195Lis	Plásmido YEplac195 con la construcción <i>TDH3_p::LIS::PGK1_t</i>	Este trabajo
YEpACT4	Plásmido episomal con el promotor del gen <i>ACT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (Amp ^r ; <i>LEU2</i>)	Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1998

Plásmido	Descripción (marcador de selección)	Procedencia
TOPO-GES	Plásmido comercial con el ADNc del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> (Amp ^r)	Iijima <i>et al.</i> , 2004. Cedido por el Dr. Eran Pichersky (Universidad de Michigan, USA)
YEp181Ges	Plásmido YEplac181 con la construcción $ACT1_p::GES::HIS3_t$	Este trabajo
YEp195Ges	Plásmido YEplac195 con la construcción $ACT1_p::GES::HIS3_t$	Este trabajo
pAA8	Plásmido derivado de pUC18 con una versión del gen <i>LEU2</i> de <i>S. cerevisiae</i> con el promotor delecionado (Amp ^r)	Adam <i>et al.</i> , 1995. Cedido por el Dr. Julio Polaina
YEp195leu2d	Plásmido YEplac195 con el marcador de auxotrofia <i>LEU2-d</i> (Amp ^r ; <i>URA3</i> ; <i>LEU2-d</i>)	Este trabajo
YEp195Lis_leu2d	Plásmido YEplac195 con la construcción $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ y el marcador de auxotrofia <i>LEU2-d</i> (Amp ^r ; <i>URA3</i> ; <i>LEU2-d</i>)	Este trabajo
YIplac211	Plásmido integrativo de <i>S. cerevisiae</i> (Amp ^r ; <i>URA3</i>)	Gietz y Sugino, 1988. Cedido por el Dr. Julio Polaina
YIp211Lis	Plásmido YIplac211 con la construcción $TDH3_p::LIS::PGK1_t$	Este trabajo
YIp211Ges	Plásmido YIplac211 con la construcción $ACT1_p::GES::HIS3_t$	Este trabajo
YEp195PGK_Hmg	Plásmido YEplac195 con la construcción $PGK1_p::cat::hmg1$	Este trabajo
YEp195Hmg	Plásmido YEplac195 con la construcción $PGK1_p::cat::hmg1::CYC1_t$	Este trabajo
YEp195Lis_Hmg	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ y $PGK1_p::cat::hmg1::CYC1_t$	Este trabajo
YEp195Idi	Plásmido YEplac195 con el gen <i>IDI1</i> bajo el control de su propio promotor	Este trabajo
YEp195Lis_Idi	Plásmido YEplac195 con la construcción $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ y el gen <i>IDI1</i> bajo el control de su propio promotor	Este trabajo

Plásmido	Descripción (marcador de selección)	Procedencia
YEp195Ges_ Idi	Plásmido YEplac195 con la construcción $ACT1_p::GES::HIS3_t$ y el gen <i>IDI1</i> bajo el control de su propio promotor	Este trabajo
YEp195Lis_ Idi_Hmg	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$; $PGK1_p::cat::hmg1::CYC1_t$ y el gen <i>IDI1</i> bajo el control de su propio promotor	Este trabajo
YEp181ERG	Plásmido YEplac181 con la construcción $ACT1_p::ERG20$	Este trabajo
YEp195ERG	Plásmido YEplac195 con la construcción $ACT1_p::ERG20$	Este trabajo
YEp181erg2	Plásmido YEplac181 con la construcción $ACT1_p::erg20-2$	Este trabajo
YEp195erg2	Plásmido YEplac195 con la construcción $ACT1_p::erg20-2$	Este trabajo
YEp195Lis_ ERG	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ y $ACT1_p::ERG20$	Este trabajo
YEp195Lis_ erg2	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ y $ACT1_p::erg20-2$	Este trabajo
YEp195Lis_ erg2_Hmg	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$; $PGK1_p::cat::hmg1::CYC1_t$ y $ACT1_p::erg20-2$	Este trabajo
YEp195Lis_ erg2_Idi	Plásmido YEplac195 con las construcciones $TDH3_p::LIS::PGK1_t$; $ACT1_p::erg20-2$ y el gen <i>IDI1</i> bajo el control de su propio promotor	Este trabajo

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR fueron suministrados por la casa comercial Roche (Alemania). Sus nombres, secuencias y la región diana sobre la que fueron empleados se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos^a.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	FINALIDAD
PGKlp-upper	CAGGTCGACGGAAGCTTCTAACTGATCTATCC	Amplificar el promotor <i>PGKl</i>
PGKlp-lower	CGGGATCCGACCATGGTTTTATATTTTGTGTA AAAAG	
tHMGR-ATG	CATCCATGGACCAATGGTGAAAACTGAAG	Amplificar la región catalítica de <i>HMGl</i>
tHMGR-STOP	CGGGA TCCACATGGTGCTGTTGTGCTTC	
CYC1t-upper	CGGGA TCC TAAACAGGCCCTTTTCCTTTGTC	Amplificar el terminador <i>CYC1</i>
CYC1t-lower	TCCCCCGGGCAAAATTAAGCCTTCGAGCGTCC	
Idi1_prom	ACACAGCTGCAGCTGAACTGATCAACTCCACAC	Amplificar el gen <i>IDI1</i>
Idi1_term	ACACAGCTGCAGTGGGAAACATTC AAGAGG	
ERG20-NcoI	GTAGCCA TGGCTTCAGAAAAAGAAAATTAGG	Amplificar el gen <i>ERG20</i>
ERG20-XhoI	TATTC TCGAGCGCCGACGACAACTTACTCTTAATCGG	

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	FINALIDAD
erg20_2_upper	GTTACTTTTCGAAA <u>ACTGCTTACTATTTCTTTCTAC</u>	Generar el alelo <i>erg20-2</i>
erg20_2_lower	AGCAGTTTCGAAA <u>GTAAC</u> TATGAAGGAGTG	
GES-L35-Bs	CCCACGCTACATGTCTGCTTGCA <u>CGCCTTTGG</u>	Amplificar el gen <i>GES</i> desde Ser35
GES-STO-RI	CCCCCGAA <u>TTCTATTTATTTGAGTGAAGAAGAGG</u>	
His3-Sall	AGGTCGACTAGTGACACCCGATTTATTTAAAGCTG	Amplificar el terminador <i>HIS3</i>
His3-SphI	AGGCA <u>TGCGAA</u> TTTCGGATCCTCGGGGACACCCAAATATGG	
UNI	GTAAAAACGACGGCCAGT	Secuenciar clones en pGEM-T Easy
REV	CAGGAAAACAGCTATGAC	
HMG-seq	GAGCCTTCCTACGTACCGCAACC	Secuenciar <i>HMG1</i>
ID dirter	ATGCTATAACAACCGCGTC	Secuenciar <i>ID11</i>
ID revpro	CTAATCAAGGGATAATAC	
ID revATG	TGTTTTCTCCGCTTTTCGTC	

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	FINALIDAD
ERG20del1	AGGTGATAATTGATCACGGTG	Comprobar delección <i>ERG20</i> y secuenciar <i>ERG20</i> de T ₇₃
ERG20del2	CATCCCAATGTAAGTTTATAC	
ERG20ND	TATGCCCTAAGGAAGCATG	Secuenciar <i>ERG20</i> de T ₇₃
ERG20NR	TTCTGCGGAAGCAAGTTC	
Matlocus	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	Comprobar tipo sexual y ploidía de las cepas esporuladas
MataIpha	GCACGGAAATATGGGACTACTTCG	
Mata	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	
ExtURAdir	TTATAAAGGCCATGAAGC	Comprobar integraciones en el locus <i>URA3</i>
YIp211rev	TAAAAAATAGGCGTATCAC	
YIp211dir	CCGCTTACAGACAAGCTG	
ExtURArev	GGCTGTGTTTTTCAGGGTC	
YIpLIS	CACCTCATCAGCTTCCAG	
YIpGES	GGAAGAGGAGGCAAGAAG	

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	FINALIDAD
ERG20SHD	ACGCTGCAGACACTCCAGCGGTAAG	Sintetizar sonda híbrida <i>ERG20</i> : <i>URA3</i> para Southern
ERG20FR	GAAGCACACAAGTTTGTGCTTTTCGGTGCAATGATTTCTTTGTTCTGCG- GAAGCAAGTTCC	
URA3SHR	GAGCCCGGGTTCCCAGCCCTGCTTTTCTG	Sintetizar sonda híbrida <i>ERG20</i> : <i>URA3</i> para Southern
URA3FD	GGAAC TTGCTTCCGCAGAACAAAATCATGCACGAAAAGCAAACA- AACTTGTGTGCTTC	
ERG20FD	ACACTCCAGCGGTAAG	Sintetizar sonda <i>LIS</i> para northern
URA3FR	TTCCCAGCCCTGCTTTTCTG	
LIS-A	CTACCTTAGGTTATCTTGC	Sintetizar sonda <i>LIS</i> para northern
LIS-B	TTGGGGCTGATGAGGTGG	

^aLas secuencias diana para las enzimas de restricción utilizadas en la construcción de plásmidos aparecen subrayadas en los oligonucleótidos correspondientes.

4. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

En este apartado se describen los medios de cultivo y las condiciones empleadas para el crecimiento de los distintos tipos de microorganismos utilizados en el presente trabajo. En la preparación de todos los medios se aplicó un tratamiento térmico en autoclave de 121°C durante 20 minutos. Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo 1,5% (p/v) de agar bacteriológico, a excepción del medio de esporulación de *S. cerevisiae*, en el que éste se añadió al 2%. Los cultivos líquidos se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm. Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C, mientras que las cepas de *S. cerevisiae* se incubaron a 30°C.

4.1. *E. coli*

4.1.1. LB

Para el crecimiento rutinario de *E. coli* se empleó el medio LB (Sambrook y Russell, 2001). Este medio contiene 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura.

Las cepas portadoras de plásmidos con el marcador de selección *Amp^r* se mantuvieron en LB con ampicilina (LBA), a una concentración final de 100 mg/L.

4.1.2. MTB

La cepa DH5a de *E. coli* se creció en medio MTB para la obtención de la biomasa utilizada para la generación de células termocompetentes.

Este medio está compuesto por 20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 0,75 g/L de KCl. El pH se ajustó a 7.6 y tras la esterilización en autoclave se añadió MgSO₄ a una concentración final de 1,5 mM.

4.2. *S. cerevisiae*

4.2.1. Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio

4.2.1.1. SD

Medio mínimo compuesto por 20 g/L de D-glucosa, 5 g/L de SO₄(NH₄)₂ y 1,7 g/L de YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco, USA). A este medio se añadieron

los requerimientos necesarios de cada cepa en función de sus auxotrofías: 20 mg/L de adenina, 20 mg/L de uracilo, 20 mg/L de histidina, 30 mg/L de leucina, 30 mg/L de lisina, 20 mg/L de triptófano y/o 20 mg/L de metionina. Este medio se utilizó como medio sólido para la selección de transformantes, comprobación de genotipos, mantenimiento de cepas y recuento de viables portadoras de plásmido al final de la fase de crecimiento exponencial. También se empleó como medio líquido, para la obtención de preinóculos en los ensayos de producción de monoterpenos; para ello se transfirieron colonias de las cepas correspondientes a tubos de 15 mL con 5 mL de medio y se incubaron durante 16 horas en agitador orbital a 30°C y 200 rpm.

4.2.1.2. YPD

Medio rico compuesto por 20 g/L de peptona, 20 g/L de D-glucosa y 10 g/L de extracto de levadura. Para la selección de cepas portadoras del marcador de resistencia kanMX4 el medio se suplementó con geneticina a una concentración final de 200 mg/L.

Para los ensayos de producción de monoterpenos, expresión y actividad enzimática se utilizaron matraces de 250 mL, con 50 mL de medio líquido, que se inocularon con las cepas de *S. cerevisiae*, a partir de los preinóculos obtenidos en medio SD, a una densidad óptica inicial a 600 nm de 0,05 y se recogieron muestras (5 mL) a distintos tiempos. El medio sólido se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de cepas, en los recuentos de viables totales al final de la fase de crecimiento exponencial y para la germinación de esporas de levadura.

4.2.1.3. Medio de esporulación

Éste es un medio para inducir la esporulación de la levadura por falta de nutrientes, su único componente es acetato potásico (KAc) 10 g/L. Se utilizó para obtener cepas de laboratorio haploides con el gen *ERG20* deletado.

4.2.1.4. Análisis de la estabilidad plasmídica

Este método se empleó para calcular la estabilidad de los plásmidos introducidos en las distintas cepas de levadura generadas. Para ello se utilizaron los cultivos realizados para la producción de monoterpenos en condiciones de laboratorio (YPD) y microvinificación cuando los ensayos se hallaban cercanos a su punto final (32 horas y ~20 días respectivamente). Las muestras

obtenidas se diluyeron en agua estéril hasta obtener suspensiones de levaduras con la misma densidad óptica a 600 nm (~1,0). A partir de estas suspensiones se realizaron 4 diluciones seriadas 1/10 en agua estéril y se sembraron 25 µL de la suspensión más diluida en tres placas de medio completo (YPD) y tres de medio selectivo (SD). Las placas se incubaron 3-5 días a 30°C y se contaron las colonias, estableciéndose la frecuencia de permanencia del plásmido analizado como el porcentaje de colonias que son capaces de crecer en medio selectivo tomando como referencia el número de colonias que aparecen en medio completo “% permanencia de plásmido = (número de colonias SD/ número de colonias YPD) X 100”.

4.2.2. Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación

Para los ensayos de microvinificación se utilizó mosto de la variedad Parellada (cosecha del año 2008; cedido por el Dr. Braulio Esteve – Bodegas Torres) tratado con dicarbonato de dimetilo (Velcorin – Lanxess Alemania). Botellas de 250 mL con 200 mL de mosto se inocularon a una concentración inicial de 1×10^6 células/mL, se incubaron a 18°C y se recogieron muestras periódicamente monitorizando el crecimiento de las levaduras, °Brix, concentración de azúcares reductores por el método Nelson-Somogyi y la acumulación de monoterpenos y otros volátiles. En las muestras de vino final se determinaron además, mediante diversos kits, las concentraciones de etanol (Roche, Alemania), acetaldehído (Roche, Alemania), glicerol (SYSTEAS.r.l., Italia) y ácido acético (SYSTEAS.r.l., Italia).

5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Construcción de plásmidos

5.1.1. *pGEM-T Easy*

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR, se clonaron en primer lugar en el vector comercial pGEM-T Easy (Promega), adaptado para ligar de forma rápida y eficiente secuencias de ADN amplificadas con polimerasas que agregan una adenina protuberante en los extremos de las mismas. Una vez clonados en este vector, los fragmentos podían ser mantenidos, amplificados y secuenciados como paso previo a su clonación en el correspondiente vector de expresión.

5.1.2. Digestión

Los tratamientos con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales de procedencia, Roche (Alemania) y New England Biolabs (USA). Por regla general, las reacciones contenían 1-10 µg de ADN en un volumen final de 25-50 µL y se incubaron entre 3 y 16 horas a la temperatura óptima de la enzima. Los plásmidos o fragmentos de ADN que se digirieron con más de una enzima se sometieron, siempre que fue posible, a restricciones dobles ajustando las condiciones de incubación y composición de la mezcla de reacción para optimizar la eficiencia de ambas endonucleasas; siempre que la eficiencia prevista para alguna de las enzimas estaba por debajo del 75% se realizaron digestiones secuenciales, purificando los fragmentos entre las mismas.

5.1.3. Tratamientos enzimáticos

Los fragmentos resultantes tras la restricción fueron sometidos a tratamientos enzimáticos previos a la ligación cuando era posible y/o necesario para optimizar la eficiencia de la misma. Cuando la reacción de ligación podía dar lugar a grandes proporciones de plásmidos religados se desfosforilaron los extremos de los mismos, tratando el vector linearizado con fosfatasa antártica según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Cuando fue necesario para que los extremos de los fragmentos pudieran ser ligados se trataron los fragmentos de ADN con la polimerasa del bacteriófago T4 (Roche) que tiene actividad 5'-3' polimerasa y 3'-5' exonucleasa; para ello se añadieron dNTPs cuando fue necesario y se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

5.1.4. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN fueron purificados a partir de geles de agarosa, con el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Alemania). Los fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR fueron purificados directamente con el kit comercial "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, USA).

5.1.5. *Ligación*

Para establecer la cantidad mínima de inserto a utilizar en la reacción de ligación, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{ng de vector} \times \left(\frac{\text{Tamaño del inserto en pb}}{\text{Tamaño del vector en pb}} \right) = \text{ng de inserto}$$

Siempre que fue posible se utilizó una relación 3:1 (inserto:vector) en el proceso de ligación, tal como recomendaba el fabricante de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche, Alemania). Se utilizaron 100-200 ng de vector en cada ligación con 1-5 U de ligasa en función de la dificultad. Finalmente, la reacción se incubó 16-18 horas a 16°C y el producto de la ligación se utilizó para transformar la cepa DH5 α de *E. coli*.

5.2. *Extracción de ADN plasmídico de E. coli*

5.2.1. *Extracción rápida*

Se empleó para el análisis rápido de un alto número de transformantes de *E. coli*. Este método fue útil como primera aproximación para descartar productos de ligación erróneos mediante la comparación del tamaño de los plásmidos de los transformantes con el de un plásmido control. Se recogieron pequeñas cantidades de cada uno de los transformantes crecidos en una placa máster de LBA y se mezclaron con 40 μ L de una solución de lisis (EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaOH 100 mM y SDS 1%). Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 3 μ L de HCl 1M, 5 μ L de tampón de carga (10x) de electroforesis y se dejaron a -80°C durante 20 minutos. A continuación se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% (p/v).

5.2.2. *Recuperación de plásmidos*

Los plásmidos que se iban a analizar por restricción o aquellos con los que se transformaron las cepas de levadura fueron extraídos por este método. Se inocularon 3-5 mL de medio LBA con una colonia aislada y se incubó durante 16-18 horas a 37°C y 200 rpm. Las células se recogieron por centrifugación y el ADN plasmídico se aisló con el kit comercial “GenElute plasmid miniprep kit” (Sigma, Sigma-Aldrich, USA).

5.3. Recuperación de plásmidos de *S. cerevisiae*

Este método se empleó para confirmar la presencia de ADN plasmídico en los transformantes de *S. cerevisiae*. Se empleó el kit comercial “GenElute plasmid miniprep kit” (Sigma, Sigma-Aldrich, USA) tras la ruptura mecánica de las células de levadura con bolas de vidrio de 0,5 mm (Biospec products Inc.) y 3 ciclos de 30 segundos en un agitador “Minibeadbeater-8 Cell Disruption” a la máxima velocidad; entre los ciclos se dejaron las muestras 30 segundos en hielo. La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con los plásmidos obtenidos para su amplificación y análisis.

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR se utilizó para comprobar genotipos, amplificar fragmentos de ADN para su clonación y sintetizar sondas para la detección de ácidos nucleicos. Las reacciones de comprobación se llevaron a cabo con la polimerasa de ADN Dynazyme II de la casa comercial Finnzymes (Finlandia) mientras que las secuencias amplificadas para la construcción de plásmidos se obtuvieron con una ADN polimerasa con prueba de lectura, “Expand High Fidelity PCR System” (Roche).

Las reacciones se llevaron a cabo en 10-50 μ L de volumen final y las condiciones de PCR se ajustaron en función de la temperatura de hibridación de la pareja de oligonucleótidos y la longitud del molde a amplificar.

5.4.1. PCR en gradiente

Para la determinación de la temperatura de anillamiento óptima de determinadas parejas de oligonucleótidos se realizó una PCR en gradiente de temperaturas. Para ello se preparó una mezcla de reacción de 100 μ L y se repartió en 10 tubos de PCR de 0,2 mL. Al término de la reacción se añadió 1 μ L de tampón de carga de electroforesis a cada muestra y se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% (p/v).

5.4.2. PCR de fusión

Esta técnica se utilizó para la síntesis de una sonda híbrida capaz de detectar simultáneamente los fragmentos del genoma correspondientes a los genes *ERG20* y *URA3*. Para ello se diseñaron 3 parejas de

oligonucleótidos; en una primera reacción de PCR se amplificó una región interna del ADN codificante de cada gen con las parejas de oligonucleótidos ERG20SHD/ERG20FR y URA3FD/URA3SHR, de forma que, por el diseño realizado, se generara una región solapante entre ambos amplificados de alrededor de 60 nucleótidos. Los dos fragmentos resultantes de la primera PCR se mezclaron en una segunda reacción en la que no se incluyeron oligonucleótidos, haciendo la región solapante las veces de cebador para completar la doble cadena. Finalmente, el resultado de esta PCR fue amplificado con la pareja de oligonucleótidos ERG20FD/URA3FR diseñada para amplificar la secuencia completa, se aisló el fragmento de PCR deseado, se clonó en pGEM-T Easy y se utilizó como molde para una PCR convencional en la que se incluyeron nucleótidos marcados (DIG DNA Labeling Mix - Roche) para su detección, generando así la sonda híbrida para el análisis Southern. El resultado de la PCR de marcaje se pasó por columnas Microspin S300-HR (GE Healthcare, USA) para eliminar impurezas.

5.4.3. PCR asimétrica

Esta variación de la técnica de PCR se utilizó para la síntesis de sondas de ADN empleadas en la detección de ARNm por análisis northern. En primer lugar se amplificó la región que se emplearía como sonda por PCR convencional, y una vez obtenido este fragmento se utilizó como molde en una reacción de PCR con nucleótidos marcados (DIG DNA Labeling Mix - Roche) y un único oligonucleótido que sirvió de cebador para la síntesis de la cadena complementaria del gen cuya expresión sería posteriormente detectada. El resultado de la PCR de marcaje se pasó por columnas Microspin S300-HR para eliminar impurezas.

5.5. Secuenciación de fragmentos de ADN

El ADN fue marcado utilizando el kit “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA) y analizado en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia, utilizando un secuenciador automático de ADN ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El ADN molde empleado fue plasmídico o producto de PCR. Los cromatogramas obtenidos tras las reacciones de secuenciación se analizaron utilizando el paquete informático Staden (Staden, 1996).

5.6. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN y ARN se realizó en geles de agarosa, normalmente con una concentración del 0,8% (p/v). En la electroforesis y preparación de los geles se usó tampón TAE (1x) compuesto por (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). Las muestras se mezclaron en tampón de carga tipo III -azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilene cianol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)- y se cargaron en el gel. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 80-100 V durante 1-2 horas a excepción de los geles preparativos para la purificación de fragmentos de ADN que se separaron a un voltaje inferior; 30 V durante 14-16 horas. Los geles se tiñeron en un baño con bromuro de etidio y se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV, la longitud de las bandas se determinó por comparación con un marcador de ADN.

5.7. Extracción de ADN de *S. cerevisiae*

5.7.1. Extracción rápida de ADN de *S. cerevisiae*

Para el análisis mediante PCR de los genotipos de cepas de levadura se realizó un tratamiento térmico de las colonias que se querían analizar. Las células se suspendieron en la mezcla de reacción de PCR y se sometieron a un ciclo de 15 minutos a 95°C previo a la adición de la polimerasa, este tratamiento permite la extracción de pequeñas cantidades de ADN genómico, suficientes para llevar a cabo la reacción de PCR.

5.7.2. Extracción de ADN total

Para la comprobación del patrón de restricción del ADN mitocondrial, o en los casos en que la extracción rápida no era suficiente para obtener una buena amplificación, se utilizó el siguiente protocolo.

Se recogieron las células de un cultivo de 16 horas en YPD y se lavaron con agua estéril. Se resuspendieron en 500 μ L del tampón 1 (sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1 M pH 7.5) y se añadieron 30 μ L de zimoliasa 1 mg/mL (Seikagaku Corporation, Japón), se incubó a 37°C durante 1 hora. Las células se recuperaron por centrifugación (3 minutos; 12.000 rpm) y se resuspendieron en el tampón 2 (Tris 50 mM; EDTA 20 mM pH 7.4), se añadieron 13 μ L de SDS 10% (p/v) y se incubaron 5 minutos a 65°C.

Posteriormente se añadieron 200 μ L de acetato potásico 5 M y se dejaron enfriar en hielo 10 minutos; tras centrifugar 15 minutos a 14.000 rpm y 4°C se recuperó el sobrenadante, se añadieron 700 μ L de isopropanol y se conservó a -20°C para precipitar el ADN. Se centrifugaron las muestras 15 minutos (12.000 rpm a 4°C) y se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v) antes de resuspenderlo en 50 μ L de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM pH 8.0). El ADN fue tratado con RNasa A durante 30 minutos a 37°C.

5.7.3. *Extracción de ADN genómico*

Las preparaciones de ADN genómico, de calidad suficiente para realizar análisis Southern, se llevaron a cabo mediante el siguiente protocolo.

Se recuperaron por centrifugación las células de un cultivo de 50 mL crecido durante 16 horas en YPD, se resuspendieron en 5 mL de solución de pretratamiento (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; DTT 10 mM) y se incubaron 20 minutos a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 5 mL de una solución (sorbitol 1 M; Tris-HCl 50 mM pH 8.0; zimoliasa 10 μ g/mL) y se incubaron 1 hora a 30°C. Los esferoplastos se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 900 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM; NaCl 0,15 M), se añadieron 100 μ L de SDS 10% (p/v) y se incubaron 20 minutos a 65°C. Se añadieron 375 μ L de acetato potásico 5 M y se dejaron enfriar en hielo durante 30 minutos; se recuperó el sobrenadante tras centrifugación y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en 300 μ L de TE y se trató con 5 μ L de RNasa (10 mg/mL), 1 hora a 37°C. El ADN se sometió a extracción fenólica, se precipitó con 1 mL de etanol absoluto y 125 μ L de acetato de sodio 3 M y se resuspendió en 25 μ L de TE.

5.8. **Análisis de fragmentos de ADN por el método Southern**

Los análisis Southern se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de la casa comercial Roche “DIG Application Manual for Filter Hybridization”. Los ADN genómicos de las cepas de levadura se digirieron con las enzimas de restricción y se cargaron en un gel de agarosa, la transferencia a la membrana Hybond-N⁺ (GE Healthcare) se realizó mediante trampa de vacío añadiendo secuencialmente las soluciones de despurinación (HCl

0,2 M durante 45 minutos), desnaturalización (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M durante 30 minutos) y neutralización (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M pH 7.4 durante 30 minutos). La transferencia se completó con SSC20X (NaCl 3 M; citrato de sodio 0,3 M durante 45 minutos) y el ADN se fijó a la membrana irradiándola con luz ultravioleta (0,2 J/cm²). La hibridación se realizó con el tampón “DIG Easy hyb” (Roche) y para la detección de la sonda generada por PCR de fusión se utilizaron los reactivos del “DIG wash and block buffer set” (Roche), el anticuerpo “Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments” (Roche) y el reactivo luminiscente “CDP-Star” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.9. Extracción de ARN de *S. cerevisiae*

La extracción de ARN total se realizó a partir de las células recogidas a las 24 horas de los cultivos para producir monoterpenos en YPD. Las células se resuspendieron en 0,5 mL de tampón LETS (LiCl 0,1 M; EDTA 0,01 M; SDS 0,2% (p/v); Tris-HCl 0,01 M pH 7.4), se añadieron 0,5 mL de fenol saturado pH 4.3 (AMRESCO, USA), 0,5 mL de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se rompieron alternando 3 pulsos de 30 segundos a máxima velocidad en un agitador “Minibeadbeater-8 Cell Disruption” con 30 segundos en hielo. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 12.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 15°C y se extrajo el sobrenadante una vez con un volumen de fenol:cloroformo (5:1) (v:v) y otra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (v:v:v). Se precipitó el ARN con un volumen de LiCl 5 M a -20°C durante al menos 3 horas y tras centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm (4°C) se lavó con etanol 70% (v/v) y se dejó secar. Las muestras se resuspendieron en agua estéril y se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de una dilución adecuada a 260 nm.

5.10. Análisis de ARN por el método northern

Los análisis northern se llevaron a cabo de un modo similar al descrito en Flippi *et al.*, 2003. Los geles de agarosa se cargaron con 12,5 µg de ARN (desnaturalizado con glioxal) por pocillo. Las membranas (Hybond-N, GE Healthcare) se tiñeron con 0,03% azul de metileno como control de carga (Herrin y Schmidt, 1988) y se lavaron, hibridaron y detectaron usando los mismos reactivos descritos para la técnica de Southern. Como sonda se utilizaron los fragmentos de ADN marcados por PCR asimétrica.

6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

6.1. Extracción de las proteínas totales de *S. cerevisiae*

Se recogieron las células de cultivos de 24 horas en YPD y se resuspendieron en tampón de extracción/reacción (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; DTT 10 mM; glicerol 10% (v/v); MgCl₂ 20 mM; MnCl₂ 5 mM; ascorbato sódico 1 mM; inhibidor proteasas (Roche) 1 pastilla/10 mL) y se rompieron con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y 4 pulsos de 30 segundos en el “Minibeadbeater-8 Cell Disruption” a la máxima velocidad; entre los pulsos se enfriaron las muestras en hielo durante 30 segundos. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a cuantificar la proteína total extraída.

6.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó empleando el método descrito por Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar. Para ello, se utilizó el kit “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad, USA), siguiendo el procedimiento de microensayo, según las instrucciones del fabricante.

6.3. Determinación de actividades enzimáticas

La determinación de actividad linalol sintasa se realizó incubando 1 mL de los preparados de proteína total de *S. cerevisiae* en tampón de extracción/reacción añadiendo GPP (Sigma) a una concentración final de 54 μM (30°C durante 30 minutos a 100 rpm). La conversión de GPP en linalol se determinó por cromatografía de gases y los valores de actividad se expresaron en μg linalol/L·mg proteína total.

7. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS

7.1. Cromatografía de gases

Para la extracción de terpenos, se añadieron 0,6 g de NaCl a 3 mL de las muestras recogidas y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas para favorecer la volatilización de los terpenos. Transcurrido este tiempo, se realizó una microextracción en fase sólida del espacio de cabeza, exponiendo una fibra de polidimetil-siloxano durante 30 minutos;

esta fibra se inyectó posteriormente en un cromatógrafo de gases para la separación de los terpenos.

La separación y cuantificación de monoterpenos y sus ésteres se realizó mediante cromatografía de gases usando indistintamente un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890, serie II o Thermo-Scientific, modelo Focus-GC, ambos equipados con una columna HPInnowax (longitud, 15 m; diámetro interno, 0,25 mm; grosor de capa, 0,25 mm) y un detector de ionización de llama.

La identificación de los compuestos de interés se realizó por comparación de sus tiempos de retención con los de estándares comerciales (Fluka) con los que también se realizaron las curvas de calibrado para su cuantificación. A todas las muestras analizadas se les agregaron 0,2 µg de 2-octanol como patrón interno.

7.2. Espectrometría de masas

Cuando fue necesario para la identificación de nuevos volátiles, las muestras se analizaron en un cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 bajo las mismas condiciones cromatográficas. Los espectros iónicos de los picos de interés se compararon con los de las bases de datos para determinar a qué compuesto correspondían.

8. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

8.1. *E. coli*

8.1.1. *Preparación de células termocompetentes*

La preparación de las células termocompetentes se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Hanahan (1983).

Se inoculó un matraz con 250 mL de medio MTB con 5 mL de un precultivo de 16 horas y se incubó a 37°C y 200 rpm hasta una DO_{600} de 0,48. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 5 minutos (4°C), se resuspendieron en 30 mL de tampón Tf I (acetato de potasio 30 mM; cloruro de rubidio 100 mM; cloruro de calcio 10 mM; cloruro de manganeso 50 mM; glicerol 15% (v/v)) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Las células se resuspendieron después en tampón Tf II (MOPS 10 mM; cloruro de calcio 75 mM; cloruro de rubidio 10 mM; glicerol 15% (v/v)) y se separaron alícuotas de 100-200 µL en tubos eppendorf. Las células se pueden usar inmediatamente o congelar en nitrógeno líquido y conservar a -80°C.

8.1.2. Transformación por choque térmico

Las células termocompetentes se descongelaron en hielo, se añadieron entre 1 y 20 μL de la mezcla de ligación o del plásmido a amplificar y se coincubaron 20 minutos en hielo. A continuación se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo 1 minuto. Se añadieron 0,8 mL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C para facilitar la recuperación de las células. Se sembraron 100-200 μL en medio sólido LBA y se dejaron las placas a 37°C durante 16-18 horas. Los transformantes se analizaron en primera instancia empleando el método de extracción rápida de ADN plasmídico.

8.2. *S. cerevisiae*

La transformación de las cepas de levadura utilizadas en este estudio se llevó a cabo empleando el método de transformación descrito por Ito *et al.*, 1983 con las modificaciones introducidas por Puig *et al.*, 1998.

Las cepas de levadura se inocularon en matraces con 50 mL de YPD a una DO_{600} de 0,4 y se dejaron crecer durante dos generaciones, hasta alcanzar una DO_{600} de 1,6. Llegado este punto, las células se recogieron y se lavaron con agua estéril, se resuspendieron en 1 mL de LiAc 100 mM y se traspasaron a un eppendorf, se recogieron las células en el fondo del tubo por centrifugación, se resuspendieron en 400 μL de LiAc 100 mM y se incubaron 15 minutos a 30°C. Alícuotas de entre 50 y 100 μL de las células se repartieron en nuevos eppendorf en los que se llevó a cabo la transformación, se eliminó el LiAc 100 mM y se añadieron en este orden 240 μL de PEG-6000 50% (p/v); 36 μL de LiAc 1M; 10 μL de ADN carrier 10 mg/mL (YeastMaker carrier DNA – Clontech, USA) previamente desnaturalizado a 100°C durante 5 minutos y enfriado rápidamente en hielo; 10-50 μL del ADN con el que se transformaron las levaduras y agua estéril hasta un volumen final de 350 μL . Esta mezcla se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó a 30°C durante 30 minutos. Para la transformación de las cepas vínicas ICV16 *ura3⁻*, *T₇₃-4* y *T₇₃ura3-leu2* se añadieron 33 μL de DMSO para incrementar el número de poros en la membrana celular, y todas las transformaciones se sometieron a un choque térmico de 20 minutos en un baño de agua a 42°C. Las células se recogieron por centrifugación suave (1 minuto a 8.000 rpm) y se resuspendieron cuidadosamente en medio rico YPD para su recuperación 2-4 horas. Finalmente las células se sembraron en placas de medio sólido selectivo y se dejaron crecer 2-4 días. Todas las transformaciones se llevaron a cabo con los

plásmidos descritos en la Tabla 7, los plásmidos integrativos se linearizaron por restricción antes de la transformación para mejorar la eficiencia de la recombinación. Los transformantes protótrofos para los distintos marcadores utilizados fueron seleccionados para estudios posteriores.

9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Para las búsquedas en el genoma de *S. cerevisiae* se utilizó la base de datos (SGD) www.yeastgenome.org, proporcionada por la Universidad de Stanford. Otras herramientas bioinformáticas utilizadas en el presente trabajo, como por ejemplo BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool), se encuentran alojadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Diversos programas de análisis de secuencias, diseño y representación de estrategias de clonación como Generunner, DNAMAN, Staden Package, Visual cloning y Chromas entre otros se usaron para diseñar oligonucleótidos, comprobar secuencias de nucleótidos, buscar dianas de restricción y dibujar esquemas de los plásmidos generados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE MONOTERPENOS

I.1. Evaluación del potencial productor de distintas cepas de *S. cerevisiae*

Sinopsis

La producción de linalol derivada de la expresión del gen *LIS* (codifica S-linalol sintasa en *Clarkia breweri*), en cepas de laboratorio y cepas vínicas industriales de *S. cerevisiae*, se utilizó en primer lugar como marcador para evaluar posibles diferencias en su capacidad inherente para producir monoterpenos y seleccionar así las mejores hospedadoras para la expresión heteróloga de monoterpeno sintasas. Las cepas vínicas ensayadas ICV16 *ura3⁻* y T₇₃-4 resultaron ser las mejores candidatas, en especial la cepa T₇₃-4, que alcanzó unos valores de producción que triplicaron los obtenidos en las cepas de laboratorio ensayadas. Asimismo, la producción de geraniol, derivada de la expresión del gen *GES* (codifica geraniol sintasa en *Ocimum basilicum*) en estas mismas cepas resultó también mayor en la cepa T₇₃-4 (~2,5x) al compararla con la obtenida en la cepa BQS252. Las concentraciones obtenidas de geraniol fueron muy superiores (>100x) a las de linalol; además, mientras que el linalol se mantuvo estable, a partir del geraniol se produjeron cantidades detectables de otros monoterpenos y ésteres con potencial aplicación industrial. Estos resultados muestran la importancia tanto de la selección de cepa hospedadora como del transgen que se va a expresar en la misma.

Antecedentes

En los últimos años se han identificado y caracterizado numerosos genes que codifican monoterpeno sintasas en plantas, lo cual ha posibilitado el desarrollo de nuevas estrategias de sobreproducción de estos compuestos en plantas (Aharoni *et al.*, 2006; Diemer *et al.*, 2001; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2008) y microorganismos (Carter *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2007). El gen *LIS* de *Clarkia breweri* (Dudareva *et al.*, 1996) codifica una S-linalol

sintasa previamente purificada por el grupo de investigación (Pichersky *et al.*, 1995), que cataliza la producción específica del estereoisómero S-linalol, uno de los monoterpenos con potencial industrial y considerado además importante para determinar el aroma de ciertos tipos de vino, utilizando como sustrato GPP. Entre los monoterpenos con potencial aplicación industrial y que juegan un papel determinante en la percepción aromática de algunos vinos se encuentra también el geraniol, y la enzima que cataliza su síntesis en *Ocimum basilicum* (albahaca), la geraniol sintasa (codificada por el gen *GES*) ha sido caracterizada y su actividad *in vitro* ensayada con la enzima purificada, produciendo específicamente geraniol (Iijima *et al.*, 2004).

Por otra parte, la producción de monoterpenos en *S. cerevisiae* está muy limitada debido a que, a diferencia de las plantas, carece de monoterpeno sintasas y el precursor natural de los monoterpenos (GPP) sólo existe como intermediario transitorio de la síntesis de FPP. Sin embargo, se ha demostrado que en las células de esta levadura hay suficiente GPP disponible para ser aprovechado por monoterpeno sintasas heterólogas (Oswald *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008). Además, aunque en el genoma de *S. cerevisiae* no existen genes para la síntesis de monoterpenos, sus células poseen la capacidad de bioconvertir monoterpenos como el geraniol, que según está descrito puede ser reducido a citronelol y convertido a linalol (Gramatica *et al.*, 1982; King y Dickinson, 2000; Gamero *et al.*, 2011; Khor y Uzir 2011), y se han caracterizado varias enzimas con actividad alcohol acetil transferasa que podrían actuar sobre estos monoterpenos para dar lugar a sus ésteres de acetato; las más conocidas son las codificadas por los genes *ATF1* (Fujii *et al.*, 1994) y *ATF2* (Nagasawa *et al.*, 1998), pero tras la anotación sistemática del genoma de *S. cerevisiae* se han caracterizado otros genes que codifican actividades similares; *SLII* (Momoi *et al.*, 2004); *EHT1* y *EEB1* (Saerens *et al.*, 2006). Con estos precedentes, la expresión del gen *GES* en *S. cerevisiae* podría resultar en una dispersión metabólica hacia otros monoterpenos y/o ésteres, importantes desde el punto de vista organoléptico, en un fenómeno similar al que ocurre al expresar este mismo gen bajo el control del promotor de un gen implicado en la maduración del fruto en tomate (Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007), lo que podría resultar beneficioso para producir otros terpenoides con potencial industrial y para su posible aplicación en procesos de vinificación.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido además frecuentemente utilizada como plataforma para la producción de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y carotenos y su capacidad para esta tarea está sobradamente demostrada y

revisada (Asadollahi *et al.*, 2008; Chang y Keasling, 2006; Huang *et al.*, 2008; Kirby y Keasling, 2009; Marasco y Schmidt-Dannert, 2007; Maury *et al.*, 2005; Nevoigt, 2008). Hasta ahora, la mayor parte de las estrategias de mejora de producción de metabolitos se han llevado a cabo en cepas de laboratorio, dejando las levaduras industriales y/o los aislados naturales fuera de estos estudios por su complejidad y dificultad de manejo, pero la selección de una buena cepa hospedadora puede ser crucial para procesos de sobreproducción de enzimas y/o metabolitos. Como muestra de ello encontramos la sobreexpresión de la enzima glucoamilasa codificada por el gen *STAI* (Latorre-García *et al.*, 2008) en cepas de laboratorio con diferente ploidía y cepas industriales de *S. cerevisiae*, en la que algunas cepas industriales mostraron una mayor actividad enzimática y también se estableció una relación de esta actividad con la ploidía de las cepas, siendo mayor conforme se incrementaba la dosis génica.

Por todo ello y con objeto de seleccionar una buena cepa hospedadora para futuros ensayos se estudió el potencial de distintas cepas de laboratorio y cepas industriales de *S. cerevisiae* para la producción de monoterpenos. El gen *LIS* de *C. breweri* (GenBank U58314) se utilizó como prototipo, dado que al ser expresado en *S. cerevisiae* da lugar a la producción específica de S-linalol (Herrero *et al.*, 2008); lo que facilita el análisis de las muestras y permite una interpretación directa del efecto que pueda tener el fondo genético de las levaduras sobre dicha producción. Asimismo, el gen *GES* de *O. basilicum* (GenBank AY362553) se incluyó en estos estudios para determinar la reproducibilidad de los resultados obtenidos al expresar otras monoterpeno sintetas.

1.1.1. Construcción de plásmidos episomales para expresar los genes LIS de C. breweri y GES de O. basilicum en S. cerevisiae

Para la expresión en *S. cerevisiae* del gen *LIS* bajo el control del promotor constitutivo del gen *TDH3* (codifica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en *S. cerevisiae*) y el terminador del gen *PGK1* (codifica 3-fosfoglicerato kinasa en *S. cerevisiae*), y del gen *GES* bajo el promotor del gen de expresión constitutiva *ACT1* (codifica actina en *S. cerevisiae*) y el terminador del gen *HIS3* (codifica imidazol glicerol fosfato deshidratasa en *S. cerevisiae*) se seleccionó el vector de expresión YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988), derivado de pUC19 y pBR322, que es compatible con todas las cepas de levadura utilizadas en este estudio al llevar como marcador de selección el gen *URA3*

(codifica orotidina-5'-fosfato descarboxilasa en *S. cerevisiae*); empleado para complementar la síntesis de uracilo en las cepas de *S. cerevisiae* bloqueadas en este paso.

El casete de expresión $TDH3_p::LIS::PGK1_t$ se obtuvo por restricción con las enzimas *PstI* y *NaeI* a partir del plásmido pG1-LIS (Herrero *et al.*, 2008), que llevaba como marcador de selección el gen *TRP1* (codifica la enzima fosforibosil antranilato isomerasa). El fragmento resultante (~3,8 kb) se aisló por electroforesis en gel de agarosa y se subclonó en el vector YEplac195 previamente digerido con las mismas enzimas (*PstI* y *SmaI*), generándose así el plásmido YEp195Lis (Figura 6). Por su parte, el ADNc del gen *GES* se amplificó utilizando como molde el plásmido TOPO-GES (Iijima *et al.*, 2004) y los oligonucleótidos GES-L35-Bs y GES-STO-RI. Para la expresión del gen *GES* en *S. cerevisiae* se incluyó un codón de inicio de traducción artificial en el oligonucleótido GES-L35-Bs para iniciar la síntesis a partir del aminoácido serina 35 de la proteína silvestre (Iijima *et al.*, 2004), y evitar así posibles problemas de plegamiento o localización de la enzima geraniol sintasa debidos a la presencia de un péptido de localización subcelular en su extremo N-terminal, lo que es habitual en las terpeno sintasas de plantas (Bohlmann *et al.*, 1998) y que puede limitar el nivel de las mismas en expresiones heterólogas. El fragmento de 1,6 kb resultante de la reacción de PCR llevada a cabo con esos cebadores se subclonó en el plásmido pGEM-T Easy y, una vez comprobada por secuenciación la ausencia de errores introducidos durante la amplificación, se digirió secuencialmente con *EcoRI* y *BspLU11I* (el extremo cohesivo generado por la enzima *EcoRI* se trató con la ADN polimerasa del bacteriófago T4 antes de proceder a la restricción con *BspLU11I*). El terminador del gen *HIS3* (*HIS3_t*) se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa FY1679 de *S. cerevisiae*, isogénica a la cepa de referencia S288C, con los oligonucleótidos His3_Sall e His3_SphI; se subclonó en pGEM-T Easy, se comprobó su secuencia, y se aisló por restricción como un fragmento de 0,66 kb tras el tratamiento con las enzimas *HindII* y *SphI*. Ambos fragmentos (*GES* e *HIS3_t*) se subclonaron tras el promotor *ACT1_p* en el plásmido YEpACT4 (Sánchez-Torres *et al.*, 1998), previamente digerido con *NcoI* y *SphI*, generándose así el plásmido YEp181Ges (2 μ ; *LEU2*). El casete de expresión $ACT1_p::GES::HIS3_t$ se aisló de este plásmido como un fragmento de restricción *EcoRI* de 2,8 kb y se subclonó en el plásmido YEplac195 previamente digerido con *EcoRI*, obteniéndose así el plásmido YEp195Ges (Figura 6).

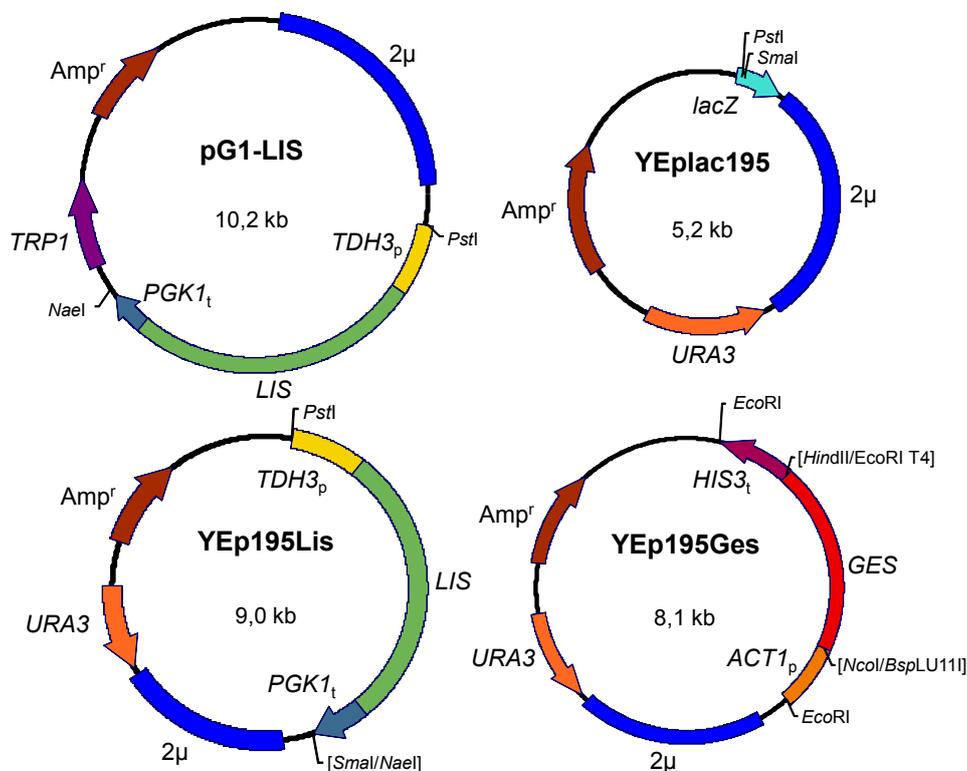


Figura 6. Plásmidos empleados para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que expresen los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

1.1.2. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* que expresan los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum*

Las cepas de laboratorio W303-1A, BQS252, BQS253 y FY1679, y las cepas vínicas ICV16 *ura3⁻* y T₇₃-4 (mutantes de pérdida de función del gen *URA3*) (Tabla 6) se transformaron según se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos de la presente Memoria con el fin de obtener distintas cepas de *S. cerevisiae* que expresaran el gen *LIS* de *C. breweri*. El plásmido YEp195Lis fue empleado a tal efecto y entre los transformantes protótrofos para uracilo se seleccionaron dos de cada fondo genético para comparar la producción de linalol. Se generaron así las cepas YR270 e YR272 (W303-1A YEp195Lis); YR174 e YR175

(BQS252 YEp195Lis); YR296 e YR297 (BQS253 YEp195Lis); YR201 e YR202 (FY1679 YEp195Lis); YR294 e YR295 (ICV16 *ura3*⁻ YEp195Lis); YR154 e YR162 (T₇₃-4 YEp195Lis). Todas las cepas parentales fueron además transformadas con el plásmido vacío YEplac195 para obtener las cepas YR159 (W303-1A); YR172 (BQS252); YR304 (BQS253); YR195 (FY1679); YR254 (ICV16 *ura3*⁻); YR70 (T₇₃-4), que se utilizaron como control negativo de producción.

Tras los estudios realizados con estas cepas, la cepa de laboratorio BQS252 y las cepas vínicas ICV16 *ura3*⁻ y T₇₃-4 se transformaron también con el plásmido YEp195Ges para comprobar si las diferencias observadas al producir linalol en distintas cepas se mantenían al expresar una monoterpene sintasa diferente, y de paso averiguar si la expresión de distintas monoterpene sintasas da lugar a rendimientos similares. Como en el caso anterior, dos transformantes de cada fondo genético fueron seleccionados en placas carentes de uracilo y se aislaron las cepas protótrofas YR509 e YR510 (BQS252 YEp195Ges); YR513 e YR514 (ICV16 *ura3*⁻ YEp195Ges); YR377 e YR378 (T₇₃-4 YEp195Ges).

Para confirmar que la transformación había sido llevada a cabo con éxito, se recuperaron los plásmidos de las cepas de levadura generadas y tras el análisis de restricción con *Hind*III se constató la ausencia de grandes reorganizaciones y se procedió a su análisis fenotípico.

1.1.3. Producción de linalol en cepas de laboratorio haploides de S. cerevisiae que expresan el gen LIS de C. breweri

Basándonos en el supuesto de que el fondo genético de las cepas hospedadoras pudiera tener un efecto significativo sobre la producción de monoterpeneos, en primer lugar se comparó la capacidad inherente de cepas de *S. cerevisiae* con orígenes y/o características diferentes para la producción de estos compuestos. Los estudios realizados por otros investigadores para producir el sesquiterpene epi-cedrol en *S. cerevisiae* mostraron que la producción de este compuesto en cepas *MATa* duplicaba la obtenida con aquellas de tipo sexual *MATa* (Jackson *et al.*, 2003), lo que sugería que las cepas de levadura haploides de tipo sexual *MATa* podrían necesitar sintetizar más FPP (precursor de los sesquiterpeneos) para la prenilación del factor-**a** (Anderegg *et al.*, 1988). Este hecho sugiere además que las cepas de levadura de distinto tipo sexual podrían presentar también diferencias que afectarían a la disponibilidad de GPP para las

monoterpeno sintetas. Con el fin de determinar si existe relación entre la producción de monoterpenos y el tipo sexual de la levadura, las cepas BQS252 (*MATa*; *ura3*⁻) y BQS253 (*MATα*; *ura3*⁻), derivadas de la cepa de referencia S288C, se transformaron con el plásmido YEp195Lis y se comparó la capacidad para producir linalol de los transformantes YR174 e YR175 (*MATa*); YR296 e YR297 (*MATα*). Los ensayos de producción de este monoterpeno se realizaron en medio rico YPD dado que algunos resultados preliminares indicaban que la producción de linalol en este medio era mayor a la obtenida en medio selectivo SD (Herrero y Orejas, sin publicar), y las muestras se recogieron a las 24 y 32 horas para determinar la concentración máxima, que se alcanza durante la fase exponencial temprana y se mantiene estable durante el resto de la curva de crecimiento (Herrero *et al.*, 2008). La producción máxima fue muy similar en todos los transformantes (*MATa* 21,98 ± 1,76 µg/L; *MATα* 21,86 ± 1,82 µg/L) (Figura 7), lo cual sugiere que la regulación específica de células de diferente tipo sexual no afecta a la disponibilidad de GPP. Tal y como se esperaba no se detectó producción de linalol en las cepas control YR172 (BQS252 YEplac195) e YR304 (BQS253 YEplac195) transformadas con el plásmido vacío.

Al no haber encontrado diferencias en la capacidad para producir monoterpenos entre cepas haploides de diferente tipo sexual, se decidió seleccionar cepas de levadura de tipo sexual *MATa* como hospedadoras para los ensayos de producción en cepas haploides. Por ello, para profundizar en el estudio de la capacidad productora de las células haploides de *S. cerevisiae*, la cepa de tipo sexual *MATa* W303-1A se transformó con el plásmido YEp195Lis y los transformantes YR270 e YR272 fueron seleccionados en medio mínimo sin uracilo. La producción absoluta de linalol de estos transformantes (media 10,90 ± 2,04 µg/L) fue la mitad de la obtenida con los transformantes derivados de BQS252. Sin embargo, debido a que el crecimiento de la cepa W303-1A era significativamente inferior al de la cepa BQS252 en las condiciones ensayadas, dicha producción normalizada en función del crecimiento de cada cepa deja una productividad similar en ambos linajes a las 32 horas de cultivo (BQS252Lis - 1,43 ± 0,27 µg/L·DO₆₀₀; W303-1ALis - 1,37 ± 0,22 µg/L·DO₆₀₀), lo cual sugiere que las cepas de laboratorio haploides tendrían capacidades equiparables para la producción heteróloga de monoterpenos independientemente de su tipo sexual y/o procedencia. Tampoco se hallaron niveles detectables de linalol en la cepa control YR159 (W303-1A YEplac195).

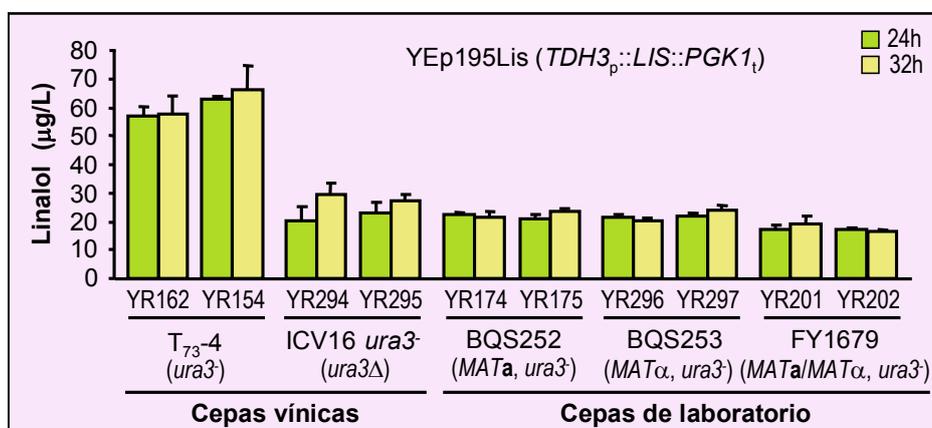


Figura 7. Producción de linalol en cepas de laboratorio y cepas vnicas de *S. cerevisiae*. Los sobrenadantes de los cultivos de producción realizados en YPD se recogieron a los tiempos indicados. Los resultados presentados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

1.1.4. Producción de linalol en cepas vnicas de *S. cerevisiae* que expresan el gen *LIS* de *C. breweri*

Las levaduras vnicas industriales han sido sometidas a un exhaustivo proceso de selección a lo largo de los años para aislar cepas capaces de influir positivamente en las propiedades organolépticas del producto final y en el propio proceso fermentativo. Esto ha dado lugar a levaduras genéticamente complejas que habitualmente son aneuploides o poliploides (Bakalinsky y Snow, 1990) y que han evolucionado para adaptarse a las condiciones específicas de la vinificación. Dados los múltiples y variopintos estreses a los que la levadura ha de sobreponerse en esas condiciones, como el estrés osmótico y las altas concentraciones de etanol, sería de esperar que estas levaduras hubieran desarrollado mecanismos para paliar o evitar los daños celulares ocasionados por los mismos. Por ello, y puesto que la ruta MVA se encuentra en la parte alta de la ruta del ergosterol, compuesto de especial relevancia en la composición de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, relacionado con la resistencia a etanol (Thomas *et al.*, 1978; Chi y Arneborg, 1999), se decidió determinar la influencia que esta especialización pudiera tener sobre la capacidad de las cepas vnicas para sintetizar monoterpenos heterólogos. Las cepas vnicas T₇₃-4 [quasi-diploide (Puig *et al.*, 1998)], ICV16 *ura3*⁻ (Jiménez-Martí *et al.*, 2009), y la cepa de laboratorio FY1679 (cepa diploide isogénica a BQS252 y BQS253) se transformaron con el plásmido YEp195Lis y dos transformantes de cada fondo genético fueron seleccionados en placas de medio mínimo sin uracilo.

La producción de linalol de las cepas vínicas recombinantes fue superior a la observada en las de laboratorio (Figura 7), indicando que de algún modo sus complejos fondos genéticos son más apropiados para la producción heteróloga de monoterpenos. Lo que no quiere decir que todas las levaduras vínicas posean la misma capacidad inherente para la producción de monoterpenos, ya que cuando se compararon los valores de producción de las dos cepas vínicas ensayadas se observaron notables diferencias en los niveles de linalol detectados. De hecho, la producción de las cepas derivadas de T_{73} -4 (YR154 e YR162; media $60,94 \pm 6,15 \mu\text{g/L}$) resultó ser aproximadamente el doble que la observada al realizar el mismo ensayo con las cepas derivadas de ICV16 *ura3*⁻ (YR294 e YR295), y unas 3 veces superior a la de las cepas de laboratorio (Figura 7). Para tratar de averiguar si esta mayor capacidad para producir monoterpenos está relacionada con el grado de ploidía de las cepas hospedadoras, la producción de linalol de las cepas derivadas de FY1679 (YR201 e YR202; media $17,37 \pm 1,84 \mu\text{g/L}$) se comparó con la obtenida con las cepas haploides BQS252Lis ($21,97 \pm 1,76 \mu\text{g/L}$) y BQS253Lis ($21,86 \pm 1,82 \mu\text{g/L}$) (Figura 7). Este resultado indica que el hecho de poseer un genoma diploide no es suficiente para que se dé un incremento en la capacidad de la levadura para producir monoterpenos y por tanto, la capacidad observada en las cepas vínicas debe estar relacionada con otros factores, probablemente derivados de su especialización para realizar fermentaciones vínicas. Tal como sucedió con las cepas haploides, no se detectó linalol en los cultivos realizados con las cepas control transformadas con el plásmido vacío YEplac195: YR70 (T_{73} -4); YR254 (ICV16 *ura3*⁻); YR195 (FY1679).

Las causas por las cuales existen estas diferencias entre las cepas hospedadoras no son fáciles de definir; si nos fijamos en la cinética de producción de monoterpenos, ésta resultó ser similar en las cepas vínicas YR162 (T_{73} -4Lis) e YR295 (ICV16 *ura3*⁻Lis) y la cepa de laboratorio YR175 (BQS252Lis) (Figura 8), acumulándose linalol durante la fase exponencial temprana tal y como se había descrito previamente para la cepa T_{73} -PG1LISURA (Herrero *et al.*, 2008), lo que sugiere que el sustrato utilizado en la reacción de síntesis de monoterpenos (GPP) se encuentra disponible durante esta fase del crecimiento en todas las cepas de levadura. Si bien esto no esclarece las causas de las diferencias encontradas en la producción de linalol, sirvió para corroborar que el tiempo idóneo de muestreo se encuentra alrededor de las 24 horas de cultivo en medio líquido YPD, puesto que la producción de monoterpenos ha alcanzado su valor máximo y se mantiene estable. Tampoco parece haber una relación entre el crecimiento de las distintas cepas de levadura y su capacidad de producción; ya que, cuando se comparan las curvas de crecimiento, las cepas

derivadas de T_{73} -4 alcanzan valores de densidad óptica un 15% por debajo de los alcanzados por las cepas derivadas de BQS252 y FY1679 (Figura 9A), y sus cinéticas de crecimiento son similares, por tanto la productividad en función del crecimiento sigue siendo favorable a la cepa T_{73} -4Lis ($4,38 \pm 0,29 \mu\text{g/L}\cdot\text{DO}_{600}$) cuando se compara con la de las cepas BQS252Lis ($1,63 \pm 0,15 \mu\text{g/L}\cdot\text{DO}_{600}$) y FY1679Lis ($1,35 \pm 0,12 \mu\text{g/L}\cdot\text{DO}_{600}$) a las 24 horas de cultivo. La acumulación de linalol no afectó a la capacidad de crecimiento de las cepas productoras; siendo su cinética equiparable a la observada para sus respectivas cepas control.

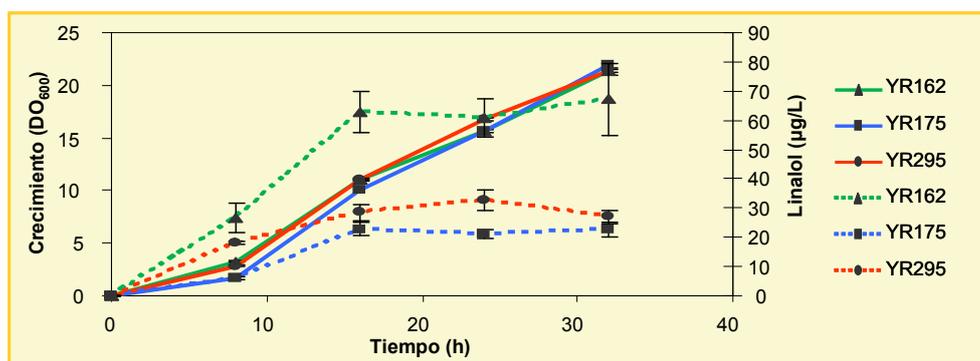


Figura 8. Curvas de crecimiento (línea continua) y producción de linalol (línea discontinua) de las cepas YR162 (T_{73} -4Lis); YR175 (BQS252Lis) e YR295 (ICV16 *ura3*-Lis). Los resultados presentados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La estabilidad del plásmido durante la fase de producción de monoterpenos se estudió a las 32 horas de cultivo en medio YPD, y se observó que alrededor de un 60% de las células de las cepas de laboratorio haploides BQS252 y BQS253 mantenían el plásmido YEp195Lis, mientras que la permanencia del plásmido en las cepas ICV16 *ura3*⁻ y T_{73} -4 se situó en torno al 80%, lo que se podría interpretar como un indicio del por qué de la mejora de la producción de linalol en las cepas vnicas. Sin embargo, al estimar la permanencia de este plásmido en la cepa diploide FY1679, cuya capacidad para producir linalol es similar a la de las cepas BQS252 y BQS253, alrededor del 80% de las células viables formaron colonias en medio mínimo sin uracilo, por lo que se descartó que la producción estimada en las cepas ICV16 *ura3*⁻ y T_{73} -4 se debiera a su capacidad para estabilizar el plásmido de expresión.

La acumulación del transcrito del gen *LIS* en las cepas BQS252, FY1679 y T_{73} -4 transformadas con el plásmido YEp195Lis se analizó por el método northern (Figura 9B) utilizando una sonda de 1,1 kb generada con los oligonucleótidos LIS-A y LIS-B. No se observaron grandes

diferencias en la intensidad de las bandas correspondientes al ARNm *LIS* en las distintas cepas, por lo que la mayor capacidad de producción de la cepa T_{73} -4 tampoco puede atribuirse a una mejora de la expresión del transgen, bien porque se transcribiera más y/o bien porque el ARNm fuera más estable. Por ello, se procedió al estudio de la actividad enzimática linalol sintasa de las células transgénicas para evaluar si pudieran existir diferencias en los procesos postranscripcionales de traducción o actividad de la proteína heteróloga que pudieran ayudarnos a determinar las causas de la mejora de la producción de linalol en la cepa T_{73} -4. Los valores de actividad observados para ambas cepas vnicas ICV16 *ura3*-*Lis* y T_{73} -4*Lis* (588 ± 222 y 617 ± 154 $\mu\text{g/L}\cdot\text{mg}$ de proteína total respectivamente) resultaron ser similares y muy próximos a los obtenidos al realizar el ensayo con células de la cepa de laboratorio BQS252*Lis* (636 ± 240 $\mu\text{g/L}\cdot\text{mg}$ de proteína total), lo que descarta a la funcionalidad de la proteína heteróloga como posible causa de las diferencias en la producción.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, parece claro que la producción heteróloga de monoterpenos depende del fondo genético de la cepa hospedadora y por tanto la selección de una buena cepa previamente a la aplicación de estrategias de ingeniería metabólica podría ser clave para la optimización de los resultados obtenidos. La disponibilidad de GPP intracelular es la explicación más directa aunque no podemos descartar otros factores como un posible desacoplamiento entre la enzima y el sustrato o posibles limitaciones debidas a la disponibilidad de los cofactores necesarios para la reacción de síntesis. En cualquiera de los casos, queda demostrado que el uso de la cepa vnica T_{73} -4 como hospedadora para la producción heteróloga de monoterpenos da lugar a un mayor rendimiento por unidad de volumen.

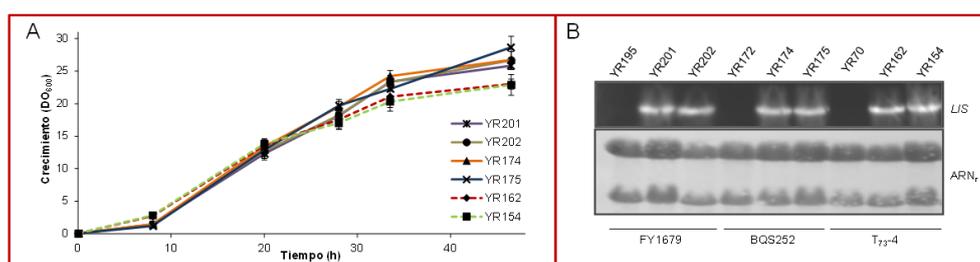


Figura 9. Análisis del crecimiento y expresión del gen *LIS* de las cepas FY1679*Lis* (YR201; YR202), BQS252*Lis* (YR174; YR175) y T_{73} -4*Lis* (YR162; YR154). (A) Curvas de crecimiento de las cepas BQS252, FY1679 y T_{73} -4 transformadas con el plásmido YEp195*Lis*. (B) Análisis northern de la expresión del gen *LIS* en levaduras transgénicas a las 24 horas de cultivo en medio líquido YPD. Se muestra el ARNr como control de carga y las cepas YR195; YR172 e YR70, transformadas con el plásmido YEplac195, como control negativo.

1.1.5. Producción de geraniol en cepas vínicas de *S. cerevisiae* que expresan el gen *GES* de *O. basilicum*

A pesar de que la cepa vínica T₇₃-4 presenta una mayor capacidad para la producción de linalol que las cepas de laboratorio estudiadas, los niveles obtenidos siguen siendo bastante limitados para su posible aplicación industrial. Además, en trabajos anteriores del grupo se había mostrado que la producción de este monoterpene se reduce hasta tres veces en ensayos de microvinificación (Herrero *et al.*, 2008). Por ello, se decidió comparar la producción de geraniol, con potencial aplicación en las industrias cosmética y alimentaria, resultante de la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en la cepa de laboratorio BQS252 y las cepas vínicas ICV16 *ura3*⁻ y T₇₃-4. Este gen había sido expresado con éxito anteriormente en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* (Oswald *et al.*, 2007) rindiendo niveles de geraniol considerablemente superiores a los que se muestran aquí para la producción de linalol, por lo que se consideró un buen candidato para comprobar si la mayor capacidad productora de la cepa T₇₃-4 se mantiene al expresar otras monoterpene sintetas, y evaluar si las cantidades de geraniol producidas son también mayores que las de linalol en nuestras condiciones experimentales.

Las cepas seleccionadas se transformaron con el plásmido YEp195Ges y los transformantes fueron aislados en placas de medio mínimo sin uracilo. Las cepas protótrofas YR509 e YR510 (BQS252Ges); YR513 e YR514 (ICV16 *ura3*⁻Ges); YR377 e YR378 (T₇₃-4Ges) fueron así aisladas para su posterior caracterización fenotípica. La producción de geraniol se cuantificó tras 24 horas desde la transferencia de las cepas transformantes a medio rico YPD; la producción de geraniol de la cepa T₇₃-4 (media 8,27 ± 1,42 mg/L) se comparó con la obtenida en la cepa vínica ICV16 *ura3*⁻ (media 4,08 ± 0,32 mg/L), estableciéndose que la producción es dos veces mayor en la cepa T₇₃-4, tal como se había observado para la producción de linalol (Figura 10A). La producción media de geraniol de las cepas derivadas de BQS252 fue de 3,40 ± 0,34 mg/L, lo que significa una producción de alrededor del 40% de la obtenida con la cepa T₇₃-4 (Figura 10A). Al igual que sucedió para el linalol, tampoco se hallaron niveles detectables de geraniol en las cepas control transformadas con el plásmido vacío YEplac195 (YR172 – BQS252; YR195 – ICV16 *ura3*⁻; YR70 – T₇₃-4).

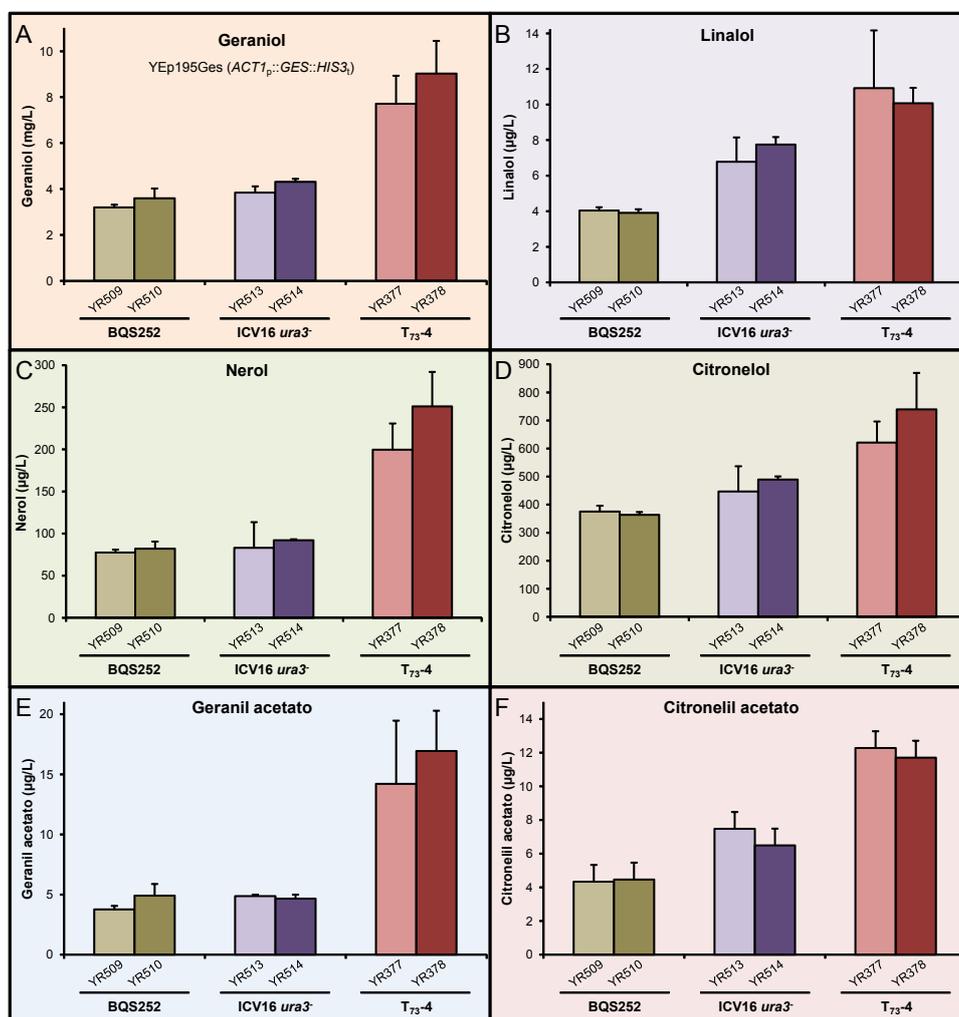


Figura 10. Producción de terpenoides derivada de la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en las cepas BQS252, ICV16 *ura3* y T₇₃₋₄ de *S. cerevisiae*. Los sobrenadantes de los cultivos de producción realizados en YPD se recogieron a las 24 horas de cultivo. Los resultados presentados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Al comparar los cromatogramas de las cepas que expresan el gen *GES* con los de las cepas control portadoras del plásmido vacío se encontraron otros cinco picos diferenciales además del correspondiente al geraniol. Por ello, estas muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para determinar la naturaleza de estos compuestos. La comparación de sus espectros iónicos con los de las bases de datos llevó a su identificación como linalol, nerol, citronelol, geranyl

acetato y citronelil acetato; los cuales podrían ser también aprovechados para su utilización como aditivos en la industria alimentaria (Tabla 3) y resultar beneficiosos para modular el aroma del vino producido por estas levaduras. Al cuantificar la concentración de los mismos se observó que en todos los casos las cantidades obtenidas eran directamente proporcionales a la cantidad de geraniol producida por cada cepa (Figura 10B, C, D, E y F) (Tabla 9), lo que sugiere que derivarían directamente de éste; dado que la geraniol sintasa de *O. basilicum* produce específicamente geraniol cuando se realiza la reacción *in vitro* (Iijima *et al.*, 2004), estos resultados sugieren que estos terpenoides son formados en fenómenos de bioconversión o esterificación llevados a cabo por el propio metabolismo de *S. cerevisiae*. La capacidad de *S. cerevisiae* para reducir de forma específica el geraniol a citronelol hace tiempo que se conoce (Gramatica *et al.*, 1982) y recientemente se ha demostrado que la enzima codificada por el gen *OYE2* es una pieza fundamental para que se lleve a cabo esta conversión (Yuan *et al.*, 2011; Steyer *et al.*, 2013). El linalol podría formarse por isomerización a partir del geraniol (revisado por Khor y Uzir, 2011) y aunque en *S. cerevisiae* no se ha descrito la formación de nerol a partir de geraniol esta conversión sí que aparece en *Vitis vinifera* -vid- o *Solanum lycopersicum* -tomate- (Guardiola *et al.*, 1996; Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007), y podría existir una actividad similar en la levadura que diera lugar a esta conversión; por su parte, el nerol puede isomerizarse a linalol, por lo que no se puede descartar una posible reversión de esta actividad como causa de la aparición de este compuesto. Estos resultados están además en consonancia con los obtenidos por otros grupos en los que la adición de 25 mg/L de geraniol a cultivos de *S. cerevisiae* derivó en la bioconversión de éste a otros compuestos como linalol, citronelol y α -terpineol (King y Dickinson, 2000; Gamero *et al.*, 2011), aunque con la diferencia de que este último, derivado de nerol y linalol (Khor y Uzir, 2011), no se detectó; probablemente porque las cantidades obtenidas de sus precursores son bastante limitadas (Tabla 9), o porque al tiempo ensayado (24 horas) aún no se hubiera producido la conversión. Además de estos compuestos cuya producción podría ser esperable, la aparición de los ésteres geranil y citronelil acetato, aunque en niveles moderados, sugiere que una o varias de las alcohol acetiltransferasas codificadas en el genoma de *S. cerevisiae* -*ATF1* (Fujii *et al.*, 1994); *ATF2* (Nagasawa *et al.*, 1998); *SLII* (Momoi *et al.*, 2004); *EHT1* y *EEB1* (Saerens *et al.*, 2006)- son capaces de esterificar monoterpenos, dando lugar a su forma acetilada; estudios recientes en este sentido han demostrado que la enzima *Atf1p* es participe en la acetilación

de terpenoles como el geraniol pero no así la Atf2p (Steyer *et al.*, 2013). La producción total derivada de la expresión del gen *GES*, resultado de la suma de las concentraciones de cada uno de estos compuestos, fue también comparada para establecer las relaciones definitivas entre la producción de las distintas cepas (T_{73} -4Ges - $9,21 \pm 1,56$ mg/L; ICV16 *ura3*-Ges - $4,65 \pm 0,39$ mg/L; BQS252Ges - $3,86 \pm 0,35$ mg/L) (Tabla 9), y se estableció que la cepa ICV16 *ura3*-Ges presenta una producción del 120% la de la cepa de laboratorio BQS252Ges, mientras la de la cepa T_{73} -4Ges alcanza el 240% de la producción de esta cepa, doblando la de la cepa ICV16 *ura3*-Ges. Este resultado indica que las producciones de linalol y geraniol, pese a estar en rangos muy diferentes, presentan un comportamiento muy similar respecto a la cepa hospedadora, y confirma a la cepa T_{73} -4 como la mejor candidata para la aplicación de estrategias de sobreproducción de estos compuestos. La acumulación de geraniol y derivados tampoco afectó a la capacidad de crecimiento de las respectivas cepas productoras; siendo su cinética equiparable a la observada para las cepas no productoras.

El hecho de que la expresión de la geraniol sintasa de *O. basilicum* derive en la producción de todos estos compuestos complica el análisis y la cuantificación de los posibles efectos derivados de estrategias de ingeniería metabólica, y por tanto, a pesar de mostrar niveles de producción inferiores, se decidió utilizar el gen *LIS* como prototipo para los ensayos de mejora de la producción.

Las causas por las cuales existen diferencias tan significativas en la producción por parte de las diferentes monoterpeneo sintasas expresadas no son evidentes; la estabilidad de los plásmidos (YEp195Lis y YEp195Ges) se analizó a las 32 horas de cultivo para descartar la pérdida del plásmido de expresión como fuente de esta variación y se concluyó que alrededor del 80-90% de las células viables son capaces de formar colonias en placas de medio mínimo sin uracilo independientemente del gen expresado (*LIS* o *GES*), por lo que ambos plásmidos de expresión se encuentran presentes en la práctica totalidad de las células de levadura durante la fase de producción de monoterpeneos. El hecho de que los genes *LIS* y *GES* se encuentren bajo el control de distintos promotores constitutivos ($TDH3_p$ y $ACT1_p$) podría ser, al menos en parte, causa de la diferencia existente en la producción de ambos compuestos; de alrededor de 150 veces. Sin embargo, aunque en la bibliografía no se han encontrado estudios que comparen la expresión desde ambos promotores, existen dos estudios independientes en los cuales se analiza la expresión de un gen reportero bajo su control. Los resultados de

Tabla 9. Valores de concentración absoluta y concentración relativa derivados de la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en las cepas BQS252, ICV16 *ura3⁻* y T₇₃-4 de *S. cerevisiae*.

Concentración (µg/L)	Geraniol	Linalol	Nerol	Citronelol	Geraniol acetato	Citronelil acetato	Total
BQS252Ges	3399,71 ± 341,21	3,98 ± 0,17	79,79 ± 5,87	369,51 ± 14,96	4,34 ± 0,88	4,40 ± 0,65	3861,73 ± 350,63
ICV16 <i>ura3</i> Ges	4077,08 ± 321,79	7,26 ± 1,00	87,62 ± 18,48	468,11 ± 57,96	4,77 ± 0,24	6,98 ± 0,86	4651,83 ± 385,69
T ₇₃ -4Ges	8276,88 ± 1425,53	10,56 ± 2,48	221,72 ± 43,26	671,93 ± 115,11	15,38 ± 4,59	11,53 ± 2,06	9208,00 ± 1564,86
Producción relativa (%)	Geraniol	Linalol	Nerol	Citronelol	Geraniol acetato	Citronelil acetato	Total
BQS252Ges	87,98 ± 0,88	0,10 ± 0,01	2,07 ± 0,05	9,62 ± 0,83	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	100
ICV16 <i>ura3</i> Ges	87,67 ± 0,95	0,16 ± 0,01	1,87 ± 0,31	10,04 ± 0,66	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,03	100
T ₇₃ -4Ges	89,85 ± 0,82	0,12 ± 0,03	2,41 ± 0,26	7,32 ± 0,58	0,17 ± 0,04	0,13 ± 0,03	100

Partow *et al.*, 2010 muestran que durante la fase de consumo de glucosa, en la que se producen los monoterpenos, el promotor del gen *TDH3* da lugar a una expresión equiparable a la obtenida con el promotor del gen *PGK1* y a su vez, los resultados obtenidos por Monfort *et al.*, 1999 en condiciones similares mostraron que el promotor del gen *PGK1* es más efectivo que el correspondiente al gen *ACT1*, por lo que *a priori*, en el período en el que se observa producción de monoterpenos, la expresión a partir del promotor del gen *TDH3* (que controla el gen *LIS*) sería igual o superior a la obtenida a partir del promotor del gen *ACT1* (que controla el gen *GES*), lo que sugiere que en función de la fuerza del promotor la producción de linalol debería ser mayor.

Por otra parte, la caracterización de la actividad *in vitro* de estas enzimas muestra que la linalol sintasa de *C. breweri* posee una mayor afinidad por el sustrato (GPP) que la geraniol sintasa de *O. basilicum* (K_m 0,9 μ M y 21 μ M respectivamente) y por el cofactor Mn^{2+} (K_m 45 μ M y 51 μ M respectivamente) (Pichersky *et al.*, 1995; Iijima *et al.*, 2004); lo que tampoco justificaría las diferencias observadas en el rendimiento de estas enzimas. Se analizó la frecuencia de uso de codones de las secuencias de ambos genes (*LIS* y *GES*) para tratar de averiguar si existía algún factor que pudiera favorecer una mayor actividad de la enzima geraniol sintasa frente a la linalol sintasa. La herramienta de análisis de secuencias de ADN (rare codon analysis tool – Genscript, USA) se utilizó para contrastar el coeficiente de adaptatividad (CAI) de las secuencias codificantes de la linalol y la geraniol sintasa para su expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia de 1.605 nucleótidos del gen *GES* presentó un CAI de 0,61 (en una escala de 0 a 1 donde el valor 1 corresponde a la máxima adaptatividad) y el 10% de los codones que integran su secuencia se estimaron por debajo del 30% de frecuencia de uso, por lo que se considera que pueden entorpecer o interrumpir la traducción de la proteína. Por su parte, el CAI de la secuencia codificante de la linalol sintasa, de 2.613 nucleótidos, se estimó en un valor de 0,7 y sólo el 5% de sus codones mostraron una frecuencia de uso inferior al 30% de la óptima para *S. cerevisiae*, por lo que estos análisis bioinformáticos sugieren que a nivel traduccional la secuencia codificante de la enzima linalol sintasa se encontraría mejor adaptada para su expresión en *S. cerevisiae* y no explica las diferencias observadas en la producción de los monoterpenos linalol y geraniol. Sin embargo, algunos estudios correlacionan de forma negativa la longitud de las proteínas con su tasa de traducción y vida media en *S. cerevisiae* (Arava *et al.*, 2003; Belle *et al.*, 2006), en este sentido la enzima geraniol sintasa, de 534 aminoácidos presentaría una ventaja frente a la enzima linalol sintasa conformada por 870 aminoácidos.

En cualquier caso es difícil atribuir las diferencias de producción observadas para estos monoterpenos a cualquiera de los aspectos aquí discutidos; por ello, las grandes diferencias obtenidas al expresar diferentes monoterpeno sintasas sugieren que la enzima heteróloga ejerce un papel determinante sobre los niveles de producción obtenidos en *S. cerevisiae*. En base a esto, la expresión de otras linalol sintasas o bien de versiones mejoradas de la codificada por el gen *LIS* (aplicando técnicas de ingeniería de proteínas), podría resultar en una mejora de las concentraciones de linalol obtenidas y eventualmente de otros monoterpenos al expresar y optimizar las monoterpeno sintasas correspondientes.

I.2. SELECCIÓN DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN ADECUADO PARA LA PRODUCCIÓN DE MONOTERPENOS EN *S. CEREVISIAE*

Sinopsis

Las regiones codificantes de los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum* se clonaron en diferentes plásmidos de expresión de *S. cerevisiae* bajo el control de los promotores de los genes *TDH3* y *ACT1* respectivamente. Se estableció una relación directa entre el plásmido de elección y la producción de linalol, obteniéndose 15 veces más en la cepa T₇₃*ura3-leu2* transformada con el plásmido episomal multicopia YEp195Lis_leu2d ($114,7 \pm 10,9$ µg/L) que en la cepa T₇₃-4 transformada con el plásmido integrativo YIp211Lis ($6,8 \pm 1,6$ µg/L). Además, las cepas derivadas de T₇₃-4 que expresan el gen *GES* mostraron también diferencias en la producción de geraniol en función del plásmido elegido, acumulándose cantidades menores de este monoterpeno en las cepas transformadas con el plásmido integrativo YIp211Ges respecto a las que expresan este gen desde el plásmido episomal multicopia YEp195Ges.

Antecedentes

La levadura *S. cerevisiae* es uno de los organismos modelo para la aplicación y el desarrollo de estrategias de ingeniería genética, y como consecuencia se dispone de una gran cantidad de herramientas para su manipulación, entre las que se puede encontrar una amplia batería de vectores de expresión con distintas propiedades en cuanto a su marcador de selección, origen de replicación

y/o número de copias en que se mantiene dentro de la célula. Los plásmidos integrativos (YIp) carecen de origen de replicación de levadura y se integran en el genoma; los centroméricos (YCp) contienen secuencias de replicación autónoma (ARS) y regiones centroméricas, por lo que se mantienen de forma independiente en un bajo número de copias; y los episomales (YEp) contienen el origen de replicación de un plásmido natural de *S. cerevisiae* conocido como 2μ , que mantiene al plásmido en un número de copias elevado dentro de la célula (20-40) (Futcher y Cox, 1984; Gietz y Sugino, 1988; Hill *et al.*, 1986; Parent *et al.*, 1985). Otra variable a tener en cuenta a la hora de elegir un plásmido para su utilización es el marcador de selección utilizado; algunos de ellos complementan las carencias nutricionales o auxotrofías de las cepas transformadas, y existen versiones modificadas que requieren estar presentes en un mayor número de copias para poder complementar, como en el caso del marcador *LEU2-d* (Erhart y Hollenberg, 1983; Romanos *et al.*, 1992) que carece de la mayor parte de la secuencia promotora del gen *LEU2*, o el alelo *URA3-d* que complementa débilmente las mutaciones en el gen *URA3*, obligando a la célula a mantener el plásmido en un número de copias muy elevado (50-150) para sobrevivir en ausencia de leucina y uracilo respectivamente (Faulkner *et al.*, 1994; Loison *et al.*, 1989). Como consecuencia de ello, el número de copias de un transgen introducido en la levadura, en este caso de un gen que en plantas codifica una monoterpene sintasa, dependerá en gran medida del plásmido de elección.

Algunos estudios desarrollados en *Aspergillus nidulans*, donde el incremento del número de copias del gen *lacZ* de *E. coli* no dio lugar a un incremento de la actividad β -galactosidasa (Lubertozzi y Keasling, 2006), y otros realizados en algunas especies del género *Kluyveromyces* (Rocha *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011) demostraron que la expresión o actividad de una enzima no tiene por qué ser siempre directamente proporcional al número de copias del gen que la codifica. Sin embargo, en *S. cerevisiae* sí que se ha mostrado un incremento de la actividad al expresar la β -galactosidasa o la β -glucuronidasa de *E. coli* desde plásmidos episomales multicopia con origen de replicación de 2μ (Mumberg *et al.*, 1995; Nacken *et al.*, 1996). La importancia de la dosis génica en la producción de terpenoides ha sido además comprobada con anterioridad en la producción del sesquiterpene amorfadieno, para el que también se ha demostrado que se obtiene un mayor rendimiento cuando se expresa el gen que codifica la enzima amorfadieno sintasa de *Artemisia annua* desde plásmidos episomales multicopia que cuando éste se integra en el genoma de la levadura, y que la selección mediante el marcador *LEU2-d* es capaz de incrementar aún más tanto la producción de amorfadieno como la de ácido artemisínico, ambos intermediarios en la síntesis de la droga antimalaria artemisina (Lindahl *et al.*, 2006; Ro *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, parece evidente que el aumento del número de copias de los genes que codifican monoterpeno sintasas proporcionaría mayores posibilidades de obtener un incremento de la producción de monoterpenos. No obstante, es difícil predecir el papel que puede tener el vector de expresión ya que existen una serie de factores, como pueden ser la toxicidad del compuesto producido, la eficiencia de la traducción, el plegamiento o la actividad de la enzima heteróloga, que pueden limitar o anular el efecto positivo de la dosis génica (Gasser *et al.*, 2008; Mattanovich *et al.*, 2004); e incluso en el supuesto de que todos estos procesos funcionen correctamente, la producción de monoterpenos todavía podría verse limitada por la disponibilidad del precursor o de los cofactores necesarios para la reacción de síntesis.

Pese a las posibles complicaciones, todo apunta a que los plásmidos episomales multicopia son la mejor opción para sobreproducir terpenoides, pero estos plásmidos presentan cierta inestabilidad en ausencia de presión selectiva (Futcher y Cox, 1984). Esto podría suponer un obstáculo para su aplicación a gran escala dada la naturaleza de los sustratos, generalmente procedentes de fuentes naturales, y el elevado coste que supondría mantener la presión selectiva a este nivel. Por ello, la estabilidad del plásmido, y por tanto del transgen, en la célula de levadura es un factor a tener en cuenta a la hora de diseñar estrategias de producción de metabolitos, y en algunos casos como el de la expresión del gen *XYL1* de *Pichia stipitis* en *S. cerevisiae*, las cepas que expresaban este gen desde un plásmido integrativo presentaban una productividad en cultivo continuo 1,7 veces superior a la obtenida con las cepas que lo expresaban desde un plásmido episomal (Chung *et al.*, 2002), lo que implica que una mayor estabilidad plasmídica puede dar lugar a un incremento de la producción a lo largo del proceso de fermentación.

Hasta ahora todos los estudios en los que se han expresado monoterpeno sintasas de plantas en *S. cerevisiae* se han realizado utilizando plásmidos episomales con origen de replicación de 2μ (Oswald *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2010; Ignea *et al.*, 2011), pero no hay estudios respecto a la repercusión que pueda tener la elección del vector de expresión sobre la producción final de estos compuestos y por ello se consideró que, una vez seleccionada la cepa T₇₃-4 como la mejor hospedadora para la sobreproducción de monoterpenos, establecer el plásmido adecuado sería un paso conveniente previo a la manipulación genética de la ruta de biosíntesis para la sobreproducción. Además, definir la capacidad de la cepa T₇₃-4 para producir monoterpenos desde un plásmido integrativo podría ser de interés antes de abordar la construcción de cepas GRAS (Generally Recognized As Safe) con potencial para ser aplicadas en procesos de vinificación industrial.

Por todo ello, y con la intención de seleccionar un vector de expresión adecuado para la sobreproducción de monoterpenos, las regiones codificantes

de los genes *LIS* y *GES*, que en *C. breweri* y *O. basilicum* codifican S-linalol sintasa y geraniol sintasa respectivamente, se expresaron tanto desde el plásmido integrativo YIplac211, como desde los plásmidos episomales YEplac195 y YEp195leu2d, este último modificado para incrementar el número de copias en las cepas W303-1A y T₇₃ *ura3-leu2*, y la cantidad de linalol y geraniol se comparó tras 24 horas de cultivo en medio líquido YPD.

1.2.1. Construcción de una batería de plásmidos para la expresión de los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum* en *S. cerevisiae*

Para la expresión de los genes *LIS* y *GES* en *S. cerevisiae* se utilizaron los vectores YEplac195 y YIplac211 (Gietz y Sugino, 1988), derivados de pUC19 y pBR322, ambos portadores del gen *URA3* para complementar la auxotrofia para uracilo de las cepas *ura3⁻*. El fragmento de 3,8 kb que contiene el casete de expresión *TDH3_p::LIS::PGK1_t*, obtenido por restricción con las enzimas *Pst*I y *Nae*I a partir del plásmido pG1-LIS (Herrero *et al.*, 2008) se clonó en el plásmido YIplac211 previamente digerido con *Pst*I y *Sma*I, obteniendo así el plásmido integrativo YIp211Lis (Figura 11). Por su parte, el casete de expresión *ACT1_p::GES::HIS3_t* se aisló del plásmido YEp181Ges como un fragmento de restricción *Eco*RI de 2,8 kb que se subclonó en el plásmido YIplac211 previamente linearizado con *Eco*RI, generándose así el plásmido YIp211Ges (Figura 11). Por su parte, los plásmidos episomales YEp195Lis y YEp195Ges (2 μ ; *URA3*) se habían construido con anterioridad (apartado I.1.1. de Resultados y Discusión - Figura 6).

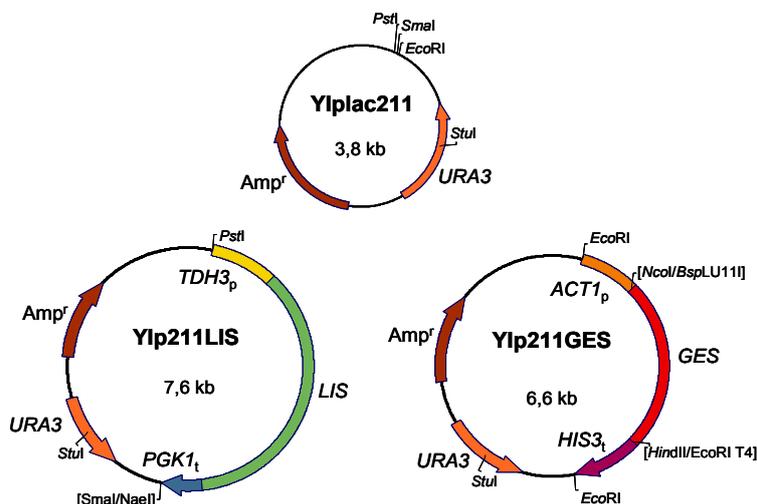


Figura 11. Plásmidos integrativos generados para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que expresen los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

El plásmido YEp195Lis fue además modificado para incrementar el número de copias en que se mantiene dentro de la célula. Para ello el fragmento de 1,6 kb correspondiente al marcador *LEU2-d* se aisló del plásmido pAA8 (Adam *et al.*, 1995) por restricción con las enzimas *Hind*III y *Sma*I, se trató con la polimerasa de ADN del bacteriófago T4 y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. El fragmento purificado se subclonó en el vector YEp195Lis previamente digerido con la enzima *Sst*I y tratado con la ADN polimerasa del bacteriófago T4, generándose así el plásmido YEp195Lis_1eu2d (2μ ; *URA3*; *LEU2-d*) (Figura 12). Un fragmento *Pst*I/*Sma*I de 1,6 kb correspondiente al marcador *LEU2-d* se aisló del plásmido pAA8 y se ligó en el plásmido YEplac195 previamente digerido con las mismas enzimas para construir el plásmido YEp195leu2d (Figura 12).

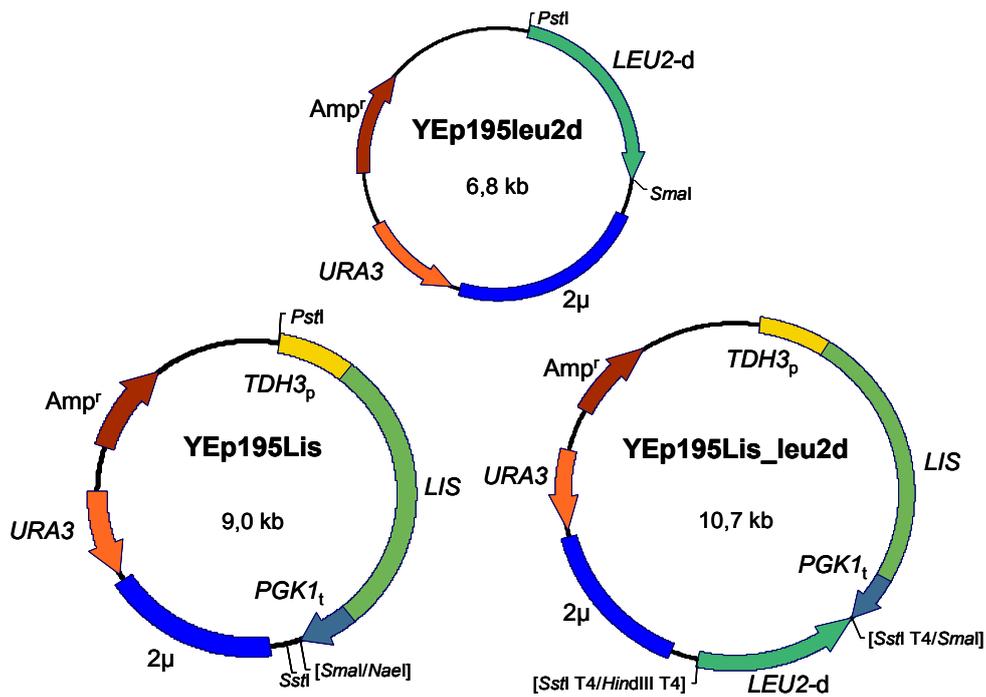


Figura 12. Plásmidos episomales para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que expresen el gen *LIS* de *C. breweri*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

1.2.2. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* que expresan el gen *LIS* de *C. breweri* y el gen *GES* de *O. basilicum* desde distintos plásmidos de expresión

La cepa vínica T₇₃-4 se transformó con los plásmidos YIp211Lis y YIp211Ges linearizados con la enzima de restricción *StuI* con el fin de obtener cepas de *S. cerevisiae* con los genes *LIS* de *C. breweri* y *GES* de *O. basilicum* integrados en el locus *URA3*. Las cepas YR390 e YR391 (T₇₃-4 YIp211Lis) se aislaron en medio SD sin uracilo y la integración del plásmido en el locus *URA3* se comprobó por PCR con las parejas de oligonucleótidos ExtURAdir/YIp211rev y ExtURAreV/YIpLIS, que en las cepas transformantes amplifican regiones de 1,2 kb correspondiente al extremo 5' y 2,8 kb correspondiente al extremo 3' respectivamente. Las cepas YR393, YR394 e YR395 (T₇₃-4 YIp211Ges) se aislaron del mismo modo y la correcta integración del plásmido se comprobó con las parejas de oligonucleótidos ExtURAdir/YIp211rev y ExtURAreV/YIpGES que en las cepas transformantes amplifican regiones de 1,2 kb correspondiente al extremo 5' y 2,9 kb correspondiente al extremo 3' respectivamente. El plásmido control YIplac211 linearizado con *StuI* se integró en la cepa T₇₃-4 y se aisló el transformante YR388, que se comprobó genéticamente con las parejas de oligonucleótidos ExtURAdir/YIp211rev y ExtURAreV/YIp211dir que en las cepas transformantes amplifican regiones correspondientes a los extremos 5' y 3' de la inserción, de 1,2 y 1,7 kb respectivamente (Figura 13). Las cepas derivadas de T₇₃-4 que expresan las monoterpene sintasas *GES* (YR377 e YR378) y *LIS* (YR162 e YR154) desde plásmidos episomales multicopia se generaron en el apartado I.1.2.

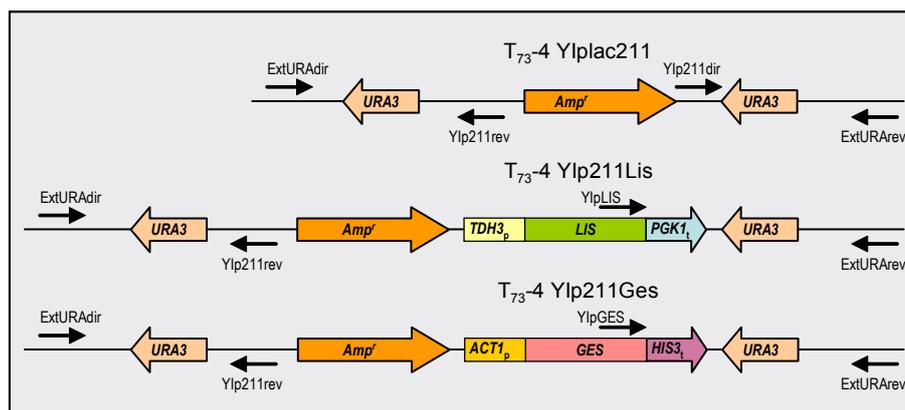


Figura 13. Esquema de las integraciones plasmídicas en el locus *URA3* de la cepa T₇₃-4 de *S. cerevisiae*. Los oligonucleótidos utilizados para la comprobación genética de las cepas transformantes aparecen señalados.

Las cepas W303-1A y T_{73} *ura3-leu2* se escogieron por ser auxótrofas para uracilo y leucina (*ura3⁻; leu2⁻*) para ser transformadas con los plásmidos YEp195leu2d y YEp195Lis_leu2d, generándose así las cepas YR420 (W303-1A YEp195leu2d); YR275 e YR279 (W303-1A YEp195Lis_leu2d); YR480 (T_{73} -4 YEp195leu2d); YR484 e YR485 (T_{73} -4 YEp195Lis_leu2d), seleccionadas en medio carente de uracilo para favorecer la recuperación de los transformantes y mantenidas en ausencia de uracilo y leucina para forzar el incremento del número de copias del plásmido. Para confirmar que la transformación había sido llevada a cabo con éxito, se recuperaron los plásmidos de las cepas de levadura generadas y tras el análisis por restricción con *HindIII*, *SpeI*, *SmaI* (YEp195Ges), *PciI* (YEp195leu2d) y *EcoRI* (YEp195Lis_leu2d) se constató la ausencia de grandes reorganizaciones y se procedió a su análisis fenotípico.

1.2.3. Producción de monoterpenos de la cepa vínica T_{73} -4 con los genes LIS de *C. breweri* y GES de *O. basilicum* integrados en el locus URA3

La integración en el genoma de la levadura permitiría tanto la mejora de la estabilidad del ADN introducido como la construcción de cepas transformadas de forma GRAS para su aplicación en procesos biotecnológicos como la producción de vino. Por ello, para comprobar si sería posible obtener cantidades relevantes de monoterpenos con sólo una copia del casete de expresión de la monoterpeno sintasa integrada en el genoma de *S. cerevisiae*, la capacidad de los transformantes YR390 e YR391 (T_{73} -4 transformada con YIp211Lis) para producir linalol se comparó con la de la cepa YR154 (T_{73} -4 transformada con YEp195Lis). La producción de linalol en medio YPD de las cepas YR390 e YR391 (media $6,8 \pm 1,6$ $\mu\text{g/L}$) portadoras del plásmido YIp211Lis integrado en el locus *URA3* fue 10 veces inferior a la obtenida con la cepa control YR154, transformada con el plásmido episomal multicopia YEp195Lis ($63,6 \pm 6,4$ $\mu\text{g/L}$) (Figura 14A); lo que, teniendo en cuenta el umbral de percepción del linalol (Tabla 5) y la disminución (3 veces) en la producción de linalol descrita previamente en procesos de microvinificación frente a condiciones de laboratorio (Herrero *et al.*, 2008), dejaría la expresión del gen *LIS* sin impacto perceptible sobre el aroma del vino. Por tanto, para confirmar estos resultados y pensando en una posible aplicación enológica se decidió realizar un estudio similar utilizando el gen *GES* de *O. basilicum*; dado que la cepa T_{73} -4 había alcanzado una producción de monoterpenos en medio líquido YPD superior a los 9 mg/L cuando expresaba dicho gen desde el plásmido episomal YEp195Ges (Tabla 9), y por tanto, aún produciéndose un descenso

en la producción, podrían llegar a alcanzarse cantidades de geraniol por encima de su umbral de percepción (Tabla 5). Los transformantes protótrofos para uracilo YR377 e YR378 (T_{73} -4 transformada con YEp195Ges), YR393, YR394 e YR395 (T_{73} -4 transformada con YIp211Ges) fueron cultivados en medio líquido YPD y la producción de geraniol y derivados fue comparada a las 24 y 32 horas. Al igual que sucedió con las cepas productoras de linalol, la producción de las cepas portadoras del plásmido integrativo YIp211Ges (YR393 $1,35 \pm 0,07$ mg/L; YR394 $0,48 \pm 0,08$ mg/L; YR395 $4,12 \pm 1,24$ mg/L) fue inferior a la obtenida con las cepas portadoras del plásmido episomal YEp195Ges (YR377 $8,45 \pm 1,61$ mg/L; YR378 $8,60 \pm 2,51$ mg/L) (Figura 14B). Los resultados obtenidos confirmaron la reducción de la producción de la cepa T_{73} -4 cuando el casete de expresión de la monoterpene sintasa es integrado en un bajo número de copias en su genoma; pero los valores de geraniol obtenidos continuaron siendo muy superiores a los de linalol, no sólo a los alcanzados al integrar el gen *LIS*, sino también a los obtenidos con el plásmido episomal YEp195Lis. Por ello, se puede considerar a la geraniol sintasa de *O. basilicum* como una buena candidata para la obtención de cepas consideradas GRAS para la producción de monoterpenos *de novo* en procesos de vinificación. La variabilidad observada en la producción de geraniol de las cepas transformadas con el plásmido YIp211Ges podría deberse a eventos de recombinación múltiple en tándem, cuya aparición no es inusual al transformar *S. cerevisiae* por recombinación homóloga con fragmentos lineales de ADN (Orr-Weaver y Szostak, 1983), lo cual sugeriría que en estas condiciones la expresión de la geraniol sintasa es bastante sensible al número de copias integradas en el genoma de la levadura T_{73} -4.

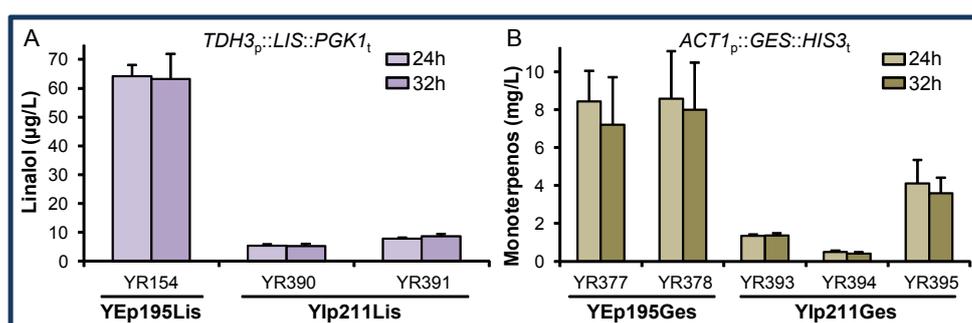


Figura 14. Producción de monoterpenos en la cepa T_{73} -4 de *S. cerevisiae*. (A) Producción de linalol en cepas transformadas con los plásmidos YEp195Lis y YIp211Lis. (B) Producción de monoterpenoides totales en cepas transformadas con los plásmidos YEp195Ges y YIp211Ges. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados. Los resultados presentados son la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La producción relativa de volátiles derivados de la producción *de novo* de geraniol (linalol, nerol, citronelol, geranil acetato y citronelil acetato), mostró un patrón similar independientemente del plásmido utilizado y de las concentraciones absolutas de geraniol (Tabla 10). Además, los sobrenadantes de los cultivos realizados con el transformante YR388 (T₇₃-4 transformada con YIplac211) se analizaron para descartar la producción basal de alguno de estos compuestos y, tal como se esperaba, no se hallaron concentraciones detectables de monoterpenos.

Todos los transformantes alcanzaron valores similares de DO₆₀₀ y sus tasas de crecimiento fueron idénticas, lo cual indica que no existen efectos adversos al crecimiento de la levadura debidos a la producción de estos metabolitos ni a la integración de los plásmidos en el genoma de la levadura. La estabilidad de los plásmidos fue evaluada a las 32 horas de cultivo en medio completo (cuando la producción de monoterpenos se ha estabilizado en torno a su valor máximo) y alrededor del 90% de las células de levadura viables (unidades formadoras de colonias en medio sólido YPD) fueron capaces de formar también colonias en placas de medio mínimo SD sin uracilo tras 48 horas de incubación a 30°C, independientemente del plásmido utilizado para su transformación. Estos resultados demuestran que la integración de los genes que codifican monoterpeno sintasas es una estrategia viable para la producción de monoterpenos en levadura, pero el limitado número de copias integradas supone una reducción significativa en la capacidad de producción de los mismos, que en casos como el de la expresión del gen *LIS* de *C. breweri* puede carecer de utilidad por los bajos niveles de producción obtenidos. Por ello, se consideró que los plásmidos episomales de 2 μ se adecuaban mejor a la sobreproducción de monoterpenos en *S. cerevisiae*.

1.2.4. Producción de linalol en la cepa de laboratorio W303-1A con el número de copias del gen LIS incrementado por complementación con el marcador LEU2-d

Los resultados obtenidos al comparar la producción de monoterpenos obtenida con plásmidos integrativos y episomales sugieren que el número de copias del gen heterólogo influye notablemente en la capacidad de la levadura para producir monoterpenos. Sin embargo, todavía no sabemos si los plásmidos episomales con origen de replicación de 2 μ son la mejor opción para expresar monoterpeno sintasas de plantas en *S. cerevisiae*. Por ello, el marcador de selección *LEU2-d*, que según la bibliografía es capaz de incrementar el número de copias del plásmido a 50-150 copias por célula (Erhart y Hollenberg, 1983), se clonó en el plásmido YEp195Lis generándose

Tabla 10. Valores de producción de monoterpenos en las cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T₇₃-4 que sobreexpresan el gen *GES* de *O. basilicum* desde los plásmidos YEp195Ges y YIp211Ges.

Concentración (µg/L)	Geraniol	Linalol	Nerol	Citronelol	Geraniol acetato	Citronelli acetato	Total
YR377	7550,08 ± 1436,40	9,65 ± 1,60	218,79 ± 47,54	647,17 ± 149,29	13,55 ± 2,29	8,92 ± 1,70	8449,82 ± 1609,48
YR378	7697,06 ± 2342,84	8,89 ± 1,49	214,93 ± 47,44	656,65 ± 114,84	15,56 ± 6,23	12,39 ± 2,32	8603,85 ± 2509,18
YR393	1139,59 ± 60,02	2,37 ± 0,03	51,10 ± 3,29	157,56 ± 12,07	1,93 ± 0,08	1,69 ± 0,09	1354,25 ± 72,82
YR394	407,87 ± 81,58	1,27 ± 0,50	18,72 ± 1,77	52,61 ± 5,38	0,72 ± 0,21	0,51 ± 0,09	481,79 ± 86,40
YR395	3581,00 ± 1129,76	4,21 ± 0,68	124,89 ± 27,43	400,19 ± 87,30	6,13 ± 3,22	5,93 ± 1,80	4121,58 ± 1241,36
Producción relativa (%)	Geraniol	Linalol	Nerol	Citronelol	Geraniol acetato	Citronelli acetato	Total
YEp195Ges	89,40 ± 0,08	0,11 ± 0,01	2,54 ± 0,06	7,64 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,03	100
YIp211Ges	85,23 ± 1,45	0,18 ± 0,08	3,56 ± 0,46	10,75 ± 0,97	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,02	100

Los datos mostrados corresponden a la producción absoluta y la producción relativa para cada compuesto a las 24 horas de cultivo.

así el plásmido YEp195Lis_leu2d. La cepa de laboratorio W303-1A, auxótrofa para uracilo y leucina se transformó con este plásmido y los transformantes YR275 e YR279 se aislaron en medio mínimo selectivo.

La producción de linalol de estos transformantes se comparó con la obtenida en las cepas YR270 e YR272 (YEp195Lis – media $11,09 \pm 2,31 \mu\text{g/L}$), observándose cantidades 3 veces superiores en las cepas transformadas con el plásmido YEp195Lis_leu2d (media $34,78 \pm 6,14 \mu\text{g/L}$); no se hallaron cantidades detectables de linalol en los sobrenadantes de los cultivos realizados con la cepa control YR420 (YEp195leu2d). Las cepas YR275 e YR279 transformadas con el plásmido YEp195Lis_leu2d crecen más despacio y alcanzan valores de densidad óptica inferiores (~30%) que los de las cepas transformadas con el plásmido YEp195Lis (Figura 15A); por lo que, al normalizar los valores de producción por la densidad óptica, el rendimiento en linalol de las cepas portadoras del plásmido YEp195Lis_leu2d alcanzó valores 5 veces superiores a los de las cepas transformadas con el plásmido YEp195Lis ($7,20 \pm 1,14 \mu\text{g/L}\cdot\text{DO}_{600}$ y $1,52 \pm 0,43 \mu\text{g/L}\cdot\text{DO}_{600}$ respectivamente a las 24 horas de cultivo) (Figura 15B).

Estos resultados sugieren que el elevado número de copias del plásmido podría estar afectando a la capacidad de la levadura para dividirse. También podría ser que la monoterpene sintasa esté limitando la síntesis de esteroides al competir por un intermediario de la ruta de síntesis de ergosterol o que el defecto en el crecimiento se deba a una combinación de estos y otros factores no controlados. En cualquier caso resulta evidente que el incremento del número de copias de los genes que codifican monoterpene sintasas permite un mejor aprovechamiento del GPP disponible en la levadura.

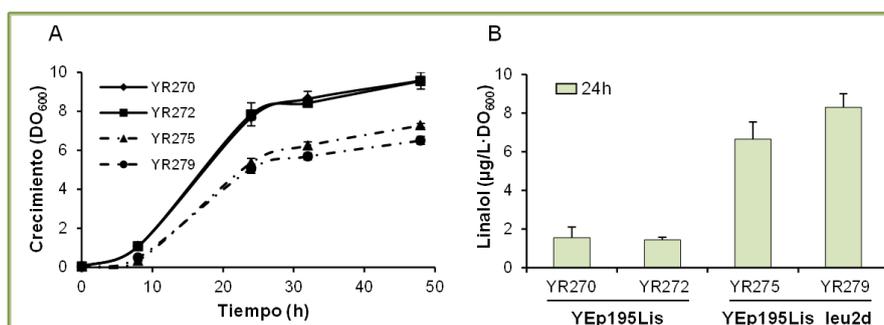


Figura 15. Producción de monoterpenos en la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_leu2d. (A) Curvas de crecimiento de las cepas YR270 e YR272 (YEp195Lis - línea continua) y las cepas YR275 e YR279 (YEp195Lis_leu2d - línea discontinua). Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol. (B) Rendimiento de la producción de linalol de las cepas ensayadas en el panel A a las 24 horas de cultivo. Los resultados presentados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

1.2.5. Producción de linalol en cepas derivadas de T₇₃ con el número de copias del gen LIS incrementado por complementación con el marcador LEU2-d

La levadura vínica T₇₃ resultó ser la mejor hospedadora para la producción de monoterpenos (Figura 7), por eso se decidió estudiar si la mejora obtenida al complementar la auxotrofia para leucina con el marcador *LEU2-d* en la cepa W303-1A se produce también en esta cepa vínica. Para ello, la cepa T₇₃ *ura3-leu2* se transformó con el plásmido YEp195Lis_ *leu2d*. La producción de linalol de los transformantes YR484 e YR485 ($112,17 \pm 10,75 \mu\text{g/L}$ y $119,88 \pm 10,21 \mu\text{g/L}$) se comparó con la de los transformantes YR154 (YEp195Lis - $62,23 \pm 4,33 \mu\text{g/L}$), YR390 e YR391 (YIp211Lis - $5,34 \pm 0,56 \mu\text{g/L}$ y $8,26 \pm 0,65 \mu\text{g/L}$) (Figura 16A). Se observó un incremento significativo de la cantidad de linalol producida conforme se incrementaba la dosis del gen codificante de la linalol sintasa, las cepas complementadas con el marcador *LEU2-d* mostraron una producción 2 veces mayor que la obtenida con las cepas portadoras del plásmido episomal YEp195Lis, y 20 veces mayor a la obtenida con el plásmido integrativo YIp211Lis; la cepa control YR480 (YEp195leu2d) no fue capaz de producir linalol en los ensayos realizados, confirmando que el incremento observado en la concentración de este compuesto deriva específicamente del aumento del número de copias del gen *LIS* provocado por la complementación con el alelo *LEU2-d*.

Tal y como se ha descrito para la cepa de laboratorio W303-1A, los transformantes de la cepa T₇₃ *ura3-leu2* portadores del plásmido YEp195Lis_ *leu2d* mostraron una capacidad de crecimiento reducida (Figura 16B), aunque en este caso los valores de densidad óptica a las 24 horas estuvieron únicamente un 10% por debajo del crecimiento normal, por lo que al normalizar la producción por estos valores de crecimiento, la mejora en el rendimiento de las cepas transformadas con el plásmido YEp195Lis_ *leu2d* ($8,45 \pm 0,86 \mu\text{g/L} \cdot \text{DO}_{600}$) fue muy similar a la establecida para la producción absoluta, situándose en torno al doble del obtenido con YEp195Lis ($4,14 \pm 0,23 \mu\text{g/L} \cdot \text{DO}_{600}$) y unas 20 veces superior al de las cepas con el plásmido YIp211Lis integrado en el locus *URA3* ($0,46 \pm 0,10 \mu\text{g/L} \cdot \text{DO}_{600}$).

Este resultado confirma el hecho de que la complementación con un marcador de selección débil, y como consecuencia el incremento del número de copias que ello conlleva, es una buena estrategia para sobreproducir monoterpenos en *S. cerevisiae*. Aunque el incremento observado en la cepa T₇₃ es inferior al observado para la cepa de laboratorio W303-1A, éste sigue siendo cuantioso y la cepa vínica ha mostrado además una mejor adaptación a la complementación con el alelo *LEU2-d*.

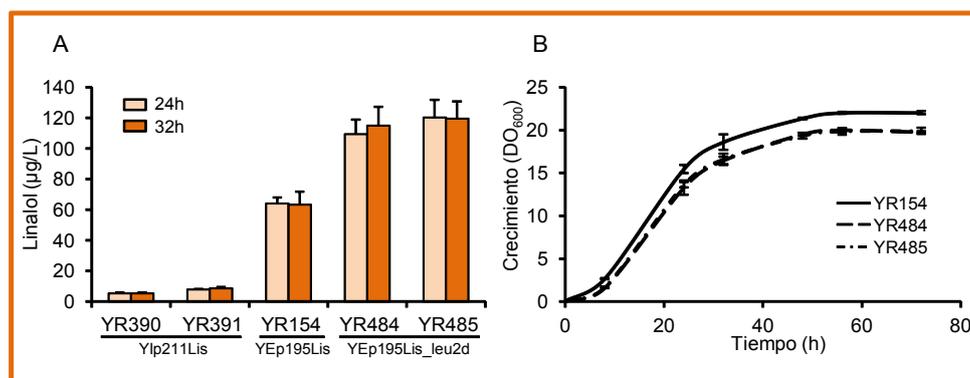


Figura 16. Producción de monoterpenos en cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T_{73} portadoras de los plásmidos YIp211Lis, YEp195Lis y YEp195Lis_leu2d. (A) Diagrama de la producción de linalol en las cepas que expresan el gen *LIS* desde diferentes plásmidos. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados. Los resultados presentados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Curvas de crecimiento de las cepas T_{73} -4 y T_{73} *ura3-leu2* transformada con los plásmidos YEp195Lis (línea continua) y YEp195Lis_leu2d (línea discontinua) respectivamente. Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol.

Teniendo en cuenta los resultados aquí presentados se puede decir que existe una relación entre la producción heteróloga de monoterpenos en *S. cerevisiae* y el plásmido seleccionado para la expresión de la monoterpeno sintasa de interés. Estos resultados están además en consonancia con los citados anteriormente para las actividades β -galactosidasa y β -glucuronidasa (Mumberg *et al.*, 1995; Nacken *et al.*, 1996) y para la producción del sesquiterpeno amorfadieno y el ácido artemisinico (Lindahl *et al.*, 2006; Ro *et al.*, 2008). El hecho de que los resultados obtenidos hayan seguido el mismo patrón independientemente de la cepa, monoterpeno sintasa o promotor refuerza la idea de que el plásmido de expresión es un factor a tener en cuenta a la hora de diseñar estrategias para la sobreproducción de monoterpenos en levadura. Los plásmidos episomales (2μ ; *URA3*) fueron seleccionados como modelo para el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica porque mostraron ser los más completos a la hora de alcanzar un compromiso entre los niveles de producción de monoterpenos y el correcto desarrollo de las funciones celulares. Esto no significa que, de cara a una posible aplicación industrial, no exista la posibilidad de generar cepas GRAS por integración simple en el caso de monoterpeno sintasas cuya producción sea suficiente como la geraniol sintasa de *O. basilicum*, y deja abierta la opción de generar cepas GRAS mediante integraciones múltiples en las secuencias repetitivas de

ADN ribosomal, pudiendo utilizarse además un marcador de complementación débil para asegurar un elevado número de copias (Lopes *et al.*, 1989; Nieto *et al.*, 1999) de aquellas monoterpeno sintasas cuya producción se encuentre comprometida como en el caso de la linalol sintasa de *C. breweri*.

II. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MONOTERPENOS MEDIANTE TÉCNICAS DE INGENIERÍA METABÓLICA

II.1. Sobreexpresión de la región catalítica de la enzima Hmg1p

Sinopsis

La sobreexpresión desregulada de una versión truncada del gen *HMG1* de *S. cerevisiae*, que codifica la región catalítica de la enzima Hmg1p (3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa), se utilizó para incrementar el flujo a través de la ruta MVA en cepas que expresan el gen *LIS* de *C. breweri*. Tanto en la cepa de laboratorio BQS252Lis como en la cepa vínica T₇₃-4Lis se consiguió incrementar la cantidad de linalol producida (1,5 y 2 veces respectivamente) en comparación con las cantidades obtenidas en los ensayos realizados con sus correspondientes cepas control.

Antecedentes

El principal punto de control de la ruta MVA en muchos organismos, entre los que se incluyen las levaduras, es la formación del ácido mevalónico (MVA) a partir del HMG-CoA (Figura 2). En *S. cerevisiae*, esta reacción está catalizada por las enzimas Hmg1p y Hmg2p (Hampton *et al.*, 1996; Maury *et al.*, 2005), codificadas por los genes *HMG1* y *HMG2* respectivamente (Basson *et al.*, 1986; Basson *et al.*, 1988). Cada una de las dos enzimas puede sustituir a la otra (Basson *et al.*, 1986) y la proteína Hmg1p es más estable (Hampton y Rine, 1994; Hampton *et al.*, 1996). Para equilibrar la producción de isoprenoides de acuerdo con las necesidades celulares, la expresión y actividad celular de estas enzimas está regulada a varios niveles que incluyen transcripcional, traduccional y postraduccional (revisado en Hampton *et al.*, 1996; Panda y Devi, 2004), que de manera coordinada modulan sus tasas de síntesis y degradación. Así por ejemplo, cuando se reduce el flujo de la ruta, la actividad HMGR se ve incrementada y viceversa. Las HMGR de levaduras, al igual que las del resto de eucariotas, poseen dos dominios estructurales (Liscum *et al.*, 1985): una región catalítica en el extremo C-terminal conectada por un 'linker' a la región N-terminal, que es la encargada de anclar la enzima al retículo endoplásmico a través de varios dominios transmembrana localizados entre los aminoácidos 1-523 en Hmg1p

y 1-522 en Hmg2p (Basson *et al.*, 1988; Wright *et al.*, 1988; Sengstag *et al.*, 1990). Estos dominios transmembrana no se requieren para la catálisis, pero son necesarios para la degradación de la enzima (Nakanishi *et al.*, 1988; Hampton y Rine, 1994; Gardner *et al.*, 1998). La expresión del gen *HMGI* se induce durante el crecimiento aeróbico mediante el factor de transcripción Hap1p dando lugar a un incremento de la actividad HMGR (Hampton *et al.*, 1996). Además, la síntesis de la proteína Hmg1p está retroinhibida a nivel postranscripcional por el mevalonato y/o sus derivados, siendo para ello necesaria la presencia de una secuencia no codificante en la región promotora del gen *HMGI* (Dimster-Denk *et al.*, 1994; Burg y Espenshade, 2011); las células que se mantienen en medio pobre en mevalonato acumulan la enzima Hmg1p sin que se aprecien alteraciones en la cantidad de transcrito, aumentando en consecuencia la actividad HMGR (Dimster-Denk *et al.*, 1994). En cuanto a la regulación postraduccional de la actividad HMGR, la isoenzima Hmg2p es rápidamente marcada para su degradación cuando se acumulan derivados del ácido mevalónico, mientras que la enzima Hmg1p es mucho más estable (Hampton y Rine, 1994).

Además, la sobreexpresión de la forma silvestre de Hmg1p estimula la formación de agregados de membrana alrededor del núcleo celular llamados 'karmellae' (Wright *et al.*, 1988), que influyen negativamente en el crecimiento de la levadura. Por otra parte, la sobreexpresión de un alelo modificado del gen *HMGI* ($_{cat}hmg1$, que codifica el dominio catalítico de la isoenzima HMG-CoA reductasa 1 o $_{cat}Hmg1p$ a partir del aminoácido Asp531) se ha empleado con éxito en *S. cerevisiae* para incrementar el flujo de la ruta MVA y mejorar así la producción de escualeno (intermediario de la ruta de síntesis de ergosterol) y amorfadieno (sesquiterpeno precursor de la droga antimalaria artemisina) (Donald *et al.*, 1997; Polakowski *et al.*, 1998; Ro *et al.*, 2006), y también para mejorar la producción de carotenos en *Candida utilis* y *Neurospora crassa* (Shimada *et al.*, 1998; Wang, 2002). Sin embargo, estos resultados no garantizan que la coexpresión del alelo $_{cat}hmg1$ y de los genes que codifican monoterpene sintasas derive en la mejora de la producción de monoterpenos, puesto que la sobreexpresión de dicho alelo ha resultado ser ineficaz en estrategias de mejora de cepas productoras del sesquiterpeno epi-cedrol (Jackson *et al.*, 2003) y del triterpeno β -amirina (Kirby *et al.*, 2008). Además, algunas estrategias que resultaron eficaces en cepas de laboratorio han fallado al ser aplicadas en cepas industriales (Donalies *et al.*, 2008). Si consideramos esto, junto con el hecho de que el GPP en la levadura es un intermediario transitorio de la reacción secuencial catalizada por la enzima FPPS, es difícil predecir si la sobreexpresión de

una forma desregulada de la enzima Hmg1p sería capaz de aumentar la disponibilidad de GPP en *S. cerevisiae* y como consecuencia la producción de monoterpenos.

Por todo ello, y con objeto de mejorar la capacidad de *S. cerevisiae* para producir monoterpenos, se estudió la influencia de la síntesis de mevalonato en la capacidad productora de las cepas de laboratorio BQS252 y vínica T₇₃-4. Para estos estudios se seleccionó la S-linalol sintasa de *C. breweri* como prototipo de monoterpeno sintasa. Para evitar tanto la regulación transcripcional y postranscripcional como la formación de ‘*karmellae*’, se expresó una forma de la enzima Hmg1p -que trunca los 530 aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal de la proteína- bajo el control del promotor del gen *PGK1*; el terminador del gen *CYC1* se seleccionó para determinar el fin de la transcripción.

II.1.1. Construcción de plásmidos para la coexpresión del alelo *cat*_{hmg1} y el gen *LIS* de *C. breweri* en *S. cerevisiae*

Para conseguir desregular el gen *HMG1* y evitar posibles fenómenos de recombinación entre secuencias repetidas en tándem (secuencias promotoras o terminadoras), que pudieran ocasionar la excisión de secuencias de interés (Romanos *et al.*, 1992), el alelo *cat*_{hmg1} (codifica una proteína soluble con un codón de inicio artificial previo al residuo Asp531 de la enzima silvestre Hmg1p) se clonó bajo el control del promotor de expresión fuerte y constitutiva del gen *PGK1* (codifica 3-fosfoglicerato kinasa en *S. cerevisiae*) y el terminador del gen *CYC1* (codifica citocromo C en *S. cerevisiae*). Las tres secuencias de ADN se amplificaron por PCR con las parejas de oligonucleótidos tHMGR-ATG/tHMGR-STOP; PGK1p-upper/PGK1p-lower y CYC1t-upper/CYC1t-lower respectivamente (Tabla 8), utilizando como molde ADN genómico de la cepa de *S. cerevisiae* FY1679 (derivada de la cepa de referencia S288C) y se subclonaron independientemente en el plásmido pGEM-T Easy. Tras comprobar su secuencia utilizando como cebadores los oligonucleótidos UNI, REV y HMG-seq (Tabla 8), el fragmento de 1,6 kb correspondiente al alelo *cat*_{hmg1} se aisló por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I; el fragmento de 1,5 kb correspondiente al promotor *PGK1*_p se obtuvo con las enzimas *Nco*I y *Sal*I, y ambos fragmentos de ADN se ligaron en el plásmido YEplac195 previamente digerido con *Bam*HI y *Sal*I, dando lugar al plásmido intermedio YEplac195PGK_Hmg. El casete de expresión *PGK1*_p::*cat*_{hmg1}::*CYC1*_t se completó ligando el fragmento de 0,3 kb del

terminador $CYC1_t$ obtenido tras la digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI en el plásmido YEp195PGK_Hmg previamente digerido con estas mismas enzimas. Se obtuvo así el plásmido YEp195Hmg (Figura 17).

El fragmento *Pst*I-*Nae*I de 3,8 kb que contiene $TDH3_p::LIS::PGK1_t$, obtenido por restricción a partir del plásmido pG1-LIS (Herrero *et al.*, 2008), se subclonó en el plásmido YEp195Hmg previamente digerido con *Sal*I, ambos fragmentos fueron tratados con la ADN polimerasa del bacteriófago T4 para hacer compatibles sus extremos, y se obtuvo así el plásmido YEp195Lis_Hmg (Figura 17) utilizado para coexpresar el gen *LIS* y el alelo cat *hmg1* en *S. cerevisiae*.

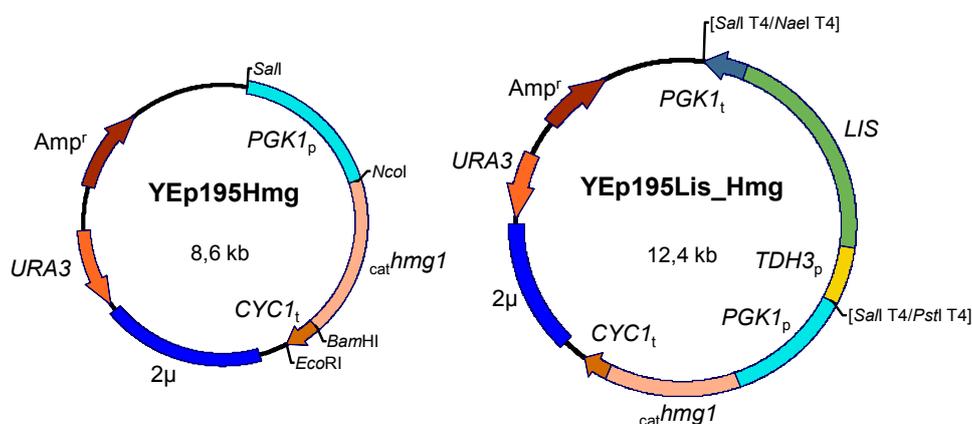


Figura 17. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresen el alelo cat *hmg1* y el gen *LIS* de *C. breweri*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

II.1.2. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresan el alelo cat *hmg1* y el gen *LIS* de *C. breweri*

La cepa de laboratorio BQS252 y la cepa vínica T_{73} -4 se seleccionaron para ser transformadas con los plásmidos YEp195Hmg y YEp195Lis_Hmg, los transformantes protótrofos para uracilo fueron seleccionados en medio mínimo SD y se aislaron las cepas YR176 (BQS252 YEp195Hmg); YR191 e YR192 (BQS252 YEp195Lis_Hmg); YR166 (T_{73} -4 YEp195Hmg); YR168 e YR169 (T_{73} -4 YEp195Lis_Hmg). Para confirmar que la transformación había sido llevada a cabo con éxito, se recuperaron los plásmidos de éstas y tras el análisis por restricción con las enzimas *Pvu*I (YEp195Hmg) y *Hind*III (YEp195Lis_Hmg) se constató la ausencia de grandes reorganizaciones y se procedió a su análisis fenotípico.

II.1.3. Producción de monoterpenos en cepas derivadas de BQS252 y T_{73-4} que sobreexpresan el alelo $hmg1_{cat}$ y el gen *LIS* de *C. breweri*

Para determinar el efecto de sobreexpresar el alelo $hmg1_{cat}$ sobre la síntesis de monoterpenos, la cinética de producción de linalol en medio rico YPD de las cepas recombinantes YR191 e YR192 (derivadas de BQS252), YR168 e YR169 (derivadas de T_{73-4}) se comparó con la obtenida utilizando sus respectivas cepas control YR175 (BQS252Lis) e YR162 (T_{73-4} Lis), que expresan únicamente la S-linalol sintasa de *C. breweri*. En la Figura 18B se muestra como la coexpresión del alelo $hmg1_{cat}$ y el gen *LIS* en T_{73-4} deriva en una producción media de linalol de $132,66 \pm 24,72 \mu\text{g/L}$ a las 32 horas de cultivo, 2 veces por encima de los valores obtenidos en la cepa control YR162 ($65,06 \pm 8,46 \mu\text{g/L}$). Por su parte, los transformantes derivados de la cepa BQS252 alcanzaron un valor medio de $30,19 \pm 3,88 \mu\text{g/L}$ (Figura 18C), lo que supone un incremento del 50% respecto a la producción obtenida en la cepa control YR175 ($19,98 \pm 2,88 \mu\text{g/L}$). Estos resultados indican que la sobreexpresión del alelo $hmg1_{cat}$ es capaz de incrementar por sí misma la capacidad para producir monoterpenos tanto de cepas de laboratorio como de cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

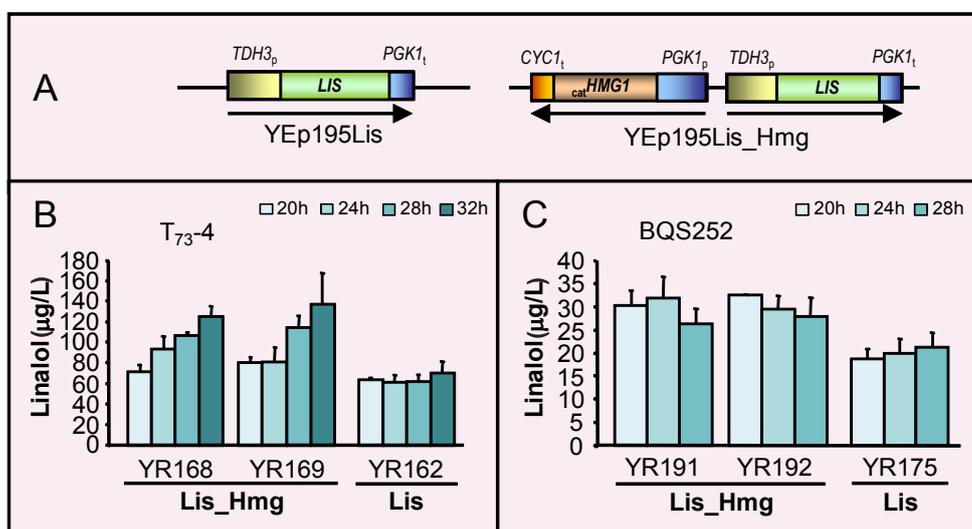


Figura 18. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de $Hmg1p_{cat}$. (A) Diagrama esquemático de las construcciones presentes en los plásmidos utilizados para transformar *S. cerevisiae*. (B) y (C) Cinética del linalol acumulado en los sobrenadantes de los caldos de cultivo de la cepa control y dos transformantes independientes. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La diferencia observada en la mejora obtenida en las cepas BQS252Lis_Hmg y T₇₃-4Lis_Hmg (1,5x y 2x respectivamente) podría estar relacionada con la cinética de producción de estas cepas. Mientras que los valores de producción de las cepas YR191 e YR192 alcanzaron su nivel máximo a las 20 horas de cultivo, tal como ocurre en las cepas BQS252Lis y T₇₃-4Lis; en el caso de las cepas T₇₃-4Lis_Hmg estos valores siguieron aumentando a lo largo del tiempo de ensayo (Figura 18B); lo que sugiere que en este fondo genético la sobreexpresión del alelo *hmg1*_{cat} podría estar prolongando en el tiempo la disponibilidad de GPP. No se detectó linalol en las cepas YR176 (BQS252Hmg) o YR166 (T₇₃-4Hmg) que sobreexpresan el alelo *hmg1*_{cat} en ausencia de la linalol sintasa. Todos los transformantes alcanzaron valores de densidad óptica similares a los de sus respectivas cepas control (YR175 e YR162) y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 19A), lo cual indica que ni las cantidades de linalol ni las modificaciones introducidas en la ruta MVA tienen efectos adversos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en estas condiciones. La eficiencia de la expresión del gen *LIS*, cuyo ARNm se detectó por el método northern con la sonda de 1,1 kb generada con los oligonucleótidos LIS-A y LIS-B, no se vio alterada por la coexpresión del alelo *hmg1*_{cat} (Figura 19B), por lo que el incremento observado en los niveles de linalol producidos no puede deberse a una mayor expresión del gen *LIS* en las cepas que coexpresan el alelo *hmg1*_{cat}.

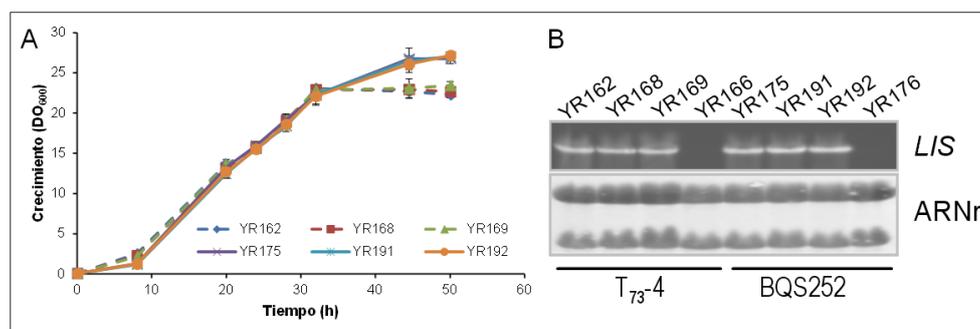


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del alelo *hmg1*_{cat} en cepas que expresan el gen *LIS* de *C. breweri*. (A) Curvas de crecimiento de las cepas BQS252 (línea continua) y T₇₃-4 (línea discontinua) transformadas con los plásmidos YEp195Lis (YR162; YR175) y YEp195Lis_Hmg (YR168; YR169; YR191; YR192). Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol. (B) Análisis northern de la expresión del gen *LIS* en levaduras transgénicas (24 horas). Se muestra el ARNr como control de carga y las cepas YR176 e YR166 (YEp195Hmg) como control negativo.

Todos estos resultados sugieren que la disponibilidad de GPP aumenta en ambos fondos genéticos como consecuencia de la sobreproducción de la proteína ${}_{\text{cat}}\text{Hmg1p}$ y que las cepas recombinantes derivadas de la cepa vínica $T_{73}\text{-4}$ presentan una ventana de producción más amplia en la cual el GPP se encuentra disponible para la producción de monoterpenos. Algunos trabajos habían mostrado previamente incrementos de entre 10 y 40 veces en la producción de escualeno al sobreexpresar el dominio catalítico de Hmg1p (Donald *et al.*, 1997; Polakowski *et al.*, 1998), sin embargo nuestros resultados muestran un incremento moderado de la producción de linalol, lo que sugiere que las enzimas implicadas en la ruta de síntesis de ergosterol como la FPPS podrían tener una mayor afinidad por el GPP que la linalol sintasa expresada.

II.2. Caracterización del efecto que tiene la sobreexpresión del gen *IDII* sobre la producción heteróloga de monoterpenos en *S. cerevisiae*

Sinopsis

La isopentenil pirofosfato isomerasa, codificada por el gen *IDII* en *S. cerevisiae*, cataliza la interconversión de IPP y DMAPP, que son los ‘bloques’ de 5 átomos de carbono (C5) a partir de los cuales se generan todos los isoprenoides (terpenoides), incluidos los monoterpenos. La sobreexpresión de este gen en cepas vínicas, derivadas de $T_{73}\text{-4}$, que expresan diferentes monoterpeno sintasas (geraniol sintasa y linalol sintasa) resultó tener un efecto positivo en la producción de monoterpenos, alcanzando valores de $12,99 \pm 1,92$ mg/L de geraniol y $178,83 \pm 31,98$ $\mu\text{g/L}$ de linalol; lo que supone mejorar 1,5 y 3 veces la producción de las cepas que únicamente expresaban la monoterpeno sintasa correspondiente. Asimismo, la delección del gen *MOD5* (codifica IPP transferasa, necesaria para la isopentenilación de los ARNt) en las cepas que sobreexpresan simultáneamente los genes *IDII* y *LIS* no sirvió para mejorar aún más la producción de linalol.

El alelo ${}_{\text{cat}}\text{hmg1}$, capaz de duplicar la producción de linalol, se sobreexpresó en la cepa $T_{73}\text{-4}$ junto con los genes *IDII* y *LIS* para tratar de incrementar en mayor medida dicha producción. Sin embargo, la combinación de estas estrategias no resultó efectiva en las condiciones ensayadas, y la cantidad de linalol obtenida se situó en niveles similares a los de las cepas que sobreexpresan únicamente el alelo ${}_{\text{cat}}\text{hmg1}$ junto con el gen *LIS*.

Antecedentes

El principal precursor de los monoterpenos, el GPP, se forma mediante la reacción de condensación de una molécula de isopentenil pirofosfato (IPP) con una de dimetilalil pirofosfato (DMAPP), las unidades básicas para la síntesis de isoprenoides. El GPP es posteriormente condensado con una nueva molécula de IPP para producir FPP, y éste se condensa de nuevo con otra molécula de IPP para producir GGPP (Figura 3). En *S. cerevisiae*, el gen esencial *IDII* (codifica IPP isomerasa; IPPI) cataliza la isomerización reversible de IPP y DMAPP (Anderson, Muehlbacher *et al.*, 1989). Además, mientras que las plantas tienen una actividad GPP sintasa (GPPS) que cataliza específicamente la síntesis de GPP, en *S. cerevisiae* ambas reacciones de condensación son catalizadas por la FPP sintasa (FPPS) codificada por el gen esencial *ERG20* (Anderson, Yarger *et al.*, 1989). A diferencia de otras enzimas de la ruta de síntesis de isoprenoides (MVA), la regulación de la síntesis y actividad de la enzima IPPI en *S. cerevisiae* no se conoce en profundidad, y cuando se comenzó este estudio no existían evidencias del efecto que tendría la manipulación de su expresión sobre la producción heteróloga de monoterpenos u otros terpenoides en este microorganismo, por lo que los efectos derivados de la sobreexpresión del gen *IDII* eran difíciles de anticipar. No obstante, teniendo en cuenta la implicación de IPP y DMAPP tanto en la síntesis como en el consumo de GPP, y su utilización en otras reacciones, modular el balance de estos isómeros haciendo la reacción de isomerización más eficaz podría ser interesante para mejorar la disponibilidad de GPP y aumentar así la producción de monoterpenos heterólogos en *S. cerevisiae*; tal como ocurrió al sobreexpresar esta actividad en *E. coli* para la producción de sesquiterpenos (farnesol), diterpenos (geranilgeraniol) y carotenos (β -caroteno; licopeno; zeaxantina) (Albrecht *et al.*, 1999; Kajiwara *et al.*, 1997; Ohto *et al.*, 2009).

Otra posible estrategia, relacionada con la anterior, para incrementar la producción de monoterpenos sería limitar la utilización de estos prenil difosfatos en reacciones no esenciales. En *S. cerevisiae*, algunos estudios sugieren que podría existir una competencia entre la formación de GPP y la modificación de los ARNt (Benko *et al.*, 2000; Kamińska *et al.*, 2002), esta última catalizada por la IPP transferasa Mod5p (Dihanich *et al.*, 1987), que también utiliza DMAPP como sustrato para la isopentenilación de moléculas citosólicas y mitocondriales de ARN de transferencia; y por tanto, esta ramificación de la ruta podría estar limitando el uso de los prenil difosfatos (C5) para la síntesis de GPP. Dado que los mutantes de pérdida de función en

este gen (*mod5Δ*) son viables, se decidió estudiar si la delección del gen *MOD5* tenía un efecto positivo sobre la disponibilidad de GPP y en consecuencia sobre la producción de monoterpenos.

La eliminación y/o represión de reacciones competidoras es una práctica habitual que ha mostrado ser efectiva en estrategias de sobreproducción de terpenoides, como por ejemplo la represión de la expresión de la escualeno sintasa (codificada por *ERG9*) para redirigir el FPP, que de forma natural se incorporaría a la biosíntesis de esteroides, hacia la síntesis de sesquiterpenos (Asadollahi *et al.*, 2010; Ro *et al.*, 2006). Además, la modificación de más de un paso de la ruta ha sido determinante en algunos estudios para mejorar la producción de determinados terpenos como en el caso de la producción de amorfadieno en *S. cerevisiae*, donde la represión del gen *ERG9* en cepas que sobreexpresan la región catalítica de la enzima Hmg1p resultó en un mayor incremento de la producción de este sesquiterpeno (Ro *et al.*, 2006). Resultados como este sugieren que la coexpresión del alelo ^{cat}*hmg1* y del gen *IDII* en cepas productoras de monoterpenos podría dar lugar a una producción superior a la conseguida al introducir cada una de estas modificaciones de forma independiente.

Por todo ello, con objeto de averiguar la importancia de la isomerización de IPP en DMAPP y tratar de mejorar la producción de monoterpenos, se estudió el efecto derivado de la sobreexpresión del gen *IDII*, la delección del gen *MOD5* y la sobreexpresión del alelo ^{cat}*hmg1* junto con el gen *IDII* sobre la capacidad productora de *S. cerevisiae*. Estas estrategias se llevaron a cabo tanto en la cepa vínica T₇₃-4, por su mayor capacidad para producir monoterpenos heterólogos, como en la cepa de laboratorio BY4741, por ser el parental de la cepa Y07332 (*mod5Δ*), y utilizando la S-linalol sintasa de *C. breweri* y la geraniol sintasa de *O. basilicum* como prototipo de monoterpeno sintasas.

II.2.1. Construcción de plásmidos para sobreexpresar en *S. cerevisiae* el gen *IDII* junto con los genes *LIS* o *GES*, con y sin el alelo ^{cat}*hmg1*

Para construir los plásmidos YEp195Lis_Idi y YEp195Lis_Idi_Hmg (Figura 20), en primer lugar se amplificó un fragmento de 1,9 kb correspondiente a la ORF del gen *IDII* flanqueada por sus propias regiones reguladoras (0,8 kb *IDII*_p; 0,25 kb *IDII*). Los oligonucleótidos Idi1_prom e Idi1_ter, que contienen sitios artificiales de reconocimiento para la enzima *Pst*I, se utilizaron en la reacción de PCR realizada a partir de ADN

genómico de la levadura de laboratorio FY1679, derivada de la cepa de referencia S288C. El amplicón fue sometido a restricción con la enzima *Pst*I y clonado en los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_Hmg (Figuras 6 y 17 respectivamente) previamente linearizados con la misma enzima, y los plásmidos resultantes fueron secuenciados utilizando los oligonucleótidos IDIdirter, IDIrevpro e IDIrevATG (Tabla 8) para confirmar la ausencia de posibles mutaciones introducidas en la reacción de PCR. Este fragmento de 1,9 kb se aisló posteriormente del plásmido YEp195Lis_Idi por restricción con *Pst*I y se subclonó en los plásmidos YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988) digerido con *Pst*I y YEp195Ges (Figura 6) digerido con *Sda*I, generando los vectores de expresión YEp195Ges_Idi y YEp195Idi respectivamente (Figura 20).

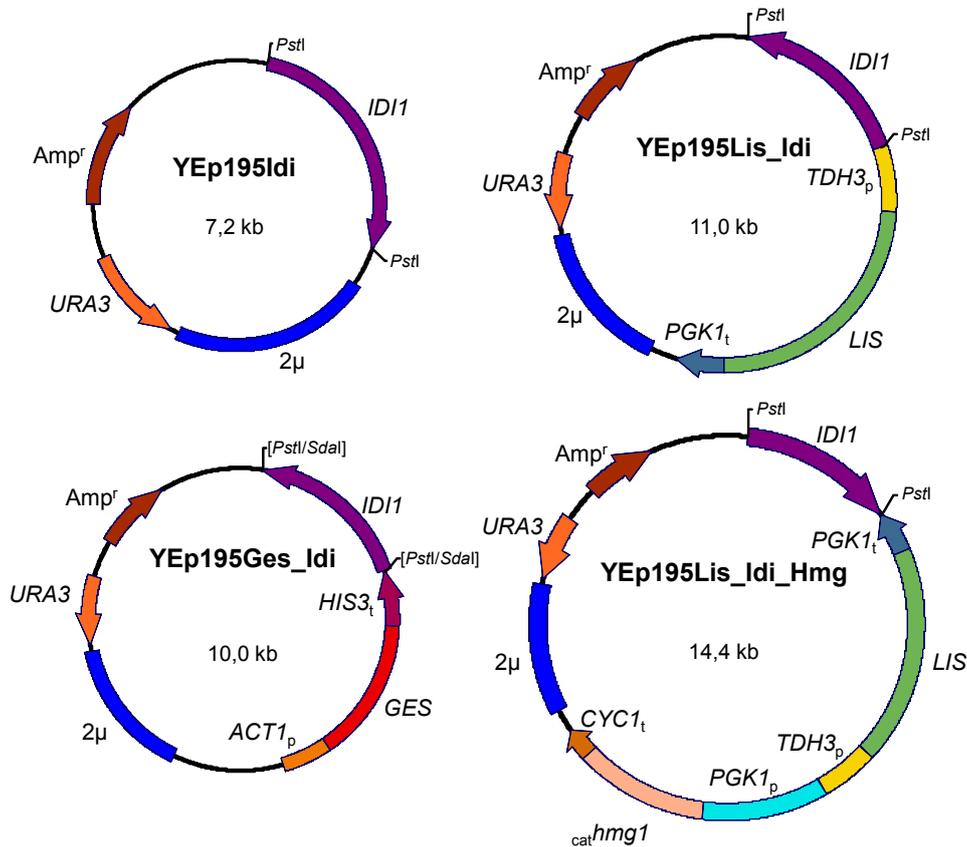


Figura 20. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresen el gen *ID11*, el alelo *cat^{hmg1}*, el gen *LIS* de *C. breweri* y el gen *GES* de *O. basilicum*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

II.2.2. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresan el gen *IDII* y los genes *LIS* o *GES*, en presencia o ausencia del alelo *hmg1_{cat}*

Las cepas de laboratorio BY4741 e Y07332 (BY4741 *mod5*Δ) se transformaron con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_Idi para estudiar si la eliminación del gen *MOD5* es una estrategia válida para mejorar la producción heteróloga de monoterpenos en *S. cerevisiae*. Las cepas YR444 (BY4741 YEp195Lis); YR448 (BY4741 YEp195Lis_Idi); YR452 e YR453 (Y07332 YEp195Lis); YR456 e YR457 (Y07332 YEp195Lis_Idi) fueron aisladas en medio mínimo sin uracilo y seleccionadas para la realización de los ensayos de producción; la cepa BY4741 se transformó a su vez con los plásmidos control YEplac195 y YEp195Idi obteniéndose así las cepas YR442 e YR446 respectivamente. Asimismo, la cepa vínica T₇₃-4 se incluyó en el estudio por su potencial para producir monoterpenos y su posible aplicación en fermentaciones vínicas industriales. Para ello, esta cepa se transformó con los plásmidos descritos en el apartado anterior (Figura 20), y las siguientes cepas -protótrofas para uracilo- fueron seleccionadas: YR385 (YEp195Idi), YR332 e YR334 (YEp195Lis_Idi), YR379 e YR380 (YEp195Ges_Idi), YR337 e YR338 (YEp195Lis_Idi_Hmg). Para confirmar que la transformación había sido llevada a cabo con éxito, se recuperaron los plásmidos de todas las cepas generadas y tras el análisis por restricción con *NcoI* (YEp195Idi, YEp195Lis_Idi, YEp195Lis_Idi_Hmg), *HindIII* (YEp195Lis), y *Asp718*, *PstI* y *NcoI* (YEp195Ges_Idi) se volvió a comprobar la orientación de los insertos, se constató la ausencia de grandes reorganizaciones y se procedió al análisis fenotípico.

II.2.3. La sobreexpresión del gen *IDII* incrementa la producción de linalol en la cepa de laboratorio BY4741Lis

Puesto que varias enzimas pueden competir con FPPS por IPP y DMAPP, se decidió en primer lugar sobreexpresar en la cepa de laboratorio, derivada de S288C, BY4741 (*MATa*; *his3*Δ1; *leu2*Δ0; *met15*Δ0; *ura3*Δ0 - Brachmann *et al.*, 1998) la región codificante del gen *IDII* -bajo el control de su propio promotor- junto con el casete de expresión del gen *LIS* (*TDH3_p::LIS::PGK1*) con el fin de elucidar si esta modificación es, en sí misma, capaz de mejorar la producción de monoterpenos. La producción de linalol en los transformantes YR444 (YEp195Lis) e YR448 (YEp195Lis_Idi) fue evaluada a las 24 horas de cultivo en medio líquido YPD (Figura 21A) y los datos obtenidos tras su cuantificación mostraron que la cantidad de linalol excretada por la cepa YR448 ($60,39 \pm 6,22$ μg/L) triplicaba (~3,3x) a la de la cepa YR444 ($18,33 \pm 1,95$ μg/L),

que no sobreexpresa *IDII*; lo que indica que la reacción de isomerización entre IPP y DMAPP es limitante para la producción heteróloga de monoterpenos en levaduras. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros grupos al sobreexpresar esta actividad en *E.coli*, donde consiguieron incrementar la producción de los carotenos astaxantina y licopeno (Wang *et al.*, 1999; Rad *et al.*, 2012), y son también respaldados por los ensayos realizados por otros investigadores en paralelo al desarrollo de este trabajo, en los que la producción del monoterpeno cineol era incrementada por la sobreexpresión del gen *IDII* bajo el control del promotor regulable del gen *GALI* (Ignea *et al.*, 2011).

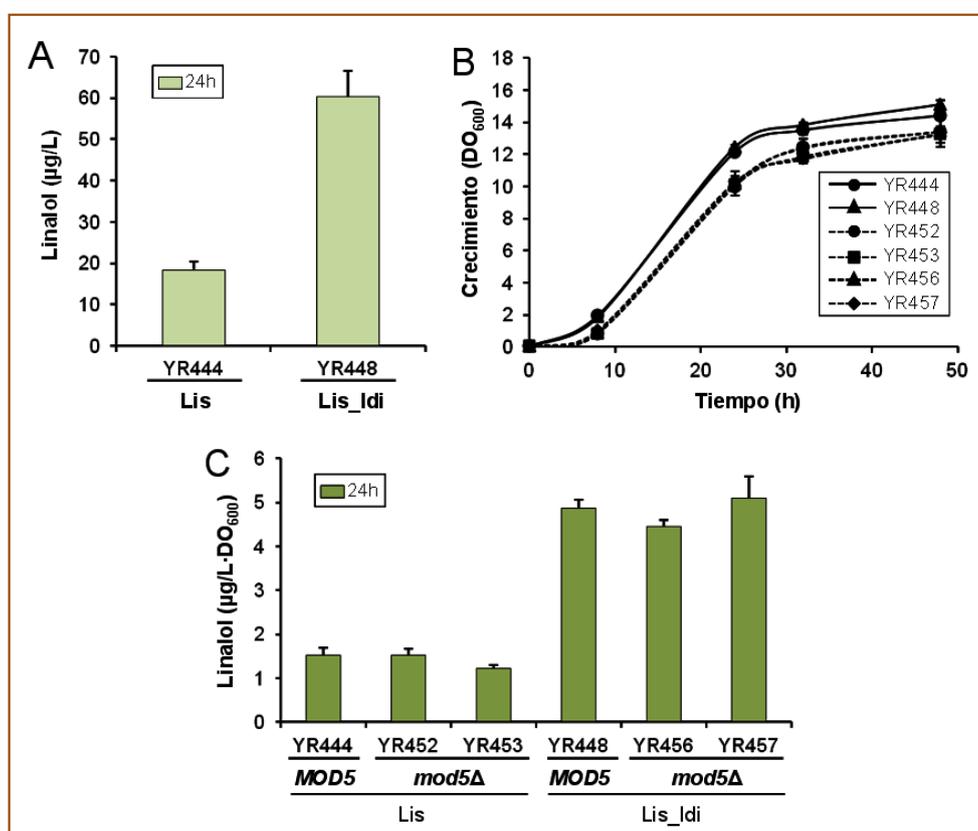


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión del gen *IDII*, con o sin la delección del gen *MOD5*, en el fondo genético BY4741Lis. (A) Producción de linalol en las cepas BY4741Lis y BY4741Lis_Idi. (B) Cinética de crecimiento de las cepas BY4741 (línea continua) e Y07332 (línea discontinua) transformadas con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_Idi. Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol. (C) Productividad por célula de las cepas BY4741 e Y07332 transformadas con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_Idi. Las muestras se tomaron a las 24 horas de cultivo en medio líquido YPD y los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

No se hallaron cantidades detectables de otros terpenoides en las cepas hiperproductoras de linalol y la producción de éste resultó ser específica de las cepas que expresan el gen *LIS*, ya que no se detectó linalol en los caldos de cultivo de las cepas que carecen de linalol sintasa: YR442 (BY4741 YEp195); YR446 (BY4741 YEp195Idi), aún cuando esta última sobreexpresa el gen *IDII*.

Los valores de linalol obtenidos en la cepa YR444 son además similares a los obtenidos en otras cepas de laboratorio que expresan el gen *LIS* de *C. breweri* (Apartado I.1 de Resultados y Discusión), lo que apoya el resultado de que algunas cepas de laboratorio empleadas habitualmente poseen capacidades equiparables para la producción heteróloga de monoterpenos. Los transformantes YR444 e YR448 alcanzaron valores de densidad celular similares y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 21B), lo que indica que ni la sobreexpresión del gen *IDII* ni el incremento de los valores de linalol alcanzados tienen efectos adversos sobre el crecimiento de la levadura.

II.2.4. La delección del gen MOD5 no afecta a la producción de linalol en la cepa de laboratorio BY4741 que expresa el gen LIS ni cuando ésta se combina con la sobreexpresión del gen IDII

Una vez obtenido este resultado positivo al sobreexpresar el gen *IDII*, se decidió bloquear la ruta de modificación de ARNt, que utiliza DMAPP como sustrato, con la intención de canalizar todo el flujo derivado de la reacción de isomerización de IPP y DMAPP hacia la formación de GPP. Para ello, la cepa Y07332, obtenida de la colección de deletantes de *S. cerevisiae* (EUROSCARF), y que es isogénica a BY4741 salvo por la delección del gen *MOD5*, se transformó con los plásmidos YEp195Lis y YEp195Lis_Idi; y la capacidad para producir linalol de los transformantes YR452 e YR453 (Y07332 YEp195Lis), YR456 e YR457 (Y07332 YEp195Lis_Idi) fue evaluada tras 24 horas de cultivo en medio rico YPD. Las cepas derivadas de Y07332 mostraron una tasa de crecimiento menor a la de la cepa control BY4741 (Figura 21B) y alcanzaron densidades celulares un 18% inferiores, por lo que las concentraciones de linalol obtenidas se normalizaron teniendo en cuenta las unidades de DO_{600} . La productividad específica, a las 24 horas de cultivo, de las cepas Y07332Lis (media $1,51 \pm 0,15 \mu\text{g/L} \cdot DO_{600}$) estaba próxima a la de BY4741Lis ($1,35 \pm 0,19 \mu\text{g/L} \cdot DO_{600}$). Un resultado similar se obtuvo al comparar dicha productividad en las cepas Y07332Lis_Idi (media $4,86 \pm 0,50 \mu\text{g/L} \cdot DO_{600}$), que sobreexpresan los genes *IDII* y *LIS* en el fondo genético *mod5::kanMX4*, con la de la cepa BY4741Lis_Idi

($4,84 \pm 0,54 \mu\text{g/L} \cdot \text{DO}_{600}$), que conserva el alelo silvestre *MOD5* (Figura 21C). Estudios realizados anteriormente para caracterizar esta competencia entre la ruta de modificación de ARNt y la ruta de síntesis de ergosterol en *S. cerevisiae*, en los que se muestra que el incremento de la actividad Mod5p es capaz de reducir los niveles de ergosterol aún cuando la transcripción del gen *ERG20* se ve incrementada en estas condiciones (Kaminska *et al.*, 2002), sugerían que la modificación de ARNt limita la disponibilidad de DMAPP para la formación de GPP. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la delección del gen *MOD5* no es suficiente para alterar la capacidad de la levadura para producir monoterpenos heterólogos; incluso en un escenario en el que la isopentenil pirofosfato isomerasa se encuentra sobreexpresada, lo que indica que en condiciones normales la actividad Mod5p no altera sustancialmente el flujo de DMAPP hacia la formación de GPP. Estas diferencias sugieren que los niveles de DMAPP utilizados para la modificación de ARNt sólo son capaces de reducir el flujo hacia la ruta de síntesis de ergosterol cuando la actividad Mod5p se induce por encima de sus valores normales.

II.2.5. La mejora de la producción de monoterpenos derivada de la sobreexpresión del gen *IDII* se mantiene en la cepa vínica T_{73-4} , previamente seleccionada como la mejor adaptada a la producción heteróloga de estos metabolitos

La utilidad de sobreexpresar el gen *IDII* para mejorar la producción de monoterpenos en cepas de laboratorio ha quedado demostrada en el apartado anterior. Sin embargo, los resultados obtenidos por modificación genética de cepas de laboratorio no son siempre extrapolables para su aplicación en cepas industriales, como sucedió con la delección del gen *MIG1* en *S. cerevisiae*, que evitó la represión por glucosa del consumo de maltosa en cepas de laboratorio pero falló al aplicarse en cepas industriales (Klein *et al.*, 1996), o al sobreexpresar el gen *GPD1* en cepas industriales productoras de cerveza, cuya mejora de la producción de glicerol no logró equipararse a la obtenida en cepas de laboratorio (Nevoigt *et al.*, 2002). A la vista de estos resultados, se decidió someter a estudio el efecto de sobreexpresar el gen *IDII* en la cepa vínica industrial T_{73-4} , previamente seleccionada por su capacidad para producir monoterpenos (ver apartado I.1 de Resultados y Discusión). La producción de linalol de las cepas transformadas con el plásmido YEp195Lis_ Idi (YR332 e YR334) en medio líquido YPD (media, $178,83 \pm 31,98 \mu\text{g/L}$) se comparó con la de la cepa control YR162 (YEp195Lis) ($71,74 \pm 19,65 \mu\text{g/L}$) (Figura 22A), mostrando una mejora en la producción de cerca del 250% y

demostrando que la sobreexpresión del gen *IDII* es una estrategia efectiva para incrementar la producción de monoterpenos heterólogos tanto en cepas de laboratorio como en cepas industriales. Tampoco se hallaron cantidades detectables de otros terpenoides en las cepas hiperproductoras de linalol derivadas de T₇₃-4, lo que confirma una vez más que la expresión del gen *LIS* de *C. breweri* deriva en la producción específica de linalol tanto en cepas de laboratorio como industriales de *S. cerevisiae*.

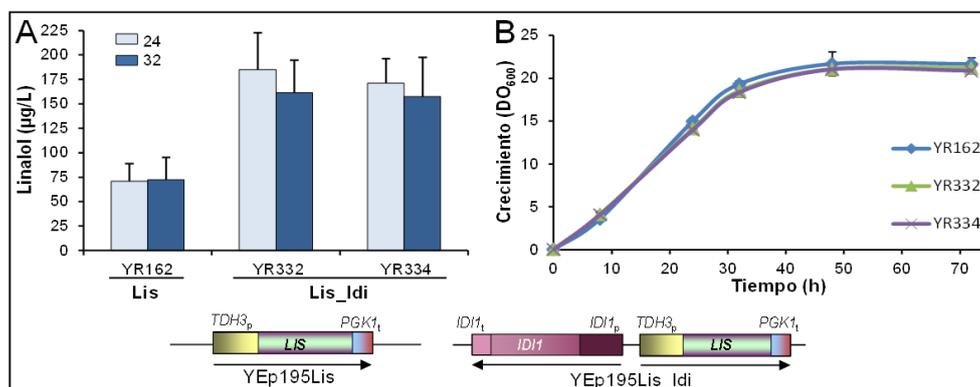


Figura 22. Producción de linalol en cepas derivadas de T₇₃-4 que sobreexpresan el gen *IDII* junto con el gen *LIS* de *C. breweri*. (A) Producción de linalol en las cepas T₇₃-4Lis y T₇₃-4Lis_Idi. (B) Cinéticas de crecimiento de las cepas T₇₃-4Lis y T₇₃-4Lis_Idi. Las muestras utilizadas para la cuantificación de linalol se recogieron a los tiempos indicados a partir de estos cultivos en medio líquido YPD y los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La producción de monoterpenoides, tal y como se ha mostrado anteriormente (ver apartado I.1 de Resultados y Discusión), no depende únicamente del hospedador seleccionado y de la disponibilidad de precursores, sino que también viene marcada por la capacidad de producción inherente a la monoterpeno sintasa expresada, en este caso la S-linalol sintasa de *C. breweri* o la geraniol sintasa de *O. basilicum*. Por ello, para determinar si la sobreexpresión del gen *IDII* es también una estrategia efectiva para mejorar la producción de monoterpenos cuando la producción basal derivada de la expresión de la sintasa heteróloga es muy superior (>100x) a la alcanzada cuando se expresa el gen *LIS* de *C. breweri* en *S. cerevisiae* (~60 µg/L), esta modificación se introdujo en cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresan el gen *GES* de *O. basilicum*. La utilización de estas cepas permitía además cuantificar el efecto de sobreexpresar el gen *IDII* sobre la dispersión metabólica generada por la producción de geraniol (apartado I.1 de Resultados y Discusión). Los genes

IDII y *GES* se sobreexpresaron desde un mismo plásmido en la cepa vínica seleccionada (cepas YR379 e YR380; T₇₃-4 YEp195Ges_Idi) y la producción de geraniol y sus derivados se comparó con la obtenida en una cepa que sobreexpresa únicamente el gen *GES* (YR377) a las 24 horas de cultivo en medio líquido YPD. La producción de geraniol se vio incrementada desde los $7,62 \pm 1,41$ mg/L obtenidos con la cepa YR377 a los $12,99 \pm 1,92$ mg/L alcanzados por YR379 e YR380 (Figura 23A), lo que confirma el efecto de *IDII* sobre la disponibilidad de GPP para la síntesis de monoterpenos; sin embargo, el incremento sobre la producción de geraniol fue algo inferior al obtenido cuando se combina con la expresión del gen *LIS* (1,7x vs 2,4x), lo cual podría deberse a que la elevada producción basal de monoterpenos alcanzada al expresar el gen *GES* en la cepa T₇₃-4 se encuentre próxima a su límite máximo. Por otra parte, el hecho de que el geraniol producido se transforme en otros terpenoides, podría estar impidiendo la correcta determinación del efecto de la sobreexpresión del gen *IDII* sobre la producción de geraniol en el caso de que existan conversiones que no seamos capaces de detectar en estas condiciones. No se hallaron cantidades detectables de linalol, geraniol o sus derivados en la cepa control YR385 (T₇₃-4 YEp195Idi), constatando una vez más que la producción de estos compuestos depende de la expresión de las monoterpeno sintasas heterólogas también cuando el gen *IDII* se sobreexpresa en la cepa vínica.

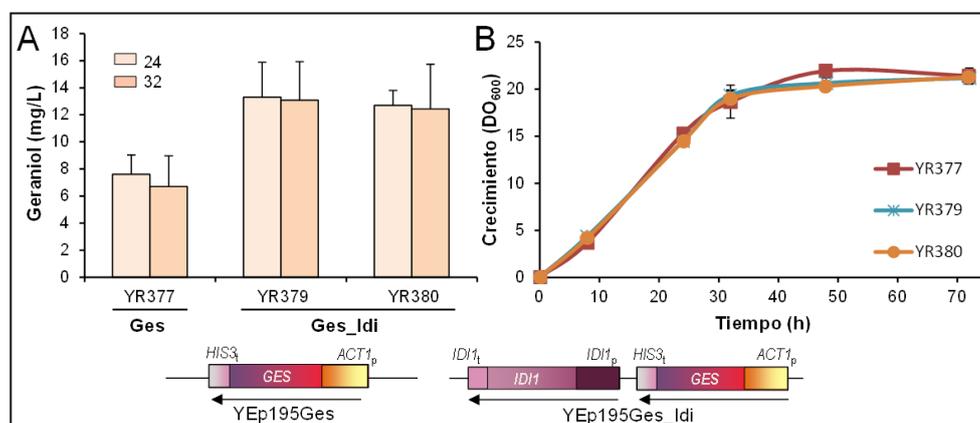


Figura 23. Producción de monoterpenos en cepas derivadas de T₇₃-4 que sobreexpresan el gen *IDII* junto con el gen *GES* de *O. basilicum*. (A) Producción de geraniol en las cepas T₇₃-4Ges y T₇₃-4Ges_Idi. (B) Cinéticas de crecimiento de las cepas T₇₃-4Ges y T₇₃-4Ges_Idi. Las muestras utilizadas para la cuantificación de monoterpenos se recogieron a los tiempos indicados a partir de estos cultivos en medio líquido YPD y los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Las proporciones de los ésteres y monoterpenos derivados de la producción de geraniol (geranil acetato, citronelil acetato, linalol, nerol y citronelol) en las cepas que sobreexpresan el gen *IDII* fueron similares a las observadas al expresar únicamente el gen *GES* (Tabla 11); es decir, la sobreexpresión del gen *IDII* no sólo es capaz de mejorar la capacidad de *S. cerevisiae* para producir geraniol, sino que además, como consecuencia de la mejora de la producción de éste, se produce una mejora proporcional de las cantidades obtenidas de los compuestos derivados, lo que indica que las actividades que en *S. cerevisiae* catalizan las modificaciones secundarias del geraniol no son limitantes. Este resultado sugiere además que la sobreexpresión del gen *IDII* podría ser una buena estrategia no sólo para mejorar la producción de geraniol durante el proceso de fermentación vínica, sino también de sus derivados aromáticos.

Tabla 11. Valores de producción absoluta ($\mu\text{g/L}$)^a y concentración relativa (%)^b de los compuestos derivados de la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en cepas derivadas de T₇₃-4 que sobreexpresan el gen *IDII*.

	T ₇₃ -4Ges ^a	T ₇₃ -4Ges ^b	T ₇₃ -4Ges_Idi ^a	T ₇₃ -4Ges_Idi ^b	$\frac{T_{73}\text{-4Ges_Idi}^a}{T_{73}\text{-4Ges}^a}$
Geraniol	7615,84 ± 1414,10	89,78 ± 0,48	12994,01 ± 1919,35	90,70 ± 0,52	1,71 ± 0,25
Linalol	9,31 ± 1,53	0,11 ± 0,01	14,38 ± 2,17	0,10 ± 0,01	1,54 ± 0,23
Nerol	209,14 ± 29,16	2,48 ± 0,12	325,09 ± 39,64	2,28 ± 0,12	1,55 ± 0,19
Citronelol	625,25 ± 87,46	7,42 ± 0,36	958,68 ± 111,34	6,73 ± 0,39	1,53 ± 0,18
Geranil acetato	16,19 ± 4,44	0,19 ± 0,03	26,48 ± 5,40	0,18 ± 0,03	1,63 ± 0,33
Citronelil acetato	10,61 ± 1,89	0,13 ± 0,02	16,75 ± 0,25	0,12 ± 0,01	1,63 ± 0,28
Total	8486,35 ± 1533,90	100	14333,41 ± 2065,73	100	1,69 ± 0,24

Todas las cepas en las que el gen *IDII* se encuentra sobreexpresado alcanzaron valores de densidad óptica similares a los de las cepas control y sus tasas de crecimiento fueron idénticas independientemente de la monoterpeno sintasa expresada (Figuras 22B y 23B), lo que indica que en estas condiciones ni las concentraciones de monoterpenos producidas ni la sobreexpresión de este gen tienen efectos adversos sobre el crecimiento de la levadura vínica T₇₃-4.

II.2.6. La sobreexpresión conjunta del alelo ${}_{cat}hmg1$ y del gen *IDII* no incrementa la capacidad de producir linalol en cepas derivadas de T_{73} -4 que expresan la linalol sintasa de *C. breweri*

La sobreexpresión del gen *IDII* y del alelo ${}_{cat}hmg1$ (apartado II.1 y II.2 de Resultados y Discusión) han resultado ser estrategias efectivas en la mejora de la producción de monoterpenos cuando se emplean de forma independiente tanto en cepas de laboratorio como en cepas vnicas industriales. Ante esta evidencia y teniendo en cuenta los antecedentes hallados en la bibliografía, en los que la sobreexpresión y/o desregulación de varios pasos de la ruta del ergosterol, entre los que se encontraba la reacción de síntesis del MVA (catalizada por la enzima Hmg1p), resultó en una mejora de la producción de terpenoides; por ejemplo del diterpeno geranilgeraniol (Tokuhira *et al.*, 2009), se decidió combinar ambas estrategias para determinar en qué medida la coexpresión de estos genes es capaz de incrementar la capacidad de *S. cerevisiae* para producir monoterpenos. Para ello, el gen *IDII* y el alelo ${}_{cat}hmg1$ se clonaron junto con el casete de expresión de la S-linalol sintasa en un mismo plásmido (YE_p195Lis_Idi_Hmg; Figura 24A), y éste se utilizó para transformar la cepa vnica T_{73} -4. La producción de linalol de los transformantes YR337 e YR338 (YE_p195Lis_Idi_Hmg) (media $113,18 \pm 11,24 \mu\text{g/L}$) se comparó con la producida por las cepas YR168 (YE_p195Lis_Hmg) ($132,67 \pm 24,72 \mu\text{g/L}$) e YR334 (YE_p195Lis_Idi) ($164,84 \pm 33,14 \mu\text{g/L}$) (Figura 24B). Este resultado muestra que la sobreexpresión conjunta del alelo ${}_{cat}hmg1$ y el gen *IDII* no sólo no sirvió para mejorar la producción de linalol, sino que ocasionó una leve disminución de la misma de alrededor del 30% respecto a las cepas que sobreexpresan únicamente los genes *IDII* y *LIS* (YR334). El hecho de que el rendimiento de las cepas YR337 e YR338 fuera similar al de la cepa control T_{73} -4Lis_Hmg (YR168) sugiere que la reacción de isomerización catalizada por IPPI no es limitante cuando el flujo de la ruta MVA se ha aumentado mediante la sobreexpresión desregulada de una forma soluble y activa de la enzima Hmg1p. Esta epistasia inducida podría deberse al hecho de que el gen *IDII* en YR337 e YR338 está bajo el control de sus propias regiones reguladoras y por tanto podría estar sometido a algún mecanismo de control transcripcional directa o indirectamente ocasionado por la presencia del alelo ${}_{cat}hmg1$. Esto explicaría las diferencias halladas en los resultados publicados por Ignea *et al.*, 2011, que muestran un incremento de la producción del monoterpeno cineol al sobreexpresar conjuntamente los genes *HMG2* e *IDII* bajo el control del promotor inducible del gen *GALI*

(codifica galactokinasa en *S. cerevisiae*). Otra posible explicación de este resultado podría estar relacionada con el modo en que la sobreexpresión de *IDII* mejora la disponibilidad de GPP para las monoterpene sintasas heterólogas; el efecto de la sobreexpresión de *IDII* podría actuar a dos niveles, en primer lugar el incremento de la isomerización de IPP a DMAPP daría lugar a una mayor disponibilidad de DMAPP para la formación de GPP, pero además limitaría el número de moléculas de IPP disponibles para convertir el GPP en FPP. En este escenario el incremento del flujo a través de la ruta derivado de la sobreexpresión del alelo *cat**hmg1* restablecería la relación IPP:DMAPP y revertiría el fenotipo de las células recombinantes.

Los transformantes YR337 e YR338 alcanzaron valores de densidad óptica similares a los de las cepas control (YR168 e YR334) y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 24C), lo cual indica que la combinación de estas modificaciones de la ruta MVA no afecta al crecimiento de la levadura en estas condiciones, y que la ausencia de mejora en la producción de linalol de estas cepas no esta relacionada con la aparición de efectos deletéreos derivados de la estrategia utilizada.

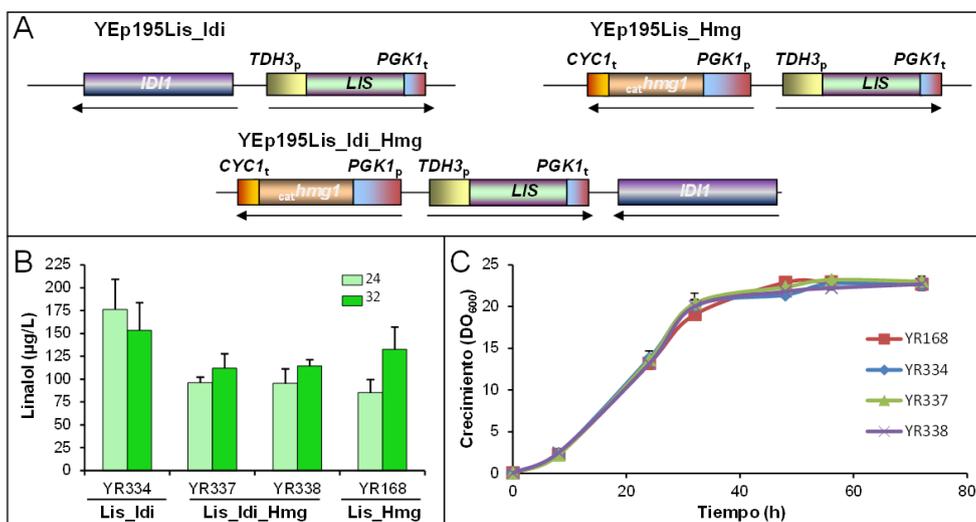


Figura 24. Efecto de la coexpresión del alelo *cat**hmg1* y el gen *IDII* sobre la producción de linalol. (A) Diagrama esquemático de las construcciones presentes en los plásmidos utilizados para transformar *S. cerevisiae*. (B) Producción de linalol en las cepas T₇₃-4Lis_Idi, T₇₃-4Lis_Hmg y T₇₃-4Lis_Idi_Hmg. (C) Curvas de crecimiento de la cepa T₇₃-4 transformada con los plásmidos YEp195Lis_Hmg, YEp195Lis_Idi y YEp195Lis_Idi_Hmg. Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol.

II.3. Manipulación de la síntesis y actividad de la enzima FPPS de *S. cerevisiae*

Sinopsis

El gen *ERG20* codifica la enzima FPP sintasa (FPPS), responsable de la formación y el consumo de GPP en *S. cerevisiae*. Este gen se sobreexpresó junto con el gen *LIS* de *C. breweri* en la cepa vínica T₇₃-4 para estudiar si la actividad de dicha enzima es limitante para la producción de GPP y como consecuencia de monoterpenos, lo que resultó en una notable disminución de la capacidad productora de la levadura. Para estudiar el efecto de reducir la expresión de este gen esencial, el gen *LIS* se expresó en la cepa Y21258 (*ERG20/erg20::kanMX4*) y la producción de linalol en este fondo genético cuadruplicó la de la cepa BY4743Lis (*ERG20/ERG20*). Asimismo, el alelo mutante *erg20-2* (K197E) se sobreexpresó junto con el gen *LIS* en la cepa Y21258 y, tras ser sometida a un proceso de esporulación, las cepas haploides que heredaron el alelo nulo del gen *ERG20* mostraron una producción de linalol ~50 veces mayor que las cepas que heredaron el alelo silvestre.

Antecedentes

La formación de GPP en *S. cerevisiae* es, como ya se ha mencionado en la introducción, una mera transición hacia la síntesis de FPP. El GPP es concretamente el producto intermedio de dos reacciones sucesivas catalizadas por la enzima farnesil pirofosfato (FPP) sintasa (FPPS; codificada por el gen esencial *ERG20* en *S. cerevisiae*) (Anderson, Yarger *et al.*, 1989). La sobreexpresión de este gen mejora la producción de dolicoles (esteroles de membrana) (Szkopińska *et al.*, 1997) y algunos estudios recientes muestran su capacidad para incrementar los niveles de otros compuestos derivados del FPP y GGPP (sesquiterpenos o diterpenos) en *S. cerevisiae* (Albertsen *et al.*, 2011; Ignea *et al.*, 2011; Ohto *et al.*, 2010). Sin embargo, no se conoce el efecto que esta sobreexpresión pueda tener sobre la producción de monoterpenos, por lo que un estudio a este nivel podría ser interesante a la hora de afrontar posibles estrategias de mejora que incluyan modificaciones en la expresión y/o actividad de esta enzima.

Por otra parte, a finales del siglo XX se aislaron y caracterizaron algunos mutantes del gen *ERG20* de *S. cerevisiae* (Chambon *et al.*, 1991) entre los

que se encuentra el alelo *erg20-2*, portador de una mutación puntual que da lugar a un cambio en el centro activo de la proteína, consistente en la sustitución del aminoácido lisina en la posición 197 por ácido glutámico. Dicha sustitución provoca ciertos cambios en la afinidad por los sustratos de la reacción de síntesis de FPP, de tal modo que cuando se ensayó *in vitro* la relación GPP:FPP pasó de ser 25:75 a 70:30 (Blanchard y Karst, 1993). A pesar de estos cambios, el alelo mutante era capaz de complementar la pérdida de función del alelo silvestre *ERG20*, en ausencia de mutaciones adicionales en la ruta, cuando se mantenía en un plásmido replicativo (Blanchard y Karst, 1993). La sobreexpresión de este alelo en cepas que expresan monoterpeno sintasas heterólogas podría ser de gran interés para la sobreproducción de monoterpenos dada la mayor proporción de GPP liberada por la enzima modificada. De hecho, los estudios realizados en paralelo por otros investigadores cuando se estaban llevando a cabo los experimentos para evaluar esta hipótesis mostraron que, la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en una cepa haploide (*erg20::kanMX4*), cuya actividad FPPS se hallaba complementada con la expresión del alelo *erg20-2* desde un plásmido episomal, duplicaba la producción de geraniol de la cepa silvestre (Oswald *et al.*, 2007). No obstante, el hecho de que en esos estudios se emplearan dos plásmidos independientes para expresar el alelo *erg20-2* y el gen *GES* podría ocasionar una pérdida o disminución del número de copias del plásmido portador del casete de expresión de la geraniol sintasa para favorecer el mantenimiento del plásmido portador del alelo *erg20-2*, cuya presencia en un elevado número de copias es necesaria para la subsistencia de la levadura. Por ello, y a pesar de este contratiempo, se consideró interesante seguir abordando los estudios iniciados ya que se diferenciaban de los anteriores al incluir el casete de expresión de la linalol sintasa de *C. breweri* en el mismo plásmido empleado para complementar la delección del gen *ERG20*, forzando así el mantener también un elevado número de copias del gen que codifica la monoterpeno sintasa; lo que ha resultado ser eficaz en la mejora de la producción de monoterpenos (ver apartado I.2 de Resultados y Discusión). En el estudio mencionado anteriormente (Oswald *et al.*, 2007) mostraron también una mayor producción de geraniol en las cepas haploides (*erg20::kanMX4*) complementadas con un plásmido episomal portador del alelo silvestre *ERG20*, por lo que se decidió incluir en nuestros estudios a las cepas haploides que heredaran el alelo silvestre *ERG20* como control para estudiar si la posible mejora de la producción de monoterpenos (p. ej. linalol) está relacionada con la complementación de la función FPPS por el alelo *erg20-2* y no con otros factores.

La eficiencia de este alelo para mejorar la producción de monoterpenos ha sido además recientemente comparada con la de otros alelos mutantes en el centro activo de la enzima FPPS, y el alelo *erg20-2* se encuentra entre los mejor capacitados a la hora de obtener un compromiso entre la complementación de la actividad FPPS y la mejora de la producción de monoterpenos en *S. cerevisiae* (Fischer *et al.*, 2011). Por todo ello, y con objeto de determinar la influencia que pudiera tener la modulación de la actividad FPPS de *S. cerevisiae* sobre la producción heteróloga de monoterpenos, se caracterizó el rol de esta enzima utilizando tanto la modulación de la expresión del gen *ERG20* como la modificación directa de la enzima FPPS. La combinación de estas manipulaciones con la sobreexpresión y/o desregulación de pasos anteriores de la ruta MVA, que habían mostrado previamente su eficacia para mejorar la producción de monoterpenos, en concreto la sobreexpresión de los alelos *hmg1*^{cat} e *IDII* (apartados II.1 y II.2 de Resultados y Discusión) (Rico *et al.*, 2010), podría tener efectos aditivos o sinérgicos y mejorar más si cabe la producción, por lo que también se estudió esta posibilidad.

II.3.1. Construcción de plásmidos para la coexpresión en *S. cerevisiae* de los alelos *ERG20* o *erg20-2* y el gen *LIS*, con y sin el gen *IDII* o el alelo *hmg1*^{cat}

Para sobreexpresar los alelos *ERG20* y *erg20-2* desde el plásmido episomal YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988) bajo el control del promotor del gen *ACT1* en *S. cerevisiae*, en primer lugar se amplificó la ORF junto con su propia región terminadora utilizando como molde ADN genómico de la cepa FY1679 de *S. cerevisiae* y se clonó en el plásmido YEpACT4 que contiene el promotor del gen *ACT1* (Sánchez-Torres *et al.*, 1998). Los oligonucleótidos ERG20-NcoI y ERG20-XhoI se utilizaron en la reacción de PCR en la que se obtuvo el fragmento de 1,4 kb correspondiente. La técnica de PCR fue empleada para introducir una transición A/G en la primera posición y otra G/A en la tercera posición del triplete AAG (codifica Lys197) del gen *ERG20*, y así convertirlo en GAA (codifica Glu; el codón GAA es usado en *S. cerevisiae* con más frecuencia que el GAG presente en el alelo *erg20-2* original). Con esta mutación se generaba además un sitio de restricción *SfuI* que facilitaba el clonaje del alelo mutante *erg20-2*. Para conseguir éste, el gen *ERG20* se amplificó en dos fragmentos de 0,6 y 0,8 kb con las parejas de oligonucleótidos ERG20-NcoI/*erg20-2_upper* y *erg20-2_lower*/ERG20-XhoI respectivamente (los oligonucleótidos *erg20-2_upper* y *erg20-2_lower* contienen la secuencia de reconocimiento para la enzima *SfuI*, elegida para generar la mutación

K197E). Los tres fragmentos se clonaron independientemente en pGEM-T Easy y se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones introducidas en la reacción de polimerización. El fragmento de 1,4 kb se recuperó por restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, mientras los fragmentos de 0,6 y 0,8 kb se recuperaron como fragmentos de restricción *NcoI/SfuI* y *SfuI/XhoI* respectivamente. Ambos alelos fueron ligados por separado en el plásmido YEpACT4 previamente linearizado con las enzimas *NcoI* y *SallI*; se generaron así los plásmidos intermedios YEp181ERG y YEp181erg2 que contienen el ADN de 2 micras, el marcador de selección *LEU2* y las regiones codificantes (*ERG20* y *erg20-2*), con su propio terminador, bajo el control del promotor del gen *ACT1*.

Los casetes de expresión *ACT1_p::ERG20* y *ACT1_p::erg20-2* de 1,9 kb se aislaron a partir de estos plásmidos por restricción con las enzimas *PstI* y *SmaI*, se clonaron en el plásmido YEplac195 previamente digerido con estas mismas enzimas y se obtuvieron los plásmidos YEp195ERG y YEp195erg2 (Figura 25).

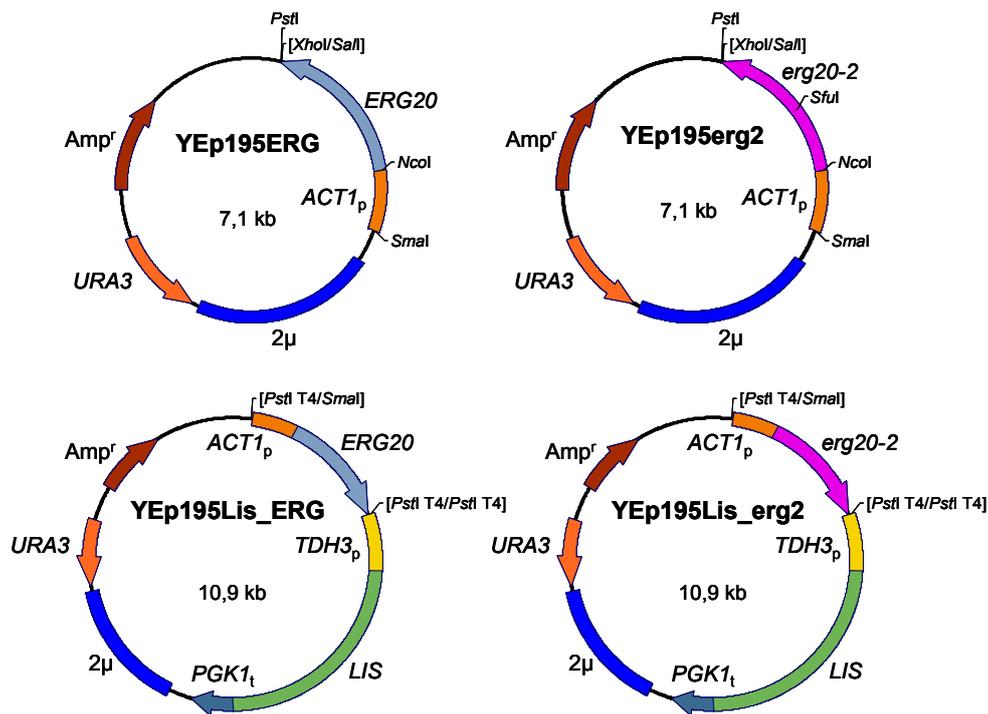


Figura 25. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresen los alelos *ERG20* y *erg20-2* junto con el gen *LIS* de *C. breweri*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

Para expresar simultáneamente el gen *LIS* de *C. breweri* junto con los alelos *ERG20* o *erg20-2*, y a su vez con el alelo *cat hmg1*, los fragmentos *PstI/SmaI* de 1,9 kb obtenidos a partir de los plásmidos YEp181ERG y YEp181erg2 se subclonaron en el sitio *PstI* de los plásmidos YEp195Lis (Figura 6) y YEp195Lis_Hmg (Figura 17). Tanto el vector como los fragmentos fueron tratados con la polimerasa de ADN del bacteriófago T4 para hacer sus extremos compatibles, antes de la reacción de ligación que originó los plásmidos YEp195Lis_ERG; YEp195Lis_erg2 y YEp195Lis_erg2_Hmg (Figuras 25 y 26).

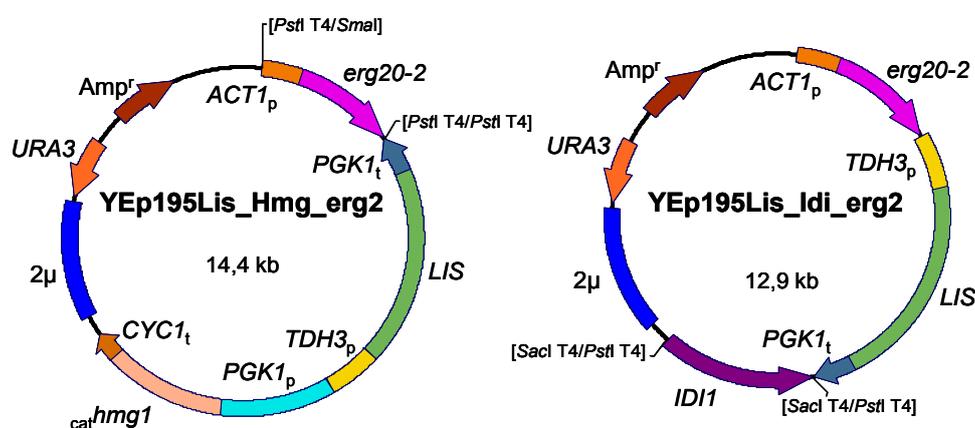


Figura 26. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresen los alelos *ERG20* y *erg20-2* junto con los genes *LIS*, *IDI1* y *cat hmg1*. Los sitios de restricción empleados en las construcciones aparecen señalados. Los corchetes indican sitios de restricción que desaparecen tras la ligación.

Para coexpresar el gen *IDI1* junto con el alelo *erg20-2* y el gen *LIS*, el fragmento de restricción *PstI* de 1,9 kb, correspondiente al gen *IDI1*, fue aislado a partir de YEp195Idi (Figura 20) y el plásmido YEp195Lis_erg2 se linealizó con la enzima *SacI*; ambos fragmentos fueron tratados con la polimerasa de ADN del bacteriófago T4 para hacer sus extremos compatibles y se procedió a la reacción de ligación en la que se generó el plásmido YEp195Lis_erg2_Idi (Figura 26).

II.3.2. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* que coexpresan el gen *LIS* y los alelos *ERG20* o *erg20-2*, con y sin el alelo *cat hmg1* o el gen *IDI1*

La cepa única T₇₃-4 se seleccionó para evaluar el efecto de sobreexpresar los alelos *ERG20* y *erg20-2* sobre la producción heteróloga de monoterpenos

en un fondo genético silvestre. Para ello se transformó ésta con los plásmidos YEp195ERG; YEp195erg2; YEp195Lis_ERG y YEp195Lis_erg2. Entre los transformantes protótrofos para uracilo, seleccionados en medio SD, se aislaron las cepas YR225 (T_{73} -4 YEp195ERG); YR227 (T_{73} -4 YEp195erg2); YR252 e YR253 (T_{73} -4 YEp195Lis_ERG); YR158 e YR229 (T_{73} -4 YEp195Lis_erg2).

Por otra parte, una vez estudiado el efecto de sobreexpresar distintas formas de la enzima FPPS, se decidió evaluar la capacidad para producir monoterpenos de cepas con la actividad FPPS reducida. La cepa Y21258 (*ERG20/erg20::kanMX4*) fue obtenida de la colección de mutantes de *S. cerevisiae* (EUROSCARF) y se transformó, junto con su cepa parental (BY4743), con el plásmido YEp195Lis (Figura 6); las cepas YR350 e YR351 (BY4743Lis); YR316 e YR317 (Y21258Lis) fueron así generadas.

La cepa Y21258 se transformó también con los plásmidos YEp195Lis_Hmg (Figura 17) (cepas YR318 e YR319); YEp195Lis_Idi (Figura 20) (cepas YR398 e YR399); YEp195Lis_erg2 (cepa YR366); YEp195Lis_erg2_Hmg (cepas YR320 e YR321) y YEp195Lis_erg2_Idi (cepas YR470 e YR471) con el fin de estudiar el efecto de sobreexpresar los alelos *erg20-2*, *hmg1*^{cat} y el gen *IDII* en este fondo genético, y como paso previo a la obtención de cepas haploides cuya función FPPS estuviera complementada por la sobreexpresión del alelo *erg20-2*.

Para confirmar que las transformaciones habían sido llevadas a cabo con éxito, se recuperaron los plásmidos de las cepas de levadura seleccionadas y, tras el análisis por restricción con *HindIII* (YEp195Lis; YEp195ERG; YEp195erg2; YEp195Lis_ERG; YEp195Lis_erg2), *KpnI* (YEp195Lis_erg2_Hmg) y *NcoI* (YEp195Lis_Idi; YEp195Lis_erg2_Idi), se constató la ausencia de grandes reorganizaciones y se procedió a su análisis fenotípico.

Los transformantes de la cepa Y21258 que coexpresan el alelo mutante *erg20-2* y el gen *LIS* fueron sometidos a un proceso de esporulación (Figura 27A) para obtener cepas haploides con la actividad FPPS complementada por este alelo rezumante, y estudiar la producción de monoterpenos en estas condiciones. Para ello, las cepas YR366 (YEp195Lis_erg2); YR320 (YEp195Lis_erg2_Hmg) e YR470 (YEp195Lis_erg2_Idi) se sembraron en medio pobre en nutrientes (KAc) y las esporas resultantes se germinaron en medio rico YPD y se replicaron en placas de medio mínimo sin uracilo en presencia o ausencia del antibiótico G418 para realizar una selección inicial (Figura 27B). Para comprobar la haploidía de los clones resultantes, éstos se analizaron en una reacción de PCR con los oligonucleótidos Matlocus; Mata y Matalpha, cuya combinación da lugar a fragmentos diferenciales para los loci *MATa* (0,55 kb) y *MATα* (0,4 kb),

e identifican positivamente las cepas diploides (Huxley *et al.*, 1990) (Figura 28A). De este modo se obtuvieron y caracterizaron genéticamente las cepas haploides YR414 e YR415 (*MATa ERG20 YEp195Lis_erg2*); YR410 e YR412 (*MATa erg20::kanMX4 YEp195Lis_erg2*); YR373 e YR375 (*MATa ERG20 YEp195Lis_erg2_Hmg*); YR370 e YR371 (*MATa erg20::kanMX4 YEp195Lis_erg2_Hmg*); YR474 e YR476 (*MATa ERG20 YEp195Lis_erg2_Idi*); YR477 e YR479 (*MATa erg20::kanMX4 YEp195Lis_erg2_Idi*). Todas las cepas haploides seleccionadas para los ensayos fenotípicos son de tipo sexual *MATa*, tal y como se estableció en el apartado I.1 de Resultados y Discusión.

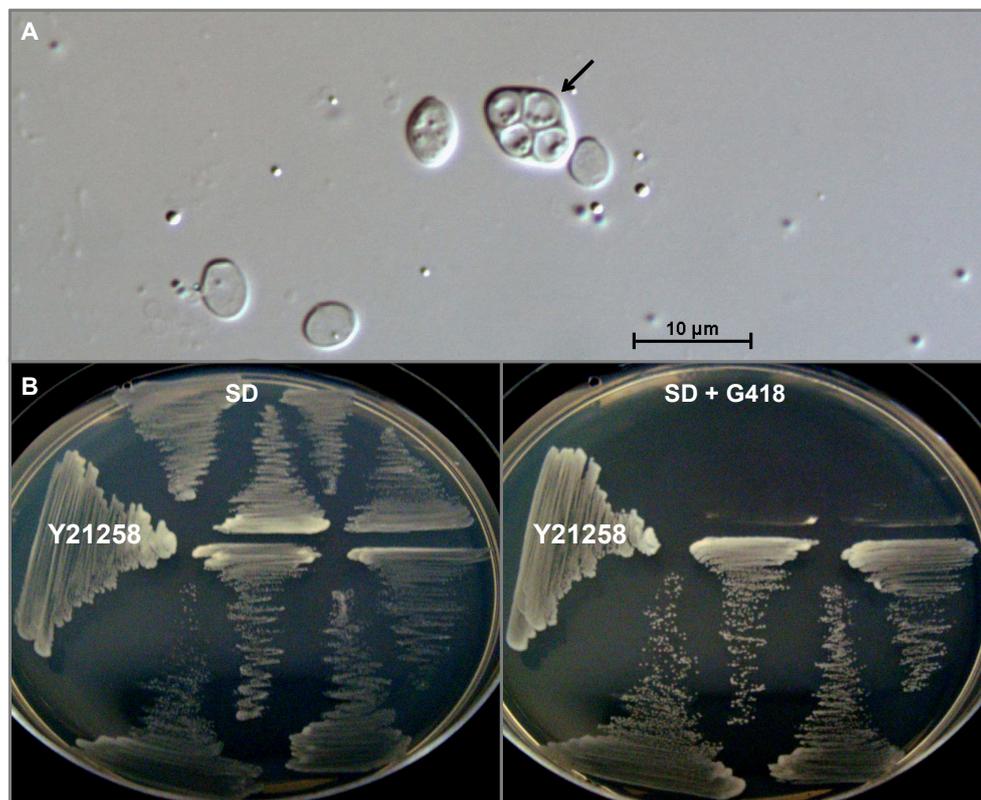


Figura 27. Representación del proceso de esporulación y selección de las cepas haploides derivadas de Y21258. (A) Imagen de microscopía óptica de un asca de *S. cerevisiae*. (B) Selección en placa de las cepas resultantes del proceso de esporulación; la cepa diploide parental Y21258 se empleó como control positivo de crecimiento.

Las cepas aisladas se sometieron a análisis genético del locus *ERG20* con los oligonucleótidos *ERG20del1* y *ERG20del2*, que dan lugar a fragmentos de ADN diferenciales para el alelo silvestre *ERG20* (1,8 kb) y el alelo disrupto *erg20::kanMX4* (2,2 kb) (Figura 28B), confirmándose de nuevo la haploidía y el genotipo de las cepas seleccionadas. Se recuperaron los plásmidos episomales de todas las cepas generadas y se comprobaron nuevamente por restricción con *NcoI* para constatar que no se habían producido grandes eventos de reorganización durante los procesos de esporulación y selección.

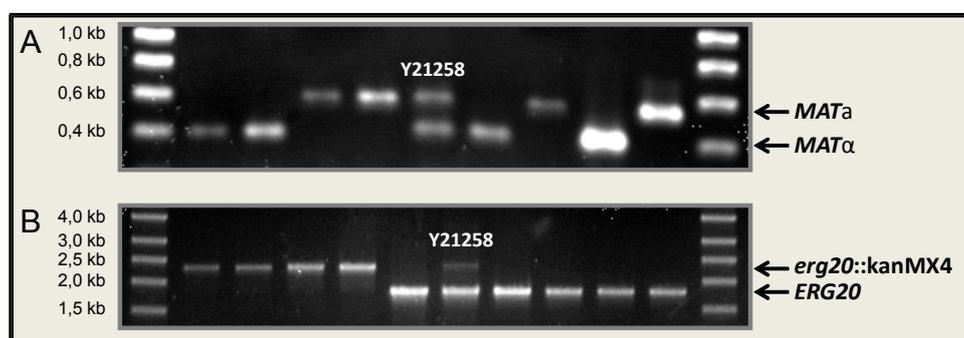


Figura 28. Análisis genético de las cepas haploides derivadas de Y21258. (A) Determinación por PCR del tipo sexual de las células de *S. cerevisiae*. (B) Análisis del genotipo de las cepas de levadura para el locus *ERG20*. La cepa diploide parental Y21258 se incluyó en los análisis como control positivo.

II.3.3. La sobreexpresión de los alelos *ERG20* o *erg20-2* reduce la producción de linalol en cepas derivadas de T_{73-4} que expresan el gen *LIS* de *C. breweri*

Para averiguar el modo en que la enzima FPPS influye sobre la capacidad de *S. cerevisiae* para producir monoterpenos, el alelo silvestre *ERG20* y el alelo mutante *erg20-2* se sobreexpresaron junto con el gen *LIS* de *C. breweri* en la cepa vínica T_{73-4} . La producción de linalol de las cepas YR252 e YR253, portadoras del plásmido YEp195Lis_ERG, se cuantificó a las 24 y 32 horas de cultivo en medio líquido YPD (media $1,15 \pm 0,38 \mu\text{g/L}$) y se comparó con la de la cepa control YR162 (T_{73-4} YEp195Lis - $64,27 \pm 9,63 \mu\text{g/L}$) (Figura 29A). Este resultado muestra una drástica disminución del linalol obtenido, lo que sugiere que la sobreexpresión del alelo silvestre *ERG20* limita la disponibilidad de GPP para la síntesis de monoterpenos. Estos resultados están en concordancia

con las mejoras en la producción de compuestos sintetizados a partir de FPP (sesquiterpenos y esteroides) (Szkopińska *et al.*, 1997; Ignea *et al.*, 2011), obtenidas mediante la sobreexpresión del gen *ERG20*, probablemente porque el supuesto aumento de la actividad FPPS haría esta reacción más eficaz canalizando todo el flujo de la ruta MVA (Figura 2) hacia FPP.

El alelo mutante *erg20-2* se sobreexpresó en las cepas YR158 e YR229 (T_{73} -4 YEp195Lis_erg2) para averiguar si el supuesto exceso de la forma mutante (K197E) de FPPS, con menor afinidad por GPP, podría competir con la actividad FPPS endógena y resultar en un aumento de la producción. La acumulación de linalol obtenida con estas cepas (media $37,69 \pm 4,74 \mu\text{g/L}$) se comparó con las obtenidas anteriormente (Figura 29A) y se observó un fenotipo intermedio, lo que sugiere que la proteína codificada por el alelo endógeno *ERG20* prevalece sobre su forma modificada y que, de algún modo, la presencia de esta enzima mutante (sobreexpresada) también ayuda a la canalización del flujo de la ruta MVA hacia FPP en estas condiciones, aunque de manera más débil que al sobreexpresar la enzima FPPS silvestre. Todos los transformantes alcanzaron valores de densidad óptica similares a los de la cepa control (YR162) y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 29B), lo cual indica que las modificaciones introducidas en la ruta MVA no tienen efectos adversos sobre el crecimiento de esta cepa de *S. cerevisiae* en estas condiciones, y además que la reducción en la capacidad de producir linalol de las cepas ensayadas no puede relacionarse con un defecto a este nivel.

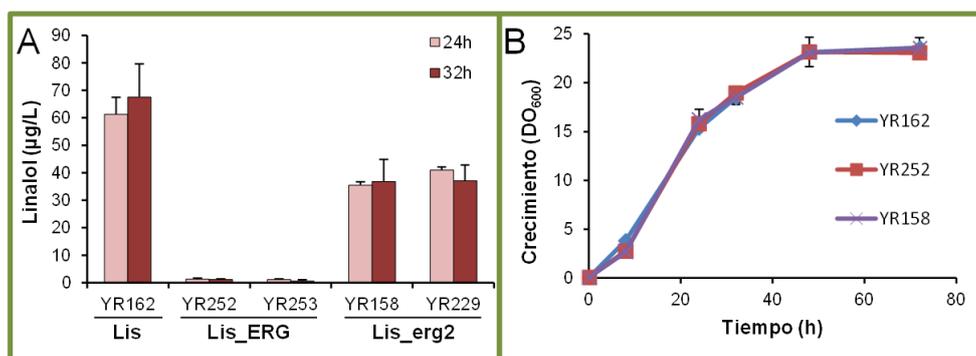


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de los alelos *ERG20* y *erg20-2* sobre la producción de linalol en la cepa T_{73} -4. (A) Producción de linalol de la cepa T_{73} -4 transformada con los plásmidos YEp195Lis; YEp195Lis_ERG y YEp195Lis_erg2. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Curvas de crecimiento de la cepa T_{73} -4 transformada con los plásmidos YEp195Lis (YR162); YEp195Lis_ERG (YR252); YEp195Lis_erg2 (YR158). Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol.

No se detectó producción de linalol en las cepas utilizadas como control negativo YR225 (T_{73} -4 YEp195ERG) e YR227 (T_{73} -4 YEp195erg2), que sobreexpresan respectivamente los alelos *ERG20* y *erg20-2* en ausencia de la linalol sintasa, lo que indica que el linalol detectado en las cepas productoras procede específicamente de la reacción catalizada por la linalol sintasa heteróloga. Sin embargo, este resultado no deja de ser sorprendente, ya que en las publicaciones del aislamiento y caracterización del mutante *erg20-2* (Chambon *et al.*, 1990 y 1991; Blanchard y Karst, 1993) se había descrito que la acumulación de GPP en las cepas portadoras de este alelo derivaba en la acumulación de geraniol y linalol, por acción de fosfatasas endógenas de la levadura. Esta diferencia podría deberse a que la presencia del gen silvestre *ERG20* impide la acumulación de GPP y por tanto no hay sustrato para la acción de estas fosfatasas.

Además, la presencia de la actividad FPPS endógena ha mostrado ser suficiente para limitar la eficiencia de las estrategias de ingeniería metabólica llevadas a cabo en este paso, como la sobreexpresión del gen *erg20-2*, lo que sugiere que para mejorar la producción de monoterpenos derivada de esta sobreexpresión es necesario reducir o eliminar la actividad FPPS endógena en *S. cerevisiae*.

II.3.4. La reducción a la mitad del número de copias del gen *ERG20* en una cepa diploide, cuadruplica la producción de linalol

Hay varias maneras de reducir la actividad de una enzima en la célula, por ejemplo la disminución del número de copias del gen que la codifica, la regulación a la baja de su transcripción y/o traducción o la modificación de su actividad mediante inhibidores, ingeniería de proteínas o complementando su función con enzimas procedentes de otros organismos. Por tanto, como primera aproximación para tratar de reducir específicamente y de manera no reversible la actividad FPPS en *S. cerevisiae*, la cepa merodiploide Y21258 (genotipo relevante *ERG20/erg20::kanMX4*; de la colección de mutantes EUROSCARF), hemizigota para el gen *ERG20*, se utilizó como hospedadora de los plásmidos de expresión del gen *LIS* en los ensayos de producción de monoterpenos.

Esta cepa y su parental homocigótico BY4743 se transformaron con el plásmido YEp195Lis y las cepas YR316 e YR317 (Y21258Lis); YR350 e YR351 (BY4743Lis) fueron aisladas. La producción de linalol en las cepas Y21258Lis (media - $67,97 \pm 9,87$ $\mu\text{g/L}$) fue 4,6 veces superior a la obtenida con las cepas BY4743Lis (media - $14,68 \pm 0,84$ $\mu\text{g/L}$) (Figura 30A), lo que sugiere que la inactivación de una de las copias del gen *ERG20* en cepas diploides de *S. cerevisiae* es suficiente para reducir la actividad FPPS hasta un nivel que permite a las monoterpeno sintasas un acceso mejor al GPP, bien sea porque

éste se encuentra en cantidades mayores o porque la monoterpene sintasa puede competir más eficientemente por este sustrato. En el apartado I.1 de Resultados y Discusión se mostraba que las cepas de laboratorio haploides y diploides poseen capacidades similares para producir monoterpenos; por lo que tener una o dos copias del alelo *ERG20* no afecta a la producción de monoterpenos heterólogos cuando se mantiene la misma dosis génica que para el resto del genoma. Por tanto, el incremento en la producción de linalol observado en la cepa Y21258Lis (*ERG20/erg20::kanMX4*) podría estar relacionado con la reducción al 50% de la dosis del gen *ERG20* frente al resto del genoma, y más concretamente respecto a otros genes de la ruta MVA. Todos los transformantes alcanzaron valores de densidad óptica similares y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 30B), lo cual indica que ni las cantidades de linalol ni la disrupción de una de las copias del gen *ERG20* tienen efectos adversos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en estas condiciones.

II.3.5. Caracterización genética del locus *ERG20* de la cepa T_{73}

Al comparar los resultados de producción de linalol de las cepas merodiploides Y21258Lis (media $67,97 \pm 9,87$ $\mu\text{g/L}$) con los obtenidos anteriormente, se observa que ésta es muy similar a la de la cepa vínica T_{73} -4Lis (media $62,79 \pm 9,01$ $\mu\text{g/L}$) (Figura 30A); en base a esto, y puesto que la cepa T_{73} es una cepa quasi-diploide (Puig *et al.*, 1998) en la que no se conoce el número de copias del gen *ERG20*, se decidió caracterizar genéticamente este locus para averiguar si la semejanza encontrada con la cepa de laboratorio mutante Y21258 en la capacidad para producir monoterpenos pudiera ser debida a modificaciones existentes en este gen y por tanto a una actividad FPPS menor. Para ello se diseñó un análisis Southern en el que se incluyeron los ADN genómicos de las cepas T_{73} y T_{73} *URA3/ura3* Δ (incluida como control para determinar si es posible discernir el número de copias con esta técnica), los ADN se digirieron con la enzima de restricción *DraI* y se hibridaron con una sonda de 1,4 kb diseñada para detectar simultáneamente los fragmentos correspondientes a los genes *ERG20* (2,2 kb) y *URA3* (5,0 kb). Se utilizó el gen *URA3* como gen de referencia porque está descrito que la cepa T_{73} contiene 2 copias (Puig *et al.*, 1998) y además se disponía de una cepa con una sola copia de este gen en la colección del laboratorio. La sonda se generó por PCR de fusión a partir de dos fragmentos de 0,7 kb correspondientes a la región codificante de ambos genes y, para que la hibridación fuera equiparable, se ajustó el contenido en guanina y citosina (*ERG20* = 43,0%; *URA3* = 43,4%) y la temperatura de fusión de estos fragmentos (*ERG20* = 76,6°C; *URA3* = 76,8°C). Tras la hibridación y detección de los fragmentos se cuantificó la intensidad de

la señal de las bandas correspondientes a los loci *ERG20* y *URA3* (Figura 30C) con el programa de análisis de imagen Multi Gauge ver. 2.0 (Fujifilm). La intensidad de la señal de la banda correspondiente al locus *ERG20* resultó ser muy similar a la intensidad de la banda control en la cepa T_{73} ($ERG20/URA3 = 1,07 \pm 0,19$). Por su parte, al comparar la intensidad de la señal de las bandas *URA3* y *ERG20* en la cepa $T_{73}URA3/ura3\Delta$, la intensidad de la banda *ERG20* fue aproximadamente el doble de la de la banda correspondiente a una copia del gen *URA3* ($ERG20/URA3 = 1,96 \pm 0,30$) (Figura 30C); la intensidad de la señal se incrementaba además de forma proporcional a la carga de ADN correspondiente a cada carrera, indicando que los valores obtenidos no han sido en ningún caso falseados por una posible saturación de la señal. Ambos resultados indican que la cepa única T_{73} tiene dos copias del gen *ERG20*, y por tanto no se puede explicar su mayor capacidad para producir monoterpenos por una dosis génica menor.

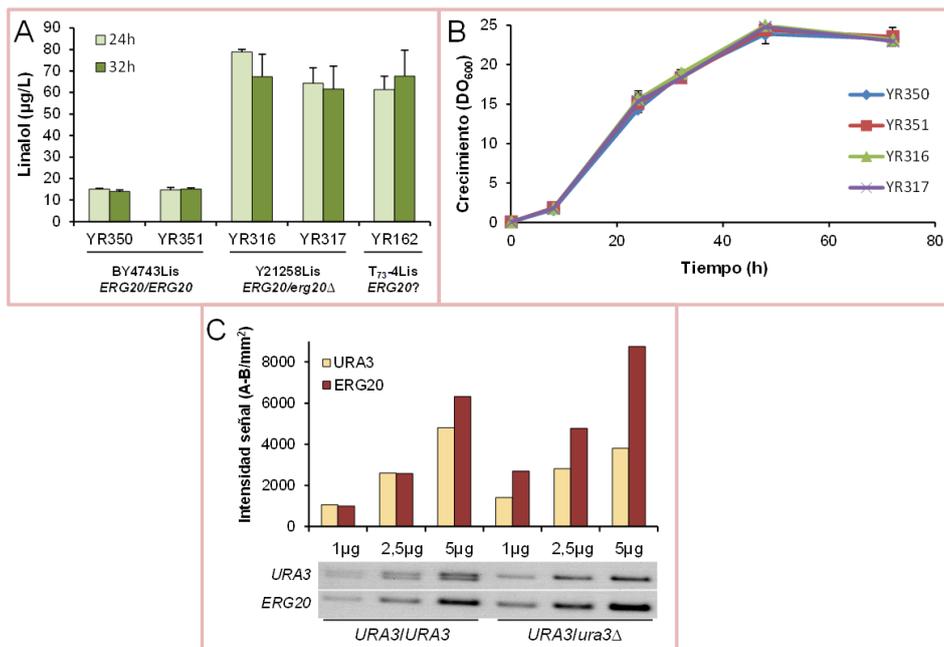


Figura 30. Producción de linalol en la cepa Y21258. (A) Acumulación de linalol en las cepas BY4743 e Y21258 transformadas con el plásmido YEp195Lis. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados y las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Curvas de crecimiento de las cepas BY4743 e Y21258 transformadas con el plásmido YEp195Lis. Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol. (C) Análisis Southern para establecer el número de copias del gen *ERG20* en la cepa T_{73} . En el cálculo de la intensidad de la señal, el factor A corresponde a la intensidad de la banda y el factor B a la intensidad de fondo. Los pocillos se cargaron con las cantidades de ADN genómico indicadas.

A

ATGGCTTCAGAAAAAGAAAATTAGGAGAGAGAGATTCTTGAACGGTTTTCCCTAAATTAGTAGAGGAAATTGAACGCATCGCTTTTGGCTTAC 90
 ATGGCTTCAGAAAAAGAAAATTAGGAGAGAGAGATTCTTGAACGGTTTTCCCTAAATTAGTAGAGGAAATTGAACGCATCGCTTTTGGCTTAC 90
 * * * * *
 GGTATGCCTAAGGAAGCATGTGACTGGTATGCCACACTCATTTGAACACACACTCCAGGGGGTAAGCTAAATAGAGGTTTTGTCCGTTGTG 180
 GGTATGCCTAAGGAAGCATGTGACTGGTATGCCACACTCATTTGAACACACACTCCAGGGGGTAAGCTAAATAGAGGTTTTGTCCGTTGTG 180
 * * * * *
 GACACGATATGCTATTCTCTCCAACAAGACCGTTGAACAAATGGGGCAAGAAGAAATACGAAAAGGTTGCCATTTCTAGGTTGGTGCATTTGAG 270
 GACACGATATGCTATTCTCTCCAACAAGACCGTTGAACAAATGGGGCAAGAAGAAATACGAAAAGGTTGCCATTTCTAGGTTGGTGCATTTGAG 270
 * * * * *
 TTGTTGCAGGCTTACTTTCTTGGTCGCCGATGATATGATGGACAAGTCCATTTACCAGAAGAGGCCAACCATGTTGGTACAAGGTTCCCTGAA 360
 TTGTTGCAGGCTTACTTTCTTGGTCGCCGATGATATGATGGACAAGTCCATTTACCAGAAGAGGCCAACCATGTTGGTACAAGGTTCCCTGAA 360
 * * * * *
 GTTGGGGAAAATTGCCATCAATGACGCAATTCATGTTAGAGGCTGCTATCTACAAGCTTTTGAATCTCACITTCAGAAAACGAAAAAATACTAC 450
 GTTGGGGAAAATTGCCATCAATGACGCAATTCATGTTAGAGGCTGCTATCTACAAGCTTTTGAATCTCACITTCAGAAAACGAAAAAATACTAC 450
 * * * * *
 ATAGATAATCACCGAAATGTTCCATGACGTCACCTTCCAACCAGAAATGGGCCAAATTGATGGACITTAATCACTGCACCTGAAGACAAAAGTC 540
 ATAGATAATCACCGAAATGTTCCATGACGTCACCTTCCAACCAGAAATTGATGGGCCAAATTGATGGACITTAATCACTGCACCTGAAGACAAAAGTC 540
 * * * * *
 GACTTGAGTAAGTTCTCCCTAAAGAAGCACITCCITTCATAGTTACTTTCAAGACTGCITTACTATTTCTTTCTACTTTGCCITGTCGCAITTTGGC 630
 GACTTGAGTAAGTTCTCCCTAAAGAAGCACITCCITTCATAGTTACTTTCAAGACTGCITTACTATTTCTTTCTACTTTGCCITGTCGCAITTTGGC 630
 * * * * *
 ATGTACGTTGCCGGTATCACGGATGAAAAGGATTTGAAACAAGCCAGAGATGTCITTTGATTTCCATTTGGGTGAATACTTCCAAAATTC AAGAT 720
 ATGTACGTTGCCGGTATCACGGATGAAAAGGATTTGAAACAAGCCAGAGATGTCITTTGATTTCCATTTGGGTGAATACTTCCAAAATTC AAGAT 720
 * * * * *
 GACTACTTAGACTGCTTCGGTACCCCGAACACAGATCGGTAAGATCGGTACAGATAATCCAAGATAACAAAATGTTCTTTGGGTAATCAACAAG 810
 GACTACTTAGACTGCTTCGGTACCCCGAACACAGATCGGTAAGATCGGTACAGATAATCCAAGATAACAAAATGTTCTTTGGGTAATCAACAAG 810
 * * * * *

```

GCATTCGAACTTGCCTCCGCAGAACAAAAGAAAGACTTTAGACGAAAAATTACGGTAAGAAGGACTCAGTCGCAGAGAAGCCAAAATGCAAAAAG 900
GCATTA GAACCTTGCCTCCGCAGAACAAAAGAAAGACTTTAGACGAAAAATTACGGTAAGAAGGACTCAGTCGCAGAGAAGCCAAAATGCAAAAAG 900
*****
ATTTTCAATGACTTGAAAAATTGAACAGCTATACCACGAAATGAAGAGTCTATTGCCAAGGATTTGAAGGCCAAAAATTTCTCAGGTCGAT 990
ATTTTCAATGACTTGAAAAATTGAACAGCTATACCACGAAATGAAGAGTCTATTGCCAAGGATTTGAAGGCCAAAAATTTCTCAGGTCGAT 990
*****
GAGTCTCGTGGCTTCAAAGCTGATGCTTAACTCGGTTCTTGAACAAAAAGTTTACAAGAGAAGCAAAATAG 1059
GAGTCTCGTGGCTTCAAAGCTGATGCTTAACTCGGTTCTTGAACAAAAAGTTTACAAGAGAAGCAAAATAG 1059
*****

```

B

```

MASEKEIRREERFLNFPKLVVEELNASLLAYGMPKEACDWYAHSLNLYNTPGGKLNRLSVVDTYAILSNKTVVEQLGQEEYEKVAILGWCIE 90
MASEKEIRREERFLNFPKLVVEELNASLLAYGMPKEACDWYAHSLNLYNTPGGKLNRLSVVDTYAILSNKTVVEQLGQEEYEKVAILGWCIE 90
*****
LLQAYFLVADDMDKSITRRGQPCWYKYPEVGEIAINDAFMLEAAIYKLLKSHFRNEKYIIDITELFHEVTFQTELGQMLDLITAPEDKV 180
LLQAYFLVADDMDKSITRRGQPCWYKYPEVGEIAINDAFMLEAAIYKLLKSHFRNEKYIIDITELFHEVTFQTELGQMLDLITAPEDKV 180
*****
DLSKFSLKHSFIVTFKTAIYYSFYLPVALAMYVAGITDEKDLKQARDVLIPLGEYFQIQDDYLDCFGTPEIQIGKIGTDIQDNKCSWVINK 270
DLSKFSLKHSFIVTFKTAIYYSFYLPVALAMYVAGITDEKDLKQARDVLIPLGEYFQIQDDYLDCFGTPEIQIGKIGTDIQDNKCSWVINK 270
*****
ALELASAEQRKTLDENYGKKDSVAEAKCKKIFNDLKIEQLYHEYEESIAKDLKAKISQVDESRGFKADVLTAFLNKVKRSK 352
ALELASAEQRKTLDENYGKKDSVAEAKCKKIFNDLKIEQLYHEYEESIAKDLKAKISQVDESRGFKADVLTAFLNKVKRSK 352
*****

```

Figura 31. Alineamiento de las secuencias del gen *ERG20* de la cepa T₇₃ y S288C. (A) Secuencia de nucleótidos del gen *ERG20*. (B) Secuencia de aminoácidos de la enzima FPPS. En la línea superior se muestra la secuencia correspondiente a la cepa S288C y en la línea inferior la de la cepa T₇₃.

Así pues, una vez conocido el número de copias del gen *ERG20* en la cepa T_{73} , y que esto no esclarece el por qué de su mayor capacidad para producir monoterpenos, se decidió secuenciar la región codificante de dicho gen y compararla con la de la cepa de referencia S288C para averiguar si existen polimorfismos que pudieran ocasionar una reducción de la actividad FPPS (Figura 31A). Para ello el locus *ERG20* se amplificó por triplicado con los oligonucleótidos ERG20del1 y ERG20del2 utilizando como molde ADN genómico de la cepa T_{73} y los tres amplicones se secuenciaron independientemente utilizando los cebadores ERG20ND y ERG20NR además de los mencionados ERG20del1 y ERG20del2 para cotejar los cambios en la secuencia y evitar considerar como polimorfismos los posibles errores introducidos en la propia reacción de amplificación.

Se hallaron siete polimorfismos puntuales en la secuencia del gen *ERG20* de la cepa T_{73} cuando se alineó frente a la secuencia de la cepa de referencia con el programa de análisis de secuencias ClustalW. Para comprobar si estas mutaciones eran silenciosas o no, se llevó a cabo la traducción *in silico* de la proteína Erg20p de T_{73} y se comparó su secuencia con la depositada en la base de datos de *S. cerevisiae* (SGD) y no se observaron cambios entre las cepas S288C y T_{73} a nivel de la secuencia proteica de la enzima FPPS (Figura 31B).

Se comparó además el uso de los codones modificados en la secuencia de la cepa T_{73} con el de los presentes en la cepa de referencia y se determinó que en todos los casos la frecuencia de uso es igual o mejor en la cepa T_{73} . A la vista de estos análisis parece que, al menos a nivel estructural, no existe relación entre la mejora observada en la producción de linalol y la secuencia de la proteína Erg20p o la eficiencia de su traducción. Estos resultados indican además que el gen *ERG20* de la cepa vínica T_{73} no ha sufrido grandes modificaciones en el proceso de adaptación de la levadura vínica a los procesos de fermentación industrial y dado que ninguno de los aspectos estudiados en el presente trabajo sugieren la existencia de una disminución de la actividad FPPS en esta cepa, es de esperar que la mejora de la capacidad productora de monoterpenos se encuentre relacionada con otras modificaciones.

II.3.6. La coexpresión del alelo *cat hmg1* o el gen *IDII* junto con el gen *LIS* en cepas hemizigotas para el gen *ERG20* tiene un efecto sinérgico sobre la producción de linalol

La reducción al 50% de la dosis del gen *ERG20*, que supuestamente conlleva una reducción de la transcripción y de la actividad FPPS, ha resultado ser una estrategia efectiva para mejorar la disponibilidad de GPP para la producción de monoterpenos en cepas diploides de laboratorio, por eso se decidió combinar

ésta con otras modificaciones empleadas con éxito para aumentar el flujo de la ruta MVA (sobreexpresión del alelo ^{cat}*hmg1* o sobreexpresión del gen *IDII* - apartados II.1 y II.2 de Resultados y Discusión respectivamente) para averiguar si la capacidad de *S. cerevisiae* para producir monoterpenos se puede incrementar más todavía. Para ello, la cepa Y21258 (*ERG20/erg20::kanMX4*) se transformó con los plásmidos YEp195Lis_Hmg y YEp195Lis_Idi y la producción de linalol de las cepas transformantes se cuantificó y comparó con la de la cepa YR316 (Y21258Lis 62,91 ± 8,32 µg/L). Los transformantes YR318 e YR319 (YEp195Lis_Hmg) alcanzaron niveles de linalol de 146,92 ± 20,14 µg/L (Figura 32A), lo que supone aproximadamente el doble de la concentración obtenida con la cepa control Y21258Lis, y más importante, 10 veces por encima del linalol acumulado al expresar el gen *LIS* en la cepa parental BY4743 (14,68 ± 0,84 µg/L). Este resultado demuestra que la sobreexpresión del alelo ^{cat}*hmg1* y la disminución del número de copias del gen *ERG20* tienen un efecto sinérgico en lo relativo a la mejora en la capacidad de *S. cerevisiae* para producir monoterpenos.

En lo relativo a la sobreexpresión del gen *IDII*, las cepas YR398 e YR399 (Y21258 YEp195Lis_Idi) se cultivaron en medio rico YPD y la cantidad de linalol que se acumuló en estas condiciones (media - 146,73 ± 19,60 µg/L) era comparable a la anterior, duplicando la de la cepa control YR316 (Figura 32A). Se comprobó de este modo que la reducción de la actividad FPPS es también compatible con el aumento de la isomerización de IPP a DMAPP, y que la combinación de estas dos estrategias permite mejorar la disponibilidad de GPP frente a la que se consigue de manera individual (BY4743Lis_Idi - 47,80 ± 8,05 µg/L; BY4743Lis_ *ERG20/erg20::kanMX4* - 67,97 ± 9,87 µg/L).

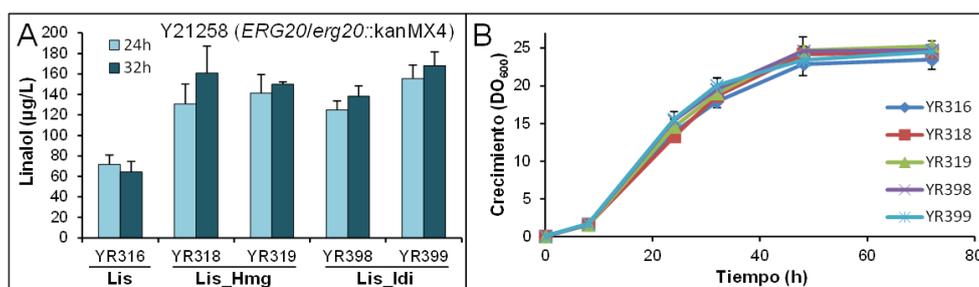


Figura 32. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de la enzima ^{cat}Hmg1p o del gen *IDII* en la cepa Y21258Lis. (A) Histograma del linalol acumulado en los sobrenadantes de los caldos de cultivo de la cepa control Y21258Lis y dos transformantes independientes portadores de los plásmidos YEp195Lis_Hmg y YEp195Lis_Idi. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de Y21258 transformadas con los plásmidos YEp195Lis (YR316), YEp195Lis_Hmg (YR318 e YR319) y YEp195Lis_Idi (YR398 e YR399). Estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol.

Estos resultados muestran la eficiencia de combinar la sobreexpresión de genes de la parte alta de la ruta MVA con la regulación a la baja de la actividad FPPS, y abre la posibilidad para aplicar estas modificaciones en otras cepas con potencial aplicación industrial y/o con una mayor capacidad inherente para producir monoterpenos, como la cepa vínica T₇₃-4 en la que, puesto que se ha determinado la presencia de dos alelos *ERG20*, se podría eliminar uno de ellos para mejorar más si cabe su capacidad para producir monoterpenos. Además, aunque en el apartado II.2 se muestra la ineficacia de sobreexpresar conjuntamente el alelo *hmg1*_{cat} y el gen *IDII* en fondo genético silvestre, es posible que esta combinación resultara útil para mejorar la producción de monoterpenos en el fondo genético con la actividad FPPS reducida dado que la capacidad para consumir GPP se encuentra comprometida en estas cepas. Todos los transformantes alcanzaron valores de densidad óptica similares y sus tasas de crecimiento fueron idénticas (Figura 32B), lo cual indica nuevamente que ni las cantidades de linalol ni las modificaciones introducidas en la ruta MVA tienen efectos adversos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en estas condiciones.

II.3.7. La producción de linalol se incrementa en cepas haploides *erg20::kanMX4* cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo *erg20-2*

En apartados anteriores del presente capítulo se ha mostrado cómo afecta la modulación de la expresión del gen silvestre *ERG20* a la capacidad de producir monoterpenos heterólogos en *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos sugieren que cuanto menor es la actividad FPPS, la capacidad de las monoterpeno sintasas heterólogas para desviar el flujo de la ruta MVA, desde GPP hacia la formación de monoterpenos, es mayor. Teniendo en cuenta estos antecedentes, junto con el hecho de que la actividad endógena FPPS es capaz de anular el posible efecto derivado de sobreexpresar el alelo *erg20-2*, se decidió eliminar el alelo silvestre *ERG20* para que todo el flujo de la ruta se canalice a través de la enzima modificada en el centro activo (en adelante FPPS_K197E). Para ello, la ausencia del gen endógeno *ERG20* (cuya delección en condiciones normales resulta en un fenotipo de letalidad en *S. cerevisiae*) se complementó con el plásmido YEp195Lis_erg2 (que contiene el casete de expresión del gen *LIS* de *C. breweri* junto con el del alelo mutante *erg20-2*), de modo que las células haploides que hereden el alelo *erg20::kanMX4* dispondrían únicamente de la enzima FPPS_K197E y necesitarían mantener este plásmido en un número de copias suficiente para complementar la delección.

La cepa YR366 (genotipo relevante *ERG20/erg20::kanMX4*, YEp195Lis_erg2) se sometió a un proceso de esporulación y selección de esporas del que se aislaron las cepas haploides protótrofas para uracilo YR410; YR412; YR414 e YR415, cuyo locus *ERG20* se caracterizó mediante PCR con los oligonucleótidos ERG20del1 y ERG20del2 (Figura 33A) y las producciones de linalol de estas 4 cepas fueron ensayadas y cuantificadas. Las cepas que heredaron el alelo *ERG20* (YR414 e YR415) produjeron cantidades de linalol (media $15,37 \pm 2,11$ $\mu\text{g/L}$) similares a las obtenidas al expresar el gen *LIS* en la cepa diploide parental BY4743 (homocigota para *ERG20*); mientras que la cantidad de linalol detectada en los caldos de las cepas haploides que heredaron el alelo *erg20::kanMX4* (YR410 e YR412) fue más de 50 veces superior, alcanzando valores de $878,59 \pm 116,82$ $\mu\text{g/L}$ (Figura 33B).

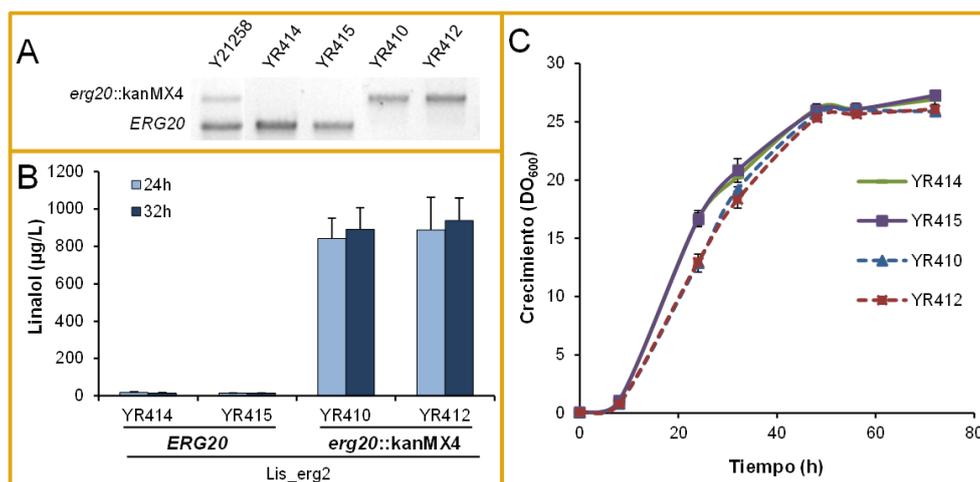


Figura 33. Incremento de la producción de linalol mediante la complementación de la delección del gen *ERG20* con el alelo *erg20-2*. (A) Análisis genético del locus *ERG20* en cepas haploides derivadas de Y21258. (B) Histograma del linalol acumulado en los sobrenadantes de los caldos de cultivo de las cepas haploides portadoras del plásmido YEp195Lis_erg2. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. (C) Curvas de crecimiento de las cepas empleadas en el panel B; estos cultivos se utilizaron para la cuantificación de linalol.

Los resultados obtenidos con las cepas haploides que heredaron el gen silvestre *ERG20* muestran una reversión de la mejora en la producción de monoterpenos existente en las cepas Y21258Lis, hemizigotas para *ERG20*, reforzando la hipótesis de que lo que provoca una mayor

disponibilidad de GPP no es la disminución del número de copias del gen en sí, sino la relación de éste con respecto a otros genes de la ruta (como por ejemplo *HMG1* e *ID11*). Por otra parte, las cepas que al haber heredado el alelo *erg20::kanMX4* necesitaban complementar la falta de actividad FPPS con el alelo *erg20-2* presente en el plásmido episomal, mostraron un incremento de la producción de linalol muy por encima de lo esperado. Según está descrito, esta mutación cambia la proporción de GPP:FPP de 1:3 a 7:3 (Blanchard y Karst, 1993), por lo que las cepas con la función FPPS complementada con el alelo *erg20-2* tendrían unas 7 veces más GPP. Si la producción de linalol fuera directamente proporcional a la cantidad de GPP, la cantidad de linalol detectada sería de unos 110 µg/L en lugar de los 870 µg/L alcanzados. La mejora obtenida es además muy superior a la descrita en el año 2007 por Oswald *et al.*, en cuyo trabajo obtuvieron producciones de geraniol que duplicaban las de las cepas haploides *ERG20* utilizadas como control. Como ya se ha comentado, la principal diferencia con este trabajo estriba en que utilizaron plásmidos independientes para sobreexpresar el alelo *erg20-2* y el gen *GES*, lo que a la vista de los resultados obtenidos puede resultar crucial. En nuestro estudio el gen *LIS* se expresó desde el mismo plásmido que el alelo *erg20-2*, lo cual puede ir en beneficio de la estabilidad del gen que codifica la monoterpene sintasa y probablemente también de su expresión, dado que el alelo *erg20-2* al complementar débilmente la pérdida de función FPPS, podría estar forzando un incremento en el número de copias del plásmido, lo que se estableció como una estrategia eficaz para mejorar la producción de monoterpenos en el apartado I.2 de Resultados y Discusión. El rendimiento obtenido al incrementar la dosis del gen *LIS* en cepas haploides de laboratorio con el marcador de complementación débil *LEU2-d* resultó ser unas 5 veces mayor al obtenido con un plásmido episomal multicopia estándar portador del marcador de selección *URA3*. Por lo tanto, el efecto de un posible aumento en la dosis del gen *LIS* añadido al incremento de las moléculas de GPP disponibles al complementar con la enzima FPPS_K197E podría explicar el gran incremento observado en la producción de linalol de las cepas *erg20::kanMX4* complementadas con el plásmido YEp195Lis_erg2 (YR410 e YR412).

Los transformantes YR410 e YR412 presentaron una tasa de crecimiento ligeramente inferior a la de las cepas silvestres para el gen *ERG20* (Figura 33C), lo cual sugiere que la sobreexpresión del alelo *erg20-2* (al igual que ocurría con la sobreexpresión del alelo *LEU2-d*; Figura 15A) no es suficiente para

complementar totalmente la pérdida de función FPPS en estas condiciones; aunque hay que tener en cuenta que, si existe un incremento en el número de copias del plásmido, este efecto puede deberse a un fenómeno de saturación metabólica o a la competencia de la monoterpene sintasa por el intermediario de la ruta MVA (GPP).

II.3.8. La sobreexpresión del alelo $_{cat}hmg1$ en cepas haploides $erg20::kanMX4$ cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo $erg20-2$ no aumenta la producción de linalol

La pérdida de la actividad endógena FPPS ha sido complementada con éxito con el alelo $erg20-2$ expresado desde un plásmido episomal que contiene el casete de expresión del gen *LIS* de *C. breweri*. Esta complementación resultó ser una estrategia efectiva para optimizar la sobreproducción de monoterpene, tal como lo había hecho la disminución de la dosis del gen *ERG20*, cuya combinación con la sobreexpresión desregulada del alelo $_{cat}hmg1$ daba lugar a un incremento aún mayor. Por ello, y para tratar de optimizar aún más la producción de monoterpene, se transformó la cepa merodiploide Y21258 con el plásmido YEp195Lis_erg2_Hmg y se seleccionaron las cepas YR320 e YR321. La producción de linalol de éstas (media $133,34 \pm 13,14$ $\mu\text{g/L}$) se comparó con la de las cepas control YR316 (Y21258Lis - $62,91 \pm 8,32$ $\mu\text{g/L}$) e YR366 (Y21258Lis_erg2 - $57,85 \pm 5,77$ $\mu\text{g/L}$) (Figura 34A) y se comprobó que la sobreexpresión del alelo $_{cat}hmg1$ en este fondo genético mantiene su capacidad para duplicar la producción de linalol cuando se coexpresa con el alelo $erg20-2$ y el gen *LIS* en cepas diploides (*ERG20/erg20::kanMX4*). La cepa YR320 (*ERG20/erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2_Hmg) se seleccionó para obtener esporas y las cepas haploides YR373 e YR375 (*ERG20* YEp195Lis_erg2_Hmg); YR370 e YR371 ($erg20::kanMX4$ YEp195Lis_erg2_Hmg) fueron aisladas y su producción de linalol cuantificada. Al comparar la cantidad de linalol producida por las cepas YR373 e YR375 (media $24,86 \pm 3,63$ $\mu\text{g/L}$) con la de la cepa YR415 (*ERG20* YEp195Lis_erg2 - $15,00 \pm 1,45$ $\mu\text{g/L}$) se corroboró el efecto positivo del alelo $_{cat}hmg1$ ($\sim 1,7x$) (Figura 34B) mientras el efecto del alelo $erg20-2$ se encuentra enmascarado por la actividad FPPS endógena. Tras estos ensayos preliminares en los que se confirmó la mejora relacionada con la sobreexpresión desregulada de la enzima Hmg1p en la cepa parental Y21258 (*ERG20/erg20::kanMX4*) y en las cepas haploides derivadas de su esporulación portadoras del alelo *ERG20*,

se procedió al análisis de las cepas YR370 e YR371 (*erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2_Hmg). La producción de linalol de éstas (media - $794,55 \pm 86,23$ $\mu\text{g/L}$) resultó ser ligeramente inferior ($\sim 10\%$) a la de la cepa YR410 (*erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2 - $878,59 \pm 116,82$ $\mu\text{g/L}$) (Figura 34C), que no sobreexpresa el alelo *cat**hmg1*, lo que sugiere que el incremento en el flujo de la ruta MVA, consecuencia de la sobreexpresión desregulada de la enzima Hmg1p, no puede ser aprovechado por la enzima mutante codificada por el alelo *erg20-2*, probablemente porque el flujo se encuentre de por sí incrementado en ausencia del alelo *cat**hmg1* para suplir las carencias de la enzima FPPS_K197E. Otra posible explicación podría ser que la capacidad inherente de la enzima S-linalol sintasa de *C. breweri* no le permitiese utilizar más GPP del que ya está presente en la cepa YR410 y, como consecuencia, no se podrían producir cantidades mayores de linalol en esas condiciones.

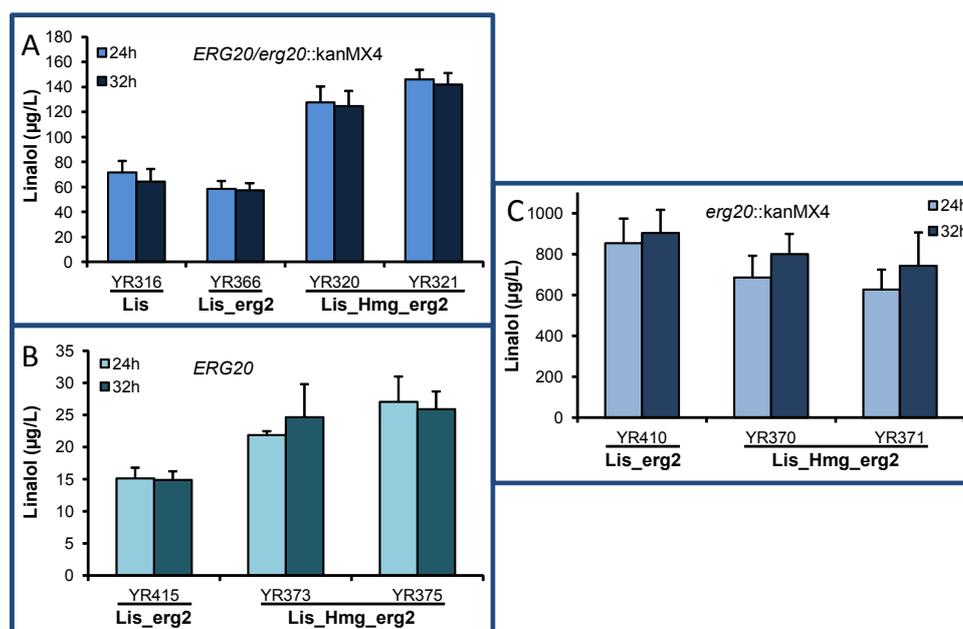


Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de los alelos *erg20-2* y *cat**hmg1* sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus *ERG20*. (A) Producción de linalol en cepas diploides hemizigotas para el gen *ERG20*. (B) Producción de linalol en cepas haploides que han heredado el alelo silvestre *ERG20*. (C) Producción de linalol en cepas haploides que han heredado el alelo mutante *erg20::kanMX4*. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

II.3.9. La sobreexpresión del gen *IDII* en cepas haploides cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo *erg20-2* mejora la producción de linalol

Tras el resultado negativo anterior, y teniendo en cuenta que la sobreexpresión del gen *IDII* en cepas hemizigotas para el gen *ERG20* tiene un efecto positivo sobre la producción de linalol, y que éste puede deberse a causas diferentes a la de producir más MVA y no retroinhibir Hmg1p, se decidió evaluar el efecto de sobreexpresar *IDII* en cepas cuya función FPPS está complementada por la sobreexpresión del alelo *erg20-2*.

La cepa Y21258 (*ERG20/erg20::kanMX4*) se transformó con el plásmido YEp195Lis_erg2_Idi, se seleccionaron las cepas YR470 e YR471 y su producción de linalol (media $93,78 \pm 12,77$ µg/L) se comparó con la de la cepa control YR366 (Y21258Lis_erg2 - $57,85 \pm 5,77$ µg/L) (Figura 35A). Tal y como se había mostrado, la sobreexpresión del gen *IDII* también provocó una mejora en la producción de linalol (~1,6x) al coexpresarlo con el alelo *erg20-2* y el gen *LIS* en este fondo genético. La cepa YR470 (*ERG20/erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2_Idi) se seleccionó para generar las cepas haploides YR474 e YR476 (*ERG20*); YR477 e YR479 (*erg20::kanMX4*) y evaluar su capacidad para producir linalol. La cantidad de linalol acumulada por las cepas YR474 e YR476 (*ERG20* YEp195Lis_erg2_Idi - $55,69 \pm 6,98$ µg/L) se comparó con la de la cepa YR415 (*ERG20* YEp195Lis_erg2 - $15,00 \pm 1,45$ µg/L), observándose una mejora debida a la sobreexpresión del gen *IDII* por encima de 3 veces en las cepas haploides con fondo genético *ERG20* (Figura 35B). Una vez constatado el efecto positivo de la sobreexpresión del gen *IDII* en cepas que conservan total o parcialmente la función FPPS silvestre, se procedió al análisis de las cepas YR477 e YR479 (*erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2_Idi), cuya producción de linalol (media $1144,68 \pm 139,40$ µg/L) mostraba un incremento cercano al 25% sobre la de la cepa YR410 (*erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2 - $903,43 \pm 112,82$ µg/L) a las 32 horas de cultivo (Figura 35C). Este incremento, aunque moderado, mostró ser significativo cuando se aplicó un análisis estadístico ANOVA ($P < 0,05$) y demuestra que la linalol sintasa sí que es capaz de producir cantidades mayores de linalol que las obtenidas en el apartado anterior, por lo que la falta de incremento al combinar los alelos *hmg1* y *erg20-2* no se debería a la actividad monoterpeno sintasa.

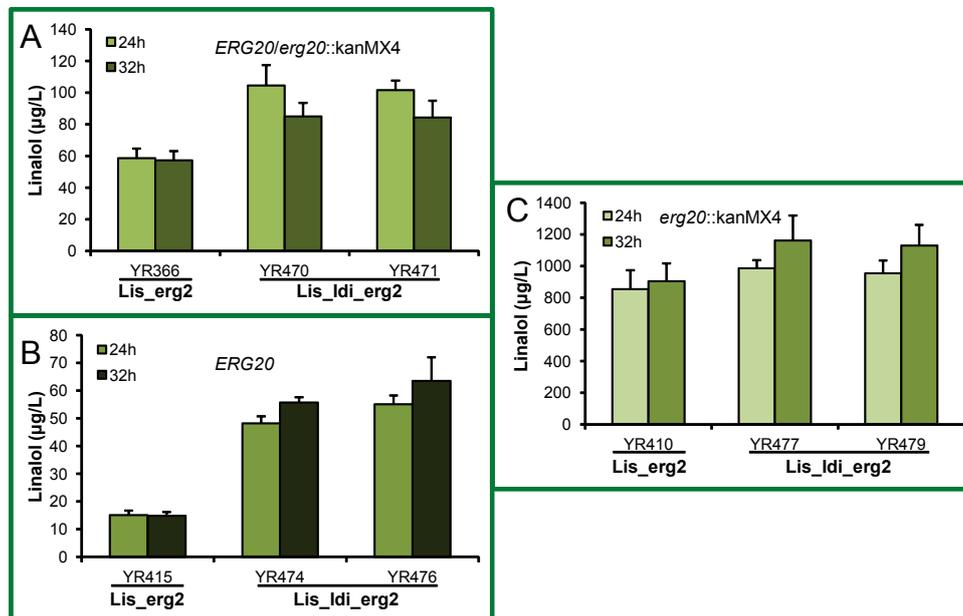


Figura 35. Efecto de la sobreexpresión de los alelos *erg20-2* e *IDII* sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus *ERG20*. (A) Producción de linalol en cepas diploides hemizigotas para el gen *ERG20*. (B) Producción de linalol en cepas haploides que han heredado el alelo silvestre *ERG20*. (C) Producción de linalol en cepas haploides que han heredado el alelo mutante *erg20::kanMX4*. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y las barras de error representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por otra parte, el incremento relacionado con la sobreexpresión del gen *IDII* es muy inferior al obtenido en las cepas que conservan el alelo silvestre *ERG20* (25% vs 270%), lo cual puede deberse a que el límite máximo de mejora se encuentre próximo a estos valores dada la limitada actividad de síntesis de FPP y la necesidad de la levadura de sintetizar este compuesto para proseguir con la ruta del ergosterol. Sin embargo, el hecho de que ambas estrategias (*IDII* y *erg20-2*) estén orientadas a favorecer la disponibilidad de GPP probablemente limitando la síntesis de FPP podría también justificar esta disminución del efecto de la sobreexpresión del gen *IDII* en el fondo *erg20::kanMX4*.

Teniendo en cuenta todos estos resultados parece evidente que el paso más limitante para la producción de monoterpenos es el catalizado por la enzima FPPS y, como consecuencia, las modificaciones practicadas a este nivel han mostrado ser muy efectivas para mejorar la producción heteróloga de monoterpenos en *S. cerevisiae*. Sin embargo, las cepas con mayor

capacidad productora presentan algunas limitaciones en cuanto a su tasa de crecimiento, lo que probablemente sería un inconveniente para algunas aplicaciones biotecnológicas. A pesar de ello, queda claro que *S. cerevisiae* tiene un gran potencial para producir monoterpenos de plantas y además presenta un amplio rango de mejora cuando se aplican las estrategias de ingeniería metabólica adecuadas. Como muestra de ello, en este trabajo se ha alcanzado una mejora global de 80 veces, desde una producción de linalol en la cepa BY4743 (*ERG20/ERG20* YEp195Lis) de $14,51 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$, hasta los $1144,68 \pm 139,39 \mu\text{g/L}$ detectados en las cepas YR477 e YR479 (*erg20::kanMX4* YEp195Lis_erg2_Idi) (Figura 36). Además, otras estrategias dieron lugar a producciones intermedias, lo que permitiría generar una batería de cepas que podrían ser seleccionadas para distintas aplicaciones en función de sus niveles de producción de monoterpenos.

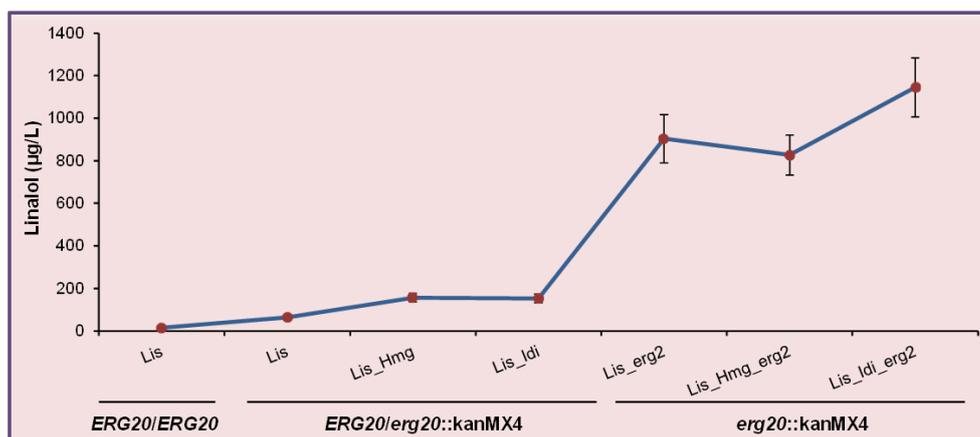


Figura 36. Mejora global de la producción de linalol a partir de la cepa de laboratorio BY4743. Las muestras se tomaron a las 32 horas de cultivo en YPD. Los valores representados corresponden a la producción media de 2 cepas de cada genotipo y las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

III. MODULACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DEL VINO MEDIANTE FERMENTACIÓN CON CEPAS MODIFICADAS DE *S. CEREVISIAE* PRODUCTORAS DE *NOVO* DE MONOTERPENOS

Sinopsis

Los mostos de uva contienen monoterpenos entre otros terpenoides que influyen en el aroma final de los vinos, y cuya concentración depende de la variedad de uva y de las condiciones de cultivo. La levadura *S. cerevisiae* no excreta eficientemente estos compuestos, fundamentalmente debido a que carece de monoterpeno sintasas específicas, por lo que los vinos fermentados a partir de ciertos mostos presentan un perfil monoterpénico escaso o nulo. Por ello, hemos construido levaduras derivadas de la cepa vínica industrial T₇₃, que expresan los genes *LIS* (codifica linalol sintasa) de *Clarkia breweri* o *GES* (codifica geraniol sintasa) de *Ocimum basilicum* bajo el control de los promotores de los genes *TDH3* y *ACT1* respectivamente, con las que se han realizado experimentos de microvinificación a partir de mosto de la variedad neutra Parellada. Las concentraciones de linalol y geraniol en estos vinos se encontraban por encima de sus umbrales de percepción olfativa, sin perjuicio de la capacidad fermentativa de la levadura o de otras propiedades del vino. La producción de geraniol derivó además en un proceso de dispersión metabólica hacia otros monoterpenos (linalol, citronelol, nerol) y ésteres (geranil y citronelil acetato) aromáticos. Se demuestra además que es posible modular la concentración de estos terpenoides en vino manipulando la expresión de genes de la ruta MVA (p. ej. sobreexpresando *IDII*) y/o realizando fermentaciones mixtas con cepas productoras y no productoras.

Antecedentes

El aroma es una de las características más importantes a la hora de valorar la calidad de los vinos y varios centenares de compuestos que podrían influir en su percepción aromática han sido identificados tanto en las uvas como en el propio vino (Schreier, 1979). Entre estos compuestos se encuentran algunos monoterpenos como geraniol y linalol, considerados importantes para determinar el llamado aroma primario, varietal o prefermentativo, por

encontrarse en altas concentraciones en algunas variedades de uva y tener un umbral de percepción olfativa relativamente bajo, 4-75 y 4-10 ppb respectivamente, que es bastante inferior al de otros monoterpenos mayoritarios como nerol (680-2.200 ppb) y α -terpineol (280-350 ppb) (Feranoli, 2002). Estos monoterpenos son importantes en el aroma de los vinos jóvenes tipo moscatel, al que aportan notas dulces y florales, pero se encuentran en concentraciones muy bajas en los mostos procedentes de otras variedades no aromáticas de *Vitis vinifera* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

Los monoterpenos se encuentran en la uva tanto en forma libre como conjugada, en forma de glicósidos no aromáticos (precursores), y la hidrólisis enzimática de estos conjugados ocasiona un incremento de la concentración de monoterpenos volátiles (Williams *et al.*, 1982; Günata *et al.*, 1985). Hasta la fecha se han desarrollado distintas estrategias biotecnológicas para aumentar el contenido terpénico, y por tanto el aroma, del vino mediante la adición de preparaciones enzimáticas para la liberación del aglicón (Günata *et al.*, 1993; van Rensburg y Pretorius, 2000) o vinificando con levaduras transgénicas capaces de producir estas actividades durante el proceso fermentativo (Pretorius y Bauer, 2002; Manzanares *et al.*, 2003; Ramón *et al.*, 2005; Schuller y Casal, 2005; Zietsman *et al.*, 2011). Sin embargo, el éxito de estas estrategias depende de la concentración inicial de monoterpenos conjugados, por lo que resultan poco efectivas cuando se utilizan mostos procedentes de variedades neutras, con un contenido terpénico escaso o nulo. En estos casos, la utilización de cepas de levadura capaces de sintetizar *de novo* monoterpenos de interés enológico podría ser una buena alternativa, tal y como se demostró por primera vez en nuestro grupo vinificando con cepas que expresan el gen *LIS* de *C. breweri* (Herrero *et al.*, 2008). Esta manipulación metabólica es posible porque en las plantas los monoterpenos, incluidos los de interés enológico, se producen a partir de GPP en un sólo paso (catalizado por distintas monoterpeno sintetas, cuyos genes han sido identificados) y éste es, en *S. cerevisiae*, un intermediario en la ruta de síntesis de ergosterol.

Por otra parte, la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* ha resultado en la producción de cantidades relevantes de geraniol (Oswald *et al.*, 2007; este trabajo); y la concentración de éste cuando se expresaba *GES* en la cepa vínica T₇₃-4 era muy superior a la concentración de linalol cuando se expresaba el gen *LIS*. Las cantidades de geraniol producidas por la cepa T₇₃-4 en medio YPD no sólo estaban muy por encima de su umbral de percepción sino que, a pesar de que la enzima geraniol sintasa produce específicamente geraniol cuando se ensaya su actividad *in vitro* (Iijima *et al.*, 2004) y cuando se expresa en bacterias lácticas

(Pardo, Monedero y Orejas, sin publicar), las actividades enzimáticas de las levaduras eran capaces de metabolizar el geraniol (apartado I.1 de Resultados y Discusión), lo que originaba un proceso de dispersión metabólica hacia otros monoterpenos y ésteres aromáticos similar al que ocurre al expresar el gen *GES* en tomate (Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007), o al suplementar con geraniol cultivos de *S. cerevisiae* (King y Dickinson, 2000; Gamero *et al.*, 2011). La aparición de estos monoterpenos derivados del geraniol, concretamente linalol y citronelol, podría incrementar su percepción aromática en los vinos producidos, tal como se ha descrito recientemente para la percepción del aroma de la cerveza (Takoi *et al.*, 2010).

Por ello, y teniendo en cuenta que la producción *de novo* de linalol es inferior en condiciones de vinificación que en medio sintético YPD (Herrero *et al.*, 2008) y que la expresión de los genes que codifican las actividades enzimáticas implicadas en las bioconversiones del geraniol y derivados puede ser diferente en condiciones de vinificación, se pretende estudiar si los vinos producidos por la cepa T₇₃-4 que expresa el gen *GES* de *O. basilicum* contienen concentraciones de geraniol por encima de su umbral de percepción olfativa, y caracterizar el perfil aromático eventualmente generado a raíz de la dispersión del geraniol a otros compuestos. Además, puesto que la aplicación de estrategias de ingeniería metabólica en la ruta MVA de la cepa T₇₃-4 es efectiva para aumentar los niveles de monoterpenos (apartado II de Resultados y Discusión); por ejemplo, tras la sobreexpresión del gen *IDII* se triplicaba la producción de éstos sin afectar al crecimiento de la levadura, se decidió incluir también las cepas modificadas en este paso de la ruta MVA en los ensayos de microvinificación para caracterizar su efecto sobre la producción de linalol y geraniol en estas condiciones.

III.1. Ensayos de microvinificación con la cepa vínica T₇₃-4 de *S. cerevisiae* que expresa el gen *GES* de *O. basilicum*

III.1.1. La expresión del gen *GES* de *O. basilicum* no afecta a la capacidad fermentativa de la cepa vínica T₇₃-4 de *S. cerevisiae*

Para evaluar el potencial industrial de las cepas derivadas de T₇₃ modificadas para incrementar los niveles de geraniol en vino, se llevaron a cabo microvinificaciones con la cepa YR377, que expresa el gen *GES* de *O. basilicum* desde el plásmido YEp195Ges (Figura 6), y la cepa YR70, portadora del plásmido vacío YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988), que se utilizó como control de fermentación dado que está descrito que mantiene las características enológicas de la cepa industrial

T_{73} (Herrero *et al.*, 2008). Estas dos cepas se inocularon en mosto estéril de la variedad Parellada y se monitorizó el progreso de la fermentación. La tasa de crecimiento de las cepas YR70 (YEplac195) e YR377 (YEp195Ges) fue similar y ambas alcanzaron los mismos valores de densidad óptica (Figura 37A). El consumo de azúcares, cuya evolución se siguió con un refractómetro ($^{\circ}$ Brix), fue también similar en ambas cepas (Figura 37B), estabilizándose en torno a los 5° Brix alrededor del día 15 de fermentación; a partir de ese momento el consumo de azúcares se cuantificó por el método de Nelson-Somogyi (Nelson, 1944), alcanzándose valores por debajo de los 2 g/L (vino seco) el día 19. Estos resultados indican que ni la expresión del gen *GES* de *O. basilicum*, ni la producción de monoterpenos que de ella pueda derivarse afecta al crecimiento o a la capacidad fermentativa de la cepa T_{73} en condiciones de microvinificación y dejan abierta la posibilidad de aplicar esta modificación de la cepa T_{73} a nivel industrial.

La permanencia del plásmido YEp195Ges en las células de levadura se evaluó por comparación del número de colonias que crecen en medio selectivo SD sin uracilo y en medio completo YPD; el 83% de las células viables al finalizar la fermentación fueron capaces de crecer en ausencia de uracilo, demostrando que el plásmido que contiene el casete de expresión $ACT1_p::GES::HIS3_t$ se mantiene a lo largo del proceso de fermentación vínica, lo que está de acuerdo con la tasa de permanencia (82%) descrita en 2008 por Herrero *et al.*, para el plásmido que contiene el casete de expresión de la linalol sintasa de *C. breweri*.

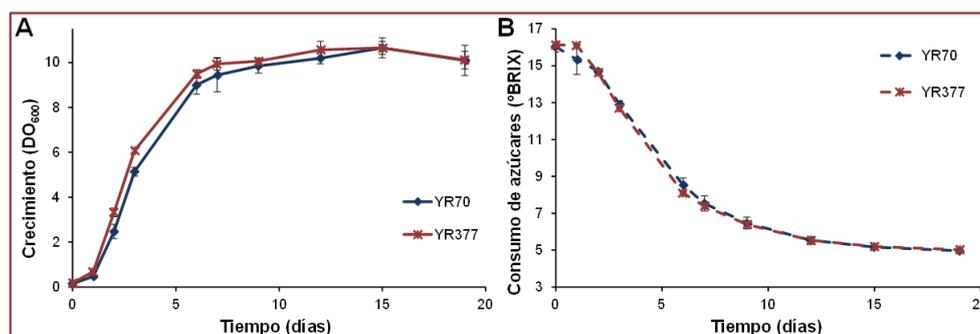


Figura 37. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T_{73} que expresan el gen *GES* de *O. basilicum*. (A) Curvas de crecimiento de las cepas YR70 (YEplac195) e YR377 (YEp195Ges). (B) Consumo de azúcares en las cepas YR70 (YEplac195) e YR377 (YEp195Ges).

La expresión heteróloga de la geraniol sintasa podría tener por contrapartida la modificación del metabolismo de la levadura, lo que podría ser contraproducente

para la calidad del vino producido por la cepa modificada. Por ello, se realizó un análisis metabolómico parcial de los vinos y se constató que las concentraciones de ciertos compuestos de interés enológico como el etanol y el glicerol eran similares en los vinos producidos por ambas cepas (Tabla 12). La presencia de alcoholes superiores y sus ésteres (2-fenil etanol –que aporta aroma a rosas– umbral de percepción 14 mg/L; acetato de isoamilo –aroma a plátano– umbral de percepción 30 µg/L; acetato de 2-feniletilo –aroma a rosas– umbral de percepción 250 µg/L) (Ferreira, 2000; Guth, 1997) y de ésteres de etilo de ácidos grasos (hexanoato de etilo –aroma a manzanas y violetas– umbral de percepción 80 µg/L; octanoato de etilo –aroma a pera y piña– umbral de percepción 260-580 µg/L; decanoato de etilo –aroma floral– umbral de percepción 500 µg/L) (Boulton *et al.*, 1996), cuya presencia se considera positiva para las propiedades aromáticas del vino, fue similar en los vinos fermentados con la cepa YR377 (YEp195Ges) e YR70 (YEplac195). Asimismo, las concentraciones de algunos de los metabolitos que pueden ser considerados negativos para las características organolépticas del vino, como el ácido acético, el acetaldehído o el acetato de etilo se mantuvieron en rangos cercanos en ambas fermentaciones. Estos resultados sugieren que la expresión del gen *GES* no afecta en gran medida al metabolismo general de *S. cerevisiae* en estas condiciones, y que los vinos producidos por esta cepa mantienen unos parámetros enológicos aceptables; por lo que se decidió proceder al análisis del efecto específico de dicha sobreexpresión sobre el perfil terpénico del vino producido.

Tabla 12. Análisis metabolómico parcial de los vinos producidos por las cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T₇₃-4 que expresan el gen *GES* de *O. basilicum*.

	YR70 (YEplac195)	YR377 (Yep195Ges)
Etanol (%)	8,74 ± 0,09	9,38 ± 0,34
Glicerol (g/L)	3,90 ± 0,19	3,87 ± 0,45
2-Fenil etanol (mg/L)	23,87 ± 3,39	26,73 ± 3,66
Acetato de isoamilo (mg/L)	0,98 ± 0,23	1,11 ± 0,18
Acetato de 2-feniletilo	ND	ND
Hexanoato de etilo (mg/L)	0,31 ± 0,05	0,35 ± 0,02
Octanoato de etilo (mg/L)	0,38 ± 0,07	0,48 ± 0,04
Decanoato de etilo (mg/L)	0,11 ± 0,02	0,16 ± 0,04
Ácido acético (mg/L)	49,82 ± 7,34	45,24 ± 3,88
Acetaldehído (mg/L)	12,34 ± 1,46	16,06 ± 0,71
Acetato de etilo	ND	ND

ND = no detectado.

III.1.2. La expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en la cepa T_{73} -4 de *S. cerevisiae* da lugar a la producción de novo de seis caracteres varietales en el vino

La expresión del gen *GES* en la cepa vínica T_{73} -4 es una estrategia efectiva para la producción de cantidades relativamente grandes de geraniol (~8 mg/L) en condiciones de laboratorio (apartado I.1 de Resultados y Discusión). La producción de geraniol en estas condiciones derivó además en la aparición de otros monoterpenos (linalol, citronelol, nerol) y ésteres (geranil y citronelil acetato), que podrían complementar y/o incrementar su percepción aromática (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975; Takoi *et al.*, 2010). Por ello, una vez comprobado que la expresión de este gen no lastra la capacidad fermentativa de la levadura, ni altera en gran medida los parámetros enológicos del vino producido, se decidió analizar la fracción monoterpénica volátil de los vinos fermentados por las cepas productoras de geraniol para determinar si estos compuestos son producidos en estas condiciones y, en caso afirmativo, si su concentración se encuentra por encima del umbral de percepción y podrían por tanto modificar el aroma de los vinos producidos.

Para ello, los vinos producidos por las cepas modificadas de *S. cerevisiae* YR70 (YEplac195) e YR377 (YEpl195Ges), derivadas de T_{73} , se analizaron por GC y GC-MS y se determinaron las concentraciones de los picos diferenciales, correspondientes a geraniol, linalol, citronelol, nerol, geranil acetato y citronelil acetato. No se hallaron grandes cantidades de monoterpenos ni de sus ésteres en los vinos producidos por la cepa control YR70 (Tabla 13), tal como se esperaba dada la neutralidad de la variedad de uva. Sin embargo, al analizar los volátiles presentes en el vino producido por la cepa YR377 se observaron concentraciones de geraniol de $749,17 \pm 93,64 \mu\text{g/L}$, y de sus derivados citronelol ($526,35 \pm 67,17 \mu\text{g/L}$), linalol ($141,18 \pm 19,55 \mu\text{g/L}$), nerol ($12,62 \pm 1,03 \mu\text{g/L}$), geranil acetato ($12,84 \pm 1,51 \mu\text{g/L}$) y citronelil acetato ($116,32 \pm 12,23 \mu\text{g/L}$), lo que resultaba en una concentración total de terpenoides de $1558,48 \pm 195,13 \mu\text{g/L}$ (Tabla 13). Estos valores, a excepción de los obtenidos para el nerol y el citronelil acetato, se encuentran por encima de los umbrales de percepción establecidos para estos compuestos (Tabla 5). Estos resultados confirman la capacidad de *S. cerevisiae* para producir *de novo* cantidades relevantes de monoterpenos mediante la expresión de monoterpeno sintasas heterólogas en estas condiciones y, a diferencia de la expresión de la linalol sintasa que daba lugar a concentraciones limitadas de linalol (Herrero *et al.*, 2008), la expresión del gen *GES* conllevó la producción de grandes cantidades de geraniol y sus derivados hasta el punto de equiparar las concentraciones de terpenoles presentes en los vinos producidos a partir de mostos neutros a los que se encuentran en algunos mostos de variedades de uva

moscatel, de las que son característicos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975); lo que sugiere que la expresión de este gen es suficiente para incrementar las cantidades de monoterpenos hasta niveles lo suficientemente elevados como para modular la percepción aromática de los vinos producidos por las cepas modificadas. Por su parte la cantidad de linalol derivada de la producción de geraniol fue ampliamente superior a la obtenida al vinificar con la cepa que expresa el gen *LIS* de *C. breweri* (Herrero *et al.*, 2008; este trabajo); lo que, sumado a que, a diferencia del gen *LIS*, el gen *GES* proviene de una planta comestible, es una buena muestra del potencial de las cepas de *S. cerevisiae* modificadas con este transgen para modular el aroma de los vinos y eventualmente otras bebidas alcohólicas fermentadas.

Si nos fijamos en la producción total de volátiles derivados de la expresión del gen *GES* en condiciones de microvinificación ($1,56 \pm 0,19$ mg/L), se observa una caída en los niveles producidos frente a los obtenidos en los cultivos realizados en medio líquido YPD ($9,21 \pm 1,56$ mg/L); esta reducción en la producción de monoterpenos está en concordancia con los resultados descritos anteriormente al expresar la linalol sintasa de *C. breweri* (Herrero *et al.*, 2008), en los que la producción de linalol durante el proceso de vinificación fue también considerablemente inferior (unas 3 veces) a la obtenida en medio de laboratorio YPD. Este descenso podría deberse a una disminución del GPP disponible para ser utilizado por las monoterpeno sintasas heterólogas en condiciones de microvinificación, ya que los niveles intracelulares de los tres primeros compuestos de la ruta MVA dependen de la fuente de carbono, la fase de crecimiento y la tasa de crecimiento específica (Serker *et al.*, 2006) entre otros factores. Además, la expresión del gen *HMG1* se induce durante el crecimiento aeróbico, siendo diez veces superior en estas condiciones (Burg y Espenshade, 2011), por lo que en condiciones de microvinificación, en las que la oxigenación es limitada o nula, la expresión de este gen sería considerablemente inferior; lo que podría estar asociado con esta caída de los niveles de producción.

Tabla 13. Concentración de terpenoides detectada en vinos de la variedad Parellada fermentados con cepas derivadas de T₇₃.

	YR70 (YEplac195)	YR377 (YEplac195Ges)
Geraniol ^a	ND	749,17 ± 93,64
Linalol ^a	2,36 ± 0,41	141,18 ± 19,55
Nerol ^a	1,33 ± 0,06	12,62 ± 1,03
Citronelol ^a	2,27 ± 0,38	526,34 ± 67,17
Geraniil acetato ^a	ND	12,84 ± 1,51
Citronelil acetato ^a	0,81 ± 0,14	116,32 ± 12,23
Total ^a	6,77 ± 0,99	1558,48 ± 195,13

^aValores expresados en µg/L; ND = no detectado.

En relación a las proporciones de los compuestos derivados de la expresión del gen *GES*, lo primero que llama la atención es que mientras que en medio YPD el geraniol representaba aproximadamente el 90% del contenido terpénico total, en condiciones de microvinificación sólo la mitad de la concentración de los terpenoides detectados corresponde a geraniol. En estas condiciones, la conversión más importante observada es la que da lugar a la formación de citronelol, que supuso un tercio de los volátiles producidos. La conversión hacia linalol se incrementó 75 veces con respecto a la observada en medio de cultivo YPD alcanzando éste prácticamente el 10% de la concentración total de volátiles derivados del geraniol, mientras que la concentración de nerol cayó 20 veces, perdiendo prácticamente toda su representación en la mezcla (Tabla 14).

Estos cambios en las proporciones relativas en las que aparecen los distintos monoterpenos en condiciones de laboratorio y de microvinificación, pueden deberse a la duración del proceso de fermentación (YPD 24 horas – Vino 19 días), ya que la producción de monoterpenos se produce al inicio de la fase exponencial del crecimiento de la levadura, y por tanto éstos estarían disponibles para su conversión prácticamente desde el inicio de la fermentación (Herrero *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2010); las diferentes características fisico-químicas de estas condiciones (p. ej. pH y temperatura) podrían estar favoreciendo además la aparición de estas conversiones. El metabolismo de la levadura, y más concretamente el metabolismo del geraniol, podría verse también modificado por la concentración de oxígeno presente en el medio (Vaudano *et al.*, 2004).

Las esterificaciones del geraniol y el citronelol se ven también favorecidas en estas condiciones, incrementándose las proporciones de geranil y citronelil acetato ~5 y ~50 veces respectivamente (Tabla 14). La actividad de la enzima Atf1p de *S. cerevisiae* –implicada en la producción de geranil acetato (Steyer *et al.*, 2013)– podría verse incrementada en estas condiciones, ya que la expresión de los genes *ATF1* y *ATF2* está reprimida de forma directa por oxígeno (revisado por Verstrepen *et al.*, 2003) y como consecuencia, las condiciones de hipoxia en las que se realizan los ensayos de microvinificación podrían estar favoreciendo la acetilación de estos monoterpenos. Sin embargo, la acumulación de ésteres durante la fermentación vínica depende del equilibrio establecido entre su síntesis por las AATs y su degradación, catalizada por las hidrolasas de ésteres. La sobreexpresión de las AATs codificadas por los genes *ATF1* y *ATF2* conlleva un incremento de los ésteres acetato de isoamilo; acetato de etilo y acetato de 2-feniletilo (Fujii *et al.*, 1994; Lilly *et al.*, 2000) mientras que la

Tabla 14. Terpenoides derivados de la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* en la cepa T₇₃

	Geraniol ^a	Linalol ^a	Nerol ^a	Citronelol ^a	Geraniil acetato ^a	Citronellil acetato ^a	Total ^a
YPD	8276,88 ± 1425,53	10,56 ± 2,48	221,72 ± 43,26	671,93 ± 115,11	15,38 ± 4,59	11,53 ± 2,06	9208,00 ± 1564,86
Vino	749,17 ± 93,64	141,18 ± 19,55	12,62 ± 1,03	526,35 ± 67,17	12,84 ± 1,51	116,32 ± 12,23	1558,48 ± 195,13
	Geraniol ^b	Linalol ^b	Nerol ^b	Citronelol ^b	Geraniil acetato ^b	Citronellil acetato ^b	Total ^b
YPD	89,85 ± 0,82	0,12 ± 0,03	2,41 ± 0,26	7,32 ± 0,58	0,17 ± 0,04	0,13 ± 0,03	100
Vino	48,07 ± 2,31	9,06 ± 1,69	0,81 ± 0,07	33,77 ± 4,08	0,82 ± 0,10	7,46 ± 0,48	100

^a(μg/L); ^b(%).

sobreexpresión de la hidrolasa de ésteres Iah1p dio lugar al efecto contrario (Lilly *et al.*, 2006), por lo que una reducción de la hipotética actividad hidrolasa en condiciones de microvinificación podría explicar también los cambios observados. Una estrategia interesante para favorecer o reprimir la formación de estos ésteres (p. ej. geranil acetato) sería la modificación de la actividad de estas enzimas; incrementando de este modo nuestra capacidad para modular el aroma del vino en función de la concentración de estos compuestos.

III.2. Regulación de los niveles de terpenoides presentes en el vino mediante fermentación mixta y técnicas de ingeniería metabólica

III.2.1. La fermentación mixta con T_{73} -4Ges y cepas de *S. cerevisiae* no productoras de monoterpenos sirve para modular los niveles de terpenoides

La presencia de un determinado compuesto aromático en concentraciones elevadas puede ser perjudicial para la apreciación del mismo, bien de forma directa, porque la intensidad de su propio aroma pueda resultar desagradable, o indirecta, enmascarando o eliminando la percepción de otros compuestos que podrían aportar matices interesantes al aroma final. Por ello, dada la complejidad y la diversidad aromática de los vinos, sería bueno poder controlar de algún modo los niveles de monoterpenos obtenidos en la vinificación, para poder evitar que estos puedan llegar a ser excesivos y produzcan un efecto no deseado en el consumidor, además de poder elaborar así vinos cuyo contenido monoterpénico pueda ser predeterminado.

Con este objetivo y puesto que la fermentación de mosto de la variedad neutra Parellada con cepas derivadas de T_{73} que expresan el gen *GES* ha resultado en la obtención de vinos que contienen niveles considerables de geraniol y sus derivados, se diseñó un cultivo iniciador mixto con la cepa control YR70 de *S. cerevisiae*, para confirmar las propiedades de la levadura T_{73} -4Ges, y evaluar la posibilidad de modular la concentración de terpenoides mediante esta técnica. Para realizar esta vinificación se utilizó una mezcla 1:1 de las cepas YR70 (YEplac195) e YR377 (YEp195Ges), ambas derivadas de la cepa vínica industrial T_{73} , las fermentaciones se realizaron a partir de mosto estéril de la variedad Parellada (cosecha de 2008) y la fermentación siguió el mismo patrón que la fermentación control realizada con la cepa productora YR377 (Figura 38A). Las tasas de crecimiento fueron similares en ambas

fermentaciones, alcanzándose además valores idénticos de densidad óptica; el consumo de azúcares fue también equiparable, estabilizándose en torno a los 5°Brix alrededor del día 15 de fermentación. Ambas fermentaciones se dieron por finalizadas al alcanzarse concentraciones de azúcares por debajo de los 2 g/L el día 20.

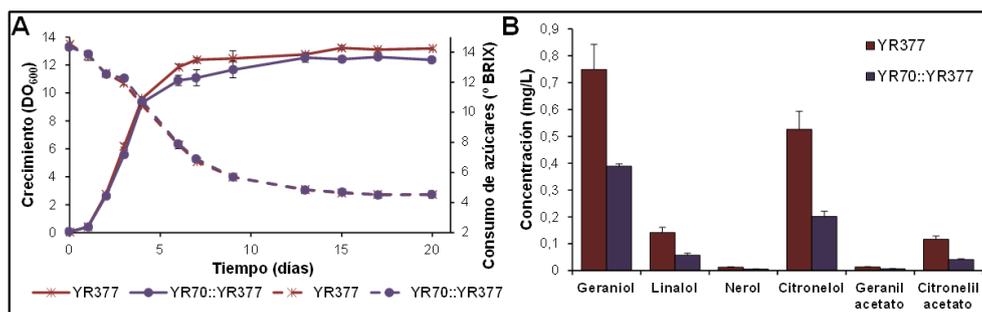


Figura 38. Efecto de la cofermentación con cepas de *S. cerevisiae* productoras y no productoras de geraniol. (A) Evolución de las fermentaciones realizadas con la mezcla YR70::YR377 (YEplac195::YEp195Ges; 1:1) e YR377 (YEp195Ges). (B) Concentración de monoterpenos en los vinos producidos por la mezcla YR70::YR377 y la cepa YR377. Los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

El perfil de volátiles derivado de la fermentación mixta se cuantificó y comparó con el del vino producido por la cepa YR377. Las cantidades detectadas de geraniol ($388,35 \pm 8,96 \mu\text{g/L}$), citronelol ($201,28 \pm 19,69 \mu\text{g/L}$), linalol ($57,19 \pm 7,76 \mu\text{g/L}$), nerol ($5,53 \pm 0,18 \mu\text{g/L}$), geraniol acetato ($5,90 \pm 1,34 \mu\text{g/L}$) y citronellil acetato ($40,68 \pm 3,32 \mu\text{g/L}$) (Figura 38B) dieron lugar a una concentración total de terpenoides ($698,93 \pm 41,25 \mu\text{g/L}$) de aproximadamente la mitad de la obtenida al vinificar con la cepa YR377 ($1558,48 \pm 195,13 \mu\text{g/L}$); lo cual se corresponde con la proporción de levadura productora inoculada. Este resultado sugiere que las concentraciones de terpenoides obtenidas por fermentación con cepas productoras de monoterpenos se pueden modular ‘à la carte’ por cofermentación con cepas no productoras, ya que la producción de estos metabolitos es proporcional al inóculo inicial de la cepa productora; por lo que se podrían establecer de antemano las concentraciones de monoterpenos en el vino final y decidir el inóculo en base a éstas. La cofermentación con otras cepas permitiría a su vez la modulación de otros aspectos o características del vino final (p. ej. producción de ésteres, glicerol, etc.); o incluso podría permitir la producción específica de varios monoterpenos iniciando la fermentación con un inóculo mixto incluyendo a levaduras que expresen otras monoterpeno sintetas para incrementar la complejidad del perfil monoterpénico generado por la expresión del gen *GES*, como por ejemplo la

α -terpineol sintasa de *Vitis vinifera*, descrita por Martin y Bohlmann en el año 2004. Alternativamente se podrían producir otros monoterpenos (p. ej. limoneno) que nos permitieran producir vinos que de otra forma solo podrían ser producidos por adición del compuesto de interés, aportando nuevos matices que reportaran variabilidad y novedad a la industria vitivinícola.

III.2.2. La sobreexpresión del gen *IDII* incrementa la producción de novo de terpenoides en condiciones de microvinificación

La expresión de los genes *LIS* de *C. breweri* (Herrero *et al.*, 2008) y *GES* de *O. basilicum* (este trabajo) en la cepa vínica T₇₃-4 deriva en la producción de cantidades relevantes de monoterpenos en condiciones de microvinificación. Sin embargo, existe una gran dependencia de la monoterpeno sintasa expresada; tal como se aprecia en la enorme diferencia en las cantidades de terpenoides acumuladas en los vinos producidos por las cepas modificadas T₇₃-4Lis y T₇₃-4Ges (~100x). Por ello, en previsión de que la expresión del gen que codifica la monoterpeno sintasa no fuera suficiente para producir un determinado monoterpeno en cantidad suficiente para obtener el efecto deseado sobre el aroma del vino, podría ser interesante la aplicación de estrategias de ingeniería metabólica en la ruta MVA orientadas a la mejora de la disponibilidad de GPP, y en consecuencia de la producción de monoterpenos, que fueron efectivas en condiciones de laboratorio. En este sentido, la sobreexpresión del gen *IDII* sirvió para incrementar hasta tres veces los niveles de monoterpenos producidos en medio líquido YPD por la cepa T₇₃-4 (apartado II.2 de Resultados y Discusión), por lo que la fermentación del mosto con levaduras portadoras de esta modificación podría ser una buena estrategia para incrementar los valores de los monoterpenos producidos en vino.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de microvinificación con las cepas YR332 (T₇₃-4 YEp195Lis_Idi) e YR379 (T₇₃-4 YEp195Ges_Idi), así como con sus correspondientes controles. La capacidad fermentativa de la cepa YR332 se comparó con la de las cepas YR70 (T₇₃-4 YEplac195) e YR162 (T₇₃-4 YEp195Lis), y la concentración de linalol presente en los vinos producidos por esta última ($10,61 \pm 0,87 \mu\text{g/L}$) se utilizó como referencia para determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *IDII* sobre la producción de monoterpenos en procesos de microvinificación. La cinética de consumo de azúcares de la cepa YR332 fue similar a la de las cepas control y todas las cepas alcanzaron valores de densidad óptica similares (Figura 39A), lo que indica que ni la sobreexpresión conjunta de los genes *IDII* y *LIS* ni los

niveles de monoterpenos alcanzados afectan a la capacidad fermentativa de la cepa T_{73} -4; siendo además similares los valores de etanol (v/v) al final de la fermentación (YR70 – $7,95 \pm 0,33\%$; YR162 – $8,65 \pm 0,23\%$; YR332 – $8,80 \pm 0,67\%$). Por su parte, la producción de linalol de la cepa YR332 ($34,11 \pm 3,41 \mu\text{g/L}$) alcanzó valores 3 veces por encima de los cuantificados en los vinos producidos por la cepa YR162 (T_{73} -4 YEp195Lis) (Figura 39B). Este resultado muestra que la sobreexpresión del gen *IDII* mantiene su capacidad para incrementar la producción de linalol en condiciones de vinificación.

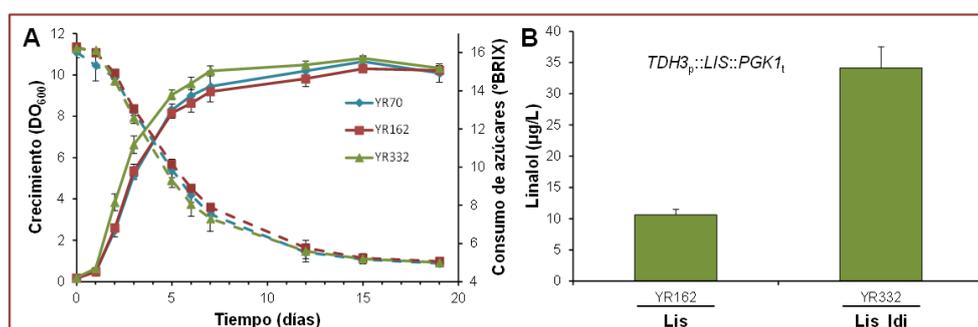


Figura 39. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T_{73} que sobreexpresan conjuntamente los genes *IDII* y *LIS*. (A) Curvas de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares (línea discontinua) de las cepas YR70 (YEp195); YR162 (YEp195Lis) e YR332 (YEp195Lis_Idi). (B) Concentración de linalol en los vinos producidos por las cepas YR162 (YEp195Lis) e YR332 (YEp195Lis_Idi). Los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Para corroborar estos resultados y establecer la capacidad de mejora de la producción de geraniol y derivados en condiciones de microvinificación que se obtendrían tras la sobreexpresión del gen *IDII* se diseñaron ensayos similares a los anteriores, utilizando las cepas YR379 (T_{73} -4 YEp195Ges_Idi), YR70 (T_{73} -4 YEp195) e YR377 (T_{73} -4 YEp195Ges). Las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares de la cepa YR379 fueron también similares a las de sus cepas control YR70 e YR377 (Figura 40A y B), lo que indica que ni la sobreexpresión conjunta de los genes *IDII* y *GES* ni los niveles de monoterpenos alcanzados afectan negativamente a la capacidad de la cepa T_{73} -4 para la fermentación vínica. La concentración de etanol (v/v) fue además cuantificada al final de la fermentación obteniéndose concentraciones que en ningún caso se encontraban por debajo de los obtenidos con la cepa control (YR70 – $8,74 \pm 0,09\%$; YR377 – $9,38 \pm 0,34\%$; YR379 – $9,96 \pm 0,50\%$).

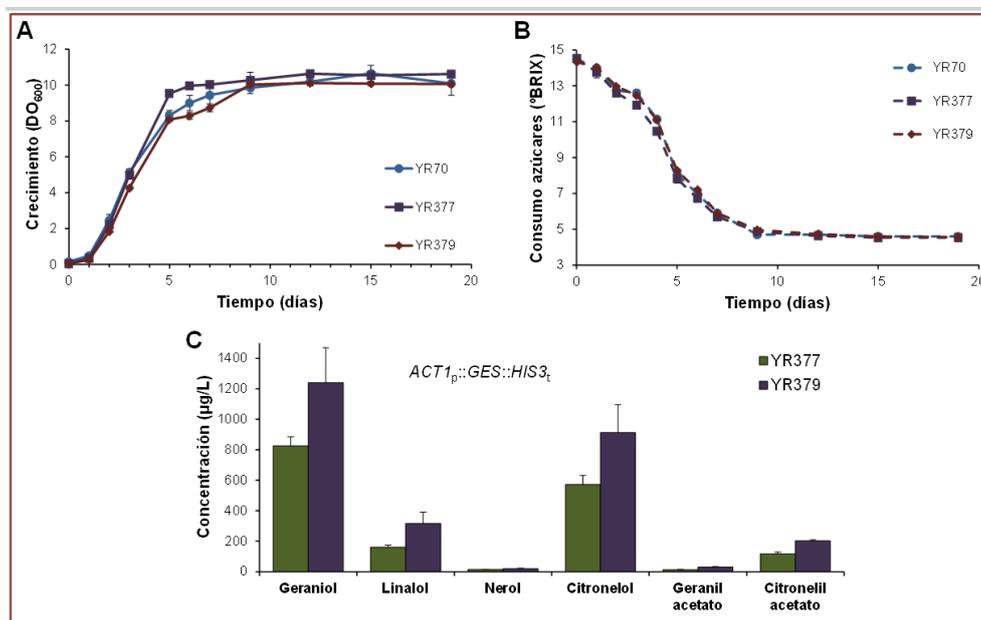


Figura 40. Evolución de las microvinificaciones llevadas a cabo con cepas de *S. cerevisiae* derivadas de T_{73} que sobreexpresan conjuntamente los genes *IDII* y *GES*. (A) Curvas de crecimiento de las cepas YR70 (YEplac195); YR377 (YEpl95Ges) e YR379 (YEpl95Ges_Idi). (B) Consumo de azúcares en las cepas YR70 (YEplac195); YR377 (YEpl95Ges) e YR379 (YEpl95Ges_Idi). (C) Concentración de monoterpenoides en el vino producido por las cepas YR377 (YEpl95Ges) e YR379 (YEpl95Ges_Idi). Los valores representados corresponden a la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La producción de geraniol de la cepa YR379 ($1240,30 \pm 228,71 \mu\text{g/L}$) se situó 1,5 veces por encima de la obtenida con la cepa control YR377 ($825,17 \pm 59,62 \mu\text{g/L}$), observándose además incrementos de los niveles de linalol, nerol, citronelol, geranil acetato y citronelil acetato detectados en los vinos producidos por la cepa YR377 (T_{73} -4 YEpl95Ges) (Figura 40C). Como consecuencia de la sobreexpresión del gen *IDII* la concentración de terpenoides totales producidos por la cepa YR379 (YEpl95Ges_Idi) alcanzó valores de $2718,36 \pm 430,26 \mu\text{g/L}$; estableciéndose una producción global del 160% de la producida por la cepa YR377 ($1698,82 \pm 139,00 \mu\text{g/L}$), que expresa únicamente la geraniol sintasa.

Estos resultados demuestran que la sobreexpresión del gen *IDII* en cepas vínicas productoras *de novo* de monoterpenos es una buena estrategia para incrementar la concentración de los monoterpenos producidos en el vino final. Los rangos de mejora obtenidos en condiciones de microvinificación se

encontraron además próximos a los descritos en este trabajo en condiciones de laboratorio, lo cual indica que la mejora derivada de esta sobreexpresión no es dependiente de las condiciones de fermentación y, dado que el gen *IDII* se encuentra bajo el control de su propio promotor, sugiere que la expresión de este gen es similar en condiciones vnicas y condiciones de laboratorio. Además, tal como ocurría al emplear esta estrategia en condiciones de laboratorio, la producción de los terpenoides derivados de la expresión del gen *GES* es sólo un 60% mayor en las cepas que sobreexpresan el gen *IDII*, mientras que esta misma sobreexpresión triplica la producción de linalol en cepas que expresan el gen *LIS* de *C. breweri*; lo que sugiere que el efecto de esta estrategia depende de la monoterpeneo sintasa expresada y no de las cantidades de terpenoides acumuladas durante la vinificación, ya que éstas son bastante inferiores (~6x) a las obtenidas en condiciones de laboratorio y no deberían por tanto ser limitantes para la mejora de la producción.

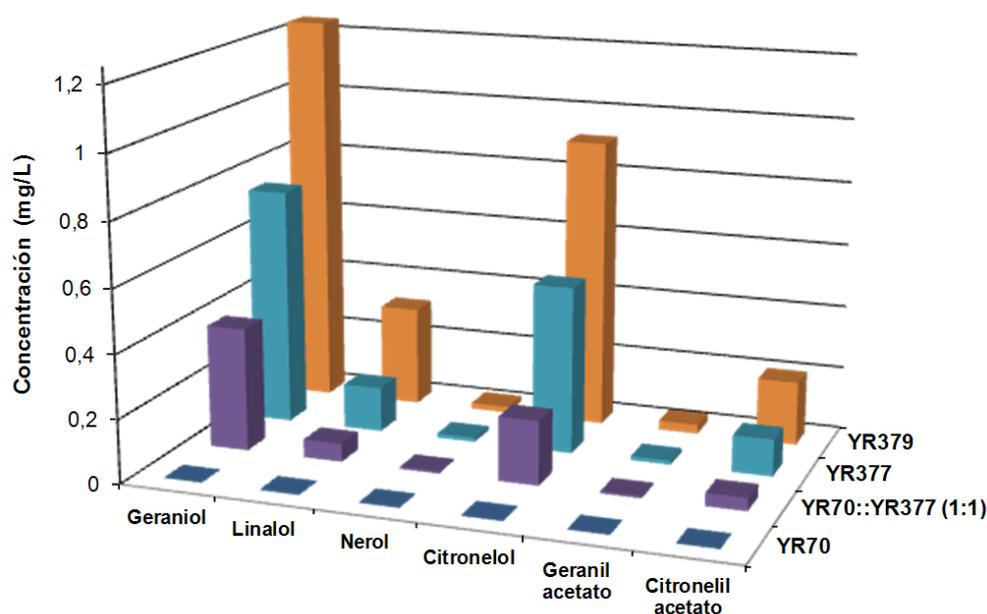


Figura 41. Representación de los cambios globales en el perfil terpénico de los vinos producidos por cepas modificadas derivadas de T_{73} : YR70 (YEplac195); YR377 (YEpl95Ges); YR379 (YEpl95Ges_Idi).

En cualquier caso, parece evidente que la expresión de monoterpeneo sintasas de plantas es una buena estrategia para la producción de cantidades relevantes de monoterpenos en condiciones de vinificación, y que ésta es además modulable por cofermentación con otras cepas de levadura no productoras,

o mediante la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica en la ruta MVA; lo que nos permitiría generar una amplia gama de vinos con diferentes concentraciones de estos compuestos, independientemente de la variedad de uva empleada o de sus condiciones de cultivo. Este efecto se puede observar en la Figura 41, en la que se recopilan los principales resultados obtenidos en este capítulo, y donde se puede apreciar cómo, a partir de un mosto carente de monoterpenos, se obtuvieron vinos con cantidades relevantes de los mismos, que fueron además moduladas en función del objetivo deseado.

Teniendo en cuenta la posibilidad de expresar otras monoterpeno sintasas, como por ejemplo la α -terpineol sintasa, estos perfiles podrían ser además modificados, bien por cofermentación con las cepas que expresen dichas monoterpeno sintasas o mediante la coexpresión de más de una monoterpeno sintasa, dando lugar a un elevado número de combinaciones posibles y generando un gran potencial para el diseño de vinos con diferentes composiciones de monoterpenos, que podrán ser más o menos complejas en función del objetivo deseado. Además, queda abierta la posibilidad de manipular las enzimas responsables de las interconversiones de estos monoterpenos, como Oye2p, implicada en la formación de citronelol a partir de geraniol (Yuan *et al.*, 2011; Steyer *et al.*, 2013) y/o las encargadas de dar lugar a sus ésteres de acetato, entre las que se encuentra la Atf1p (Steyer *et al.*, 2013) a fin de modular la complejidad del aroma de los vinos fermentados por las cepas productoras de monoterpenos.

DISCUSIÓN GENERAL

La química orgánica sintética fue la metodología empleada de forma predominante para la producción de compuestos químicos a lo largo del pasado siglo XX, cuando grandes cantidades de petróleo estaban disponibles a un precio realmente asequible. Durante este período los químicos orgánicos encontraron la forma de producir múltiples compuestos, que todavía se sintetizan hoy en día en plantas petroquímicas. Sin embargo, en los últimos tiempos esta tendencia está cambiando principalmente por el incremento del precio del petróleo, el rápido consumo de esta fuente de carbón fósil y las consecuencias medioambientales derivadas de su explotación. Estos factores han incrementado el interés por la producción de compuestos químicos a partir de fuentes renovables y, aunque durante muchos años la producción microbiana de dichos compuestos se hallaba limitada únicamente a aquellos producidos de forma natural, con ayuda de la ingeniería genética se ha hecho posible la producción heteróloga de compuestos como los isoprenoides; incrementándose además los rendimientos obtenidos de estos productos con la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica (revisado por Immethun *et al.*, 2013).

Si nos centramos en la producción de monoterpenos, en el año 2007 Hernández *et al.*, introdujeron el gen *FaNES* (codifica la enzima bifuncional nerolidol sintasa en *Fragaria ananassa* - fresa) en la bacteria láctica *Lactococcus lactis*, lo que condujo a la acumulación del monoterpeno linalol (~13 µg/L). Por su parte, algunas cepas industriales de la levadura *S. cerevisiae* tienen la capacidad natural de producir *de novo* pequeñas cantidades de linalol (~4 µg/L) y geraniol (~1 µg/L) entre otros monoterpenos (Carrau *et al.*, 2005). Sin embargo, las mayores producciones obtenidas de estos compuestos se han alcanzado al expresar heterológamente monoterpeno sintasas de plantas en *S. cerevisiae*; obteniéndose concentraciones de linalol de ~77 µg/L al expresar la S-linalol sintasa de *Clarkia breweri* en una cepa vínica (Herrero *et al.*, 2008) y ~500 µg/L·DO₆₀₀ de geraniol al expresar la geraniol sintasa de *Ocimum basilicum* en cepas de laboratorio (Oswald *et al.*, 2007). La producción de geraniol se duplicó (alcanzando ~1 mg/L·DO₆₀₀) en este estudio mediante la complementación de la actividad FPPS de *S. cerevisiae* con el alelo mutante *erg20-2* (K197E), que se sabía daba lugar a una mayor liberación de GPP (Blanchard y Karst, 1993). Asimismo, la sustitución sistemática del aminoácido 197 de la enzima FPPS por todos los aminoácidos posibles condujo a una mejora de la producción que alcanzó ~5 mg/L (Fischer *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se han tratado de dilucidar algunas de las modificaciones genéticas que favorecen la producción de monoterpenos en

la levadura *S. cerevisiae* con el objetivo de establecer dicho microorganismo como plataforma para la síntesis de estos compuestos; para ello se han tenido en cuenta factores como el tipo sexual y la ploidía de las cepas hospedadoras, así como su procedencia y/o aplicación en procesos industriales; también se han tenido en consideración tanto el vector de expresión empleado para clonar las monoterpeno sintasas heterólogas como modificaciones en la ruta de síntesis MVA. Con todo ello y tomando como prototipo la S-linalol sintasa de *C. breweri* se han obtenido producciones de linalol que varían desde $\sim 7 \mu\text{g/L}$ cuando dicha monoterpeno sintasa se integra en copia única en el locus *URA3* de la cepa vínica T₇₃-4 hasta $\sim 1,2 \text{ mg/L}$ cuando esta misma enzima se expresa desde el plásmido utilizado para complementar la actividad FPPS con el alelo *erg20-2* y se sobreexpresa el gen *IDII* en una cepa haploide de laboratorio que carece del gen silvestre *ERG20*. Estos resultados muestran una diferencia de ~ 170 veces entre la menor y la mayor producción de linalol obtenidas en este trabajo, siendo además esta última 15 veces superior a la producción máxima descrita previamente para este compuesto en microorganismos ($\sim 77 \mu\text{g/L}$); lo que demuestra que la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica en la ruta MVA de *S. cerevisiae* es una herramienta útil para mejorar la capacidad de este microorganismo para producir monoterpenos. En cuanto a la producción de geraniol, la expresión de la geraniol sintasa de *O. basilicum* sirvió para corroborar los resultados obtenidos previamente y condujo a un rango de producciones que oscila entre los $\sim 500 \mu\text{g/L}$ obtenidos en la cepa vínica T₇₃-4 con el gen *GES* integrado en el locus *URA3* y los $\sim 13 \text{ mg/L}$ alcanzados con esta cepa al coexpresar el gen *IDII* junto con la monoterpeno sintasa desde un plásmido episomal multicopia. La diferencia entre estas producciones es de más de 25 veces, siendo además 2,5 veces mayor que la concentración más elevada de este compuesto producida por un microorganismo en condiciones de laboratorio ($\sim 5 \text{ mg/L}$) (Fischer *et al.*, 2011).

Las concentraciones de estos compuestos están todavía por debajo de los niveles óptimos para su producción y aplicación industrial (Tabla 3), pero las modificaciones y mejoras aquí descritas pueden servir de base para futuras mejoras con un amplio rango de posibilidades. Desde el punto de vista fisiológico, optimizar las condiciones de fermentación (composición del medio, pH, temperatura, aireación, etc.) podría redundar en una mayor producción de monoterpenos. Por otra parte, la aplicación de las estrategias de ingeniería metabólica aquí descritas en nuevas cepas hospedadoras tanto de *S. cerevisiae* como de otras especies de levadura empleadas en la producción de compuestos a nivel industrial, y la expresión de monoterpeno sintasas de distinto origen y/o de otras monoterpeno sintasas pueden resultar

en una mayor producción tal y como se ha visto en el apartado I.1 de los Resultados y Discusión de la presente Memoria, en el que la expresión del gen *GES* de *O. basilicum* dio lugar a una concentración de geraniol más de 100 veces superior a la obtenida cuando se expresa el gen *LIS* de *C. breweri* para producir linalol; lo que sugiere que la utilización de linalol sintasas alternativas o su modificación mediante ingeniería de proteínas podría dar lugar a rendimientos mayores de este compuesto.

Una tercera línea de investigación y quizás la más prometedora a la hora de abordar nuevas mejoras en la producción de monoterpenos es la aplicación de modificaciones adicionales y/o alternativas a las aquí descritas. Entre las que han favorecido la producción de otros terpenos anteriormente encontramos la expresión del factor de transcripción *upc2-1*, capaz de incrementar el flujo a través de la ruta MVA y la inhibición de la expresión del gen *ERG9*, que codifica escualeno sintasa en *S. cerevisiae*, favoreciendo la acumulación de FPP y posiblemente GPP (Ro *et al.*, 2006); la sobreexpresión de enzimas de la parte alta de la ruta como la HMG-CoA sintasa y/o la mevalonato kinasa podrían ser también determinantes a la hora de alcanzar valores de producción mayores a los obtenidos hasta la fecha. Además, la utilización de nuevos elementos reguladores de la expresión génica podría ser una vía de estudio interesante en pos de obtener nuevos incrementos de la producción. La mayor parte de los genes expresados en este trabajo se han clonado bajo el control de secuencias de expresión constitutiva, mientras que en algunos casos se han mantenido las regiones reguladoras propias del gen de interés. Esto podría estar afectando la eficiencia obtenida al combinar las modificaciones metabólicas, como por ejemplo en el caso de la sobreexpresión conjunta del alelo ^{cat}*hmg1* y el gen *IDII* (que conserva su región promotora y terminadora), en la que no se observó un incremento de la producción de monoterpenos mientras que una estrategia similar llevada a cabo por Ignea *et al.*, 2011 en la que los genes *HMG2* e *IDII* se coexpresaban bajo el control del promotor inducible del gen *GAL1* dio lugar a un efecto combinado de ambas expresiones sobre la producción del monoterpeno cineol.

La generación de proteínas híbridas o proteínas de fusión (p. ej. FPPS-LIS o GPPS-LIS) podría ser también interesante para canalizar el flujo hacia la síntesis de monoterpenos, tal como hicieron en el trabajo realizado por Tokuhiro *et al.*, 2009, donde fusionaron las enzimas geraniogeraniol difosfato sintasa (codificada por el gen *BTS1*) y la diacilglicerol difosfato fosfatasa (codificada por el gen *DPP1*) y lograron incrementar la producción de geraniogeraniol por encima de los valores alcanzados al coexpresar las versiones nativas de estas dos enzimas.

El creciente número de estrategias de ingeniería metabólica que han sido aplicadas con éxito para la producción de compuestos bioactivos en microorganismos, entre las que se encuentran las descritas en este trabajo, hace presagiar avances a corto o medio plazo que permitan reemplazar de forma parcial o total la extracción de fuentes naturales y/o la síntesis química de estos compuestos; empleadas de forma habitual y cuya sostenibilidad es precaria tanto económica como medioambientalmente. No obstante, para alcanzar este objetivo final será necesario entender y controlar de forma precisa la interacción entre los procesos heterólogos y el metabolismo celular, por lo que la modelización informática de estas interacciones podría ser clave para obtener una mayor tasa de éxito cuando se abordan este tipo de estrategias.

La generación de una ruta metabólica optimizada y focalizada hacia la sobreproducción de monoterpenos en levaduras mediante aproximaciones de biología sintética o incluso la aplicación de estas estrategias en levaduras de diseño con un genoma mínimo, y que por tanto carecieran de la complejidad metabólica presente en las cepas naturales podrían resultar en un salto cualitativo y cuantitativo en la producción de estos compuestos. Así pues, con la integración de los avances en biología de sistemas, ingeniería de proteínas, ingeniería de sistemas y técnicas analíticas y separativas, la ingeniería metabólica de estos compuestos se perfila como una poderosa herramienta para la sobreproducción de monoterpenos.

En cuanto a su aplicación en la industria vinica, la utilización de estas cepas de levadura modificadas dista aún de ser una realidad, pero en este trabajo se establecen las bases científicas sobre las que trabajar para obtener cuando menos los conocimientos para estar preparados ante una posible apertura de dicha industria hacia la utilización de estos organismos modificados genéticamente. Algunas cepas a las que se les ha conferido la capacidad para realizar la fermentación maloláctica (Husnik *et al.*, 2006) o degradar la urea (Coulon *et al.*, 2006) para reducir la concentración de etil carbamato (carcinógeno) en el vino mediante la tecnología del ADN recombinante han sido reconocidas como GRAS por la USFDA y son ya comercializadas por la industria vitivinícola en América del Norte. Por ello, una vez comprobado que el perfil volátil de los vinos puede ser modificado mediante producción *de novo* de monoterpenos por parte de la levadura, el siguiente paso sería conseguir cepas que pudieran obtener el calificativo GRAS y para eso hay que diseñar estrategias de integración del material genético estrictamente necesario para producir el efecto deseado. Teniendo en cuenta además que según los resultados obtenidos en este trabajo, un elevado número de copias es necesario para la producción de estos compuestos en cantidades suficientes,

la integración de los genes codificantes de monoterpeno sintasas debería dirigirse a secuencias de ADN repetitivo y ser seleccionadas por marcadores de selección débiles como *LEU2-d* que ha mostrado previamente su eficacia en la construcción y estabilización de cepas con múltiples integraciones de la construcción de interés (Adam *et al.*, 1995).

En conclusión, el potencial de la levadura *S. cerevisiae* para establecerse como plataforma para la producción de monoterpenos ha sido probado satisfactoriamente, estableciéndose además una relación directa entre el fondo genético, la expresión de monoterpeno sintasas heterólogas y la modificación de pasos claves de la ruta del ácido mevalónico con la mejora de los rendimientos obtenidos. Además, se han sentado las bases para la obtención de cepas vínicas capaces de producir monoterpenos durante el proceso de fermentación vínica, y aunque la aplicación de estos organismos modificados genéticamente no está actualmente contemplada por la industria vitivinícola en Europa, es posible que en el futuro la necesidad de adaptarse a las demandas del consumidor abran las puertas a la utilización de estas levaduras para mantener la competitividad a nivel global, por lo que conviene estar preparado para lo que pueda venir.

CONCLUSIONES

- La capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción heteróloga de monoterpenos depende del fondo genético de la cepa seleccionada; siendo la cepa T₇₃-4 la mejor de las cepas hospedadoras ensayadas.
- La producción de monoterpenos es dependiente de la enzima expresada; obteniéndose concentraciones muy dispares al expresar la S-linalol sintasa de *C. breweri* y la geraniol sintasa de *O. basilicum*. La levadura *S. cerevisiae* posee además las actividades necesarias para convertir el geraniol producido *de novo* en otros monoterpenos (nerol, linalol, citronelol) y ésteres (geranil y citronelil acetato).
- El vector de expresión seleccionado para clonar las monoterpeno sintasas heterólogas influye notablemente en la acumulación de monoterpenos; siendo aquellos que se mantienen en un elevado número de copias dentro de la célula los que proporcionan mayor rendimiento.
- La modificación mediante técnicas de ingeniería metabólica de pasos claves de la ruta MVA es una herramienta efectiva para mejorar la producción de monoterpenos en *S. cerevisiae*. Tal y como se comprobó al sobreexpresar el alelo *cat* *hmg1* y el gen *IDII*, o al reducir la actividad FPPS endógena o complementarla con el alelo *erg20-2*.
- La fermentación de mostos de variedades neutras de uva con cepas que expresan monoterpeno sintasas heterólogas da lugar a vinos con concentraciones de monoterpenos por encima del umbral de detección. Así se comprobó cuando se expresó el gen *GES* en la cepa vínica T₇₃-4; estos vinos presentaron además niveles detectables de linalol, nerol, citronelol, geranil acetato y citronelil acetato.
- La concentración de monoterpenos en los vinos producidos por cepas modificadas de *S. cerevisiae* puede modularse mediante la utilización de fermentaciones mixtas con cepas no productoras o mediante la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica como la sobreexpresión del gen *IDII*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, A.C., Rubio-Teixeira, M. and Polaina, J.** (1995) Induced expression of bacterial beta-glucosidase activity in *Saccharomyces*. *Yeast*, **11**, 395–406.
- Adam, K.P. and Zapp, J.** (1998) Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, **48**, 953–959.
- Aharoni, A., Giri, A.P., Deuerlein, S., et al.** (2003) Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, **15**, 2866–84.
- Aharoni, A., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Berteau, C.M., Sevenier, R., Sun, Z., Jongsma, M.A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J.** (2004) Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*, **16**, 3110–31.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.Y., Ri, M.B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. and Bouwmeester, H.J.** (2006) Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in Plants. *Phytochem. Rev.*, **5**, 49–58.
- Albertsen, L., Chen, Y., Bach, L.S., Rattleff, S., Maury, J., Brix, S., Nielsen, J. and Mortensen, U.H.** (2011) Diversion of flux toward sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* by fusion of host and heterologous enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1033–1040.
- Albrecht, M., Misawa, N. and Sandmann, G.** (1999) Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 791–795.
- Alper, H., Miyaoku, K. and Stephanopoulos, G.** (2005) Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 612–6.
- Anderegg, R.J., Betz, R., Carr, S.A., Crabb, J.W. and Duntze, W.** (1988) Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone a-factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18236–40.
- Anderson, M.S., Muehlbacher, M. and Street, I.** (1989) Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.*, **264**, 19169–19175.
- Anderson, M.S., Yarger, J.G., Burck, C.L. and Poulter, C.D.** (1989) Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19176–84.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O. and Herschlag, D.** (2003) Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 3889–94.
- Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., Zenk, M. and Bacher, A.** (1999) Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 1309–1314.
- Arrhenius, S.P., McCloskey, L.P. and Sylvan, M.** (1996) Chemical Markers for Aroma of *Vitis vinifera* Var. Chardonnay Regional Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1085–1090.
- Asadollahi, M.A., Maury, J., Møller, K., Nielsen, K.F., Schalk, M., Clark, A. and Nielsen, J.** (2008) Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 666–677.
- Asadollahi, M.A., Maury, J., Schalk, M., Clark, A. and Nielsen, J.** (2010) Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **106**, 86–96.

- Astani, A., Reichling, J. and Schnitzler, P.** (2009) Antiviral Activity of Monoterpene Components of Essential Oils Against Herpes Simplex Virus. *Antiviral Res.*, **82**, A46.
- Bailey, J.E.** (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252**, 1668–75.
- Bakalinsky, A.T. and Snow, R.** (1990) The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **6**, 367–82.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., Dahl, C.C. von and Preston, C.A.** (2006) Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science*, **311**, 812–5.
- Basson, M.E., Moore, R.L., O’Rear, J. and Rine, J.** (1987) Identifying mutations in duplicated functions in *Saccharomyces cerevisiae*: recessive mutations in HMG-CoA reductase genes. *Genetics*, **117**, 645–55.
- Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M. and Rine, J.** (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3797–3808.
- Basson, M.E., Thorsness, M. and Rine, J.** (1986) *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 5563–5567.
- Bauer, F.F. and Pretorius, I.S.** (2000) yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. *S Afr J Enol Vitic*, **21**, 27–51.
- Beggs, J.D.** (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, **275**, 104–109.
- Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R. and O’Shea, E.K.** (2006) Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 13004–9.
- Bellon, J.R., Eglinton, J.M., Siebert, T.E., Pollnitz, A.P., Rose, L., Barros Lopes, M. de and Chambers, P.J.** (2011) Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 603–12.
- Benko, A.L., Vaduva, G., Martin, N.C. and Hopper, A.K.** (2000) Competition between a sterol biosynthetic enzyme and tRNA modification in addition to changes in the protein synthesis machinery causes altered nonsense suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 61–6.
- Blanchard, L. and Karst, F.** (1993) Characterization of a lysine-to-glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **125**, 185–189.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A.H. and Waard, A. de** (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2595–604.
- Bochar, D.A., Stauffacher, C. V and Rodwell, V.W.** (1999) Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Genet. Metab.*, **66**, 122–7.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. and Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345–6.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. and Croteau, R.** (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4126–33.

- Bohlmann, J., Phillips, M., Ramachandiran, V., Katoh, S. and Croteau, R.** (1999) cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **368**, 232–43.
- Bohlmann, J., Steele, C.L. and Croteau, R.** (1997) Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21784–92.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. and Rodríguez-Concepción, M.** (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.*, **40**, 188–99.
- Boucher, Y. and Doolittle, W.F.** (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.*, **37**, 703–716.
- Boucher, Y., Kamekura, M. and Doolittle, W.F.** (2004) Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol. Microbiol.*, **52**, 515–27.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. and Kunkee, R.E.** (1996) Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. In Principles and Practices of Winemaking. *Springer US*, pp. 102–192.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D.** (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115–32.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Bundock, P., Dulk-Ras, A. den, Beijersbergen, A. and Hooykaas, P.J.** (1995) Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 3206–14.
- Burg, J.S. and Espenshade, P.J.** (2011) Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog. Lipid Res.*, **50**, 403–10.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A. and Cacho, J.** (2005) Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5682–90.
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G. and Henschke, P.** (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, **243**, 107–15.
- Carter, O.A., Peters, R.J. and Croteau, R.** (2003) Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry*, **64**, 425–33.
- Chambon, C., Ladeveze, V., Servouse, M., Blanchard, L., Javelof, C., Vladescu, B. and Karst, F.** (1991) Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. *Lipids*, **26**, 633–36.
- Chambon, C., Ladeveze, V., Oulmouden, A., Servouse, M. and Karst, F.** (1990) Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Curr. Genet.*, **18**, 41–6.
- Chang, M.C.Y. and Keasling, J.D.** (2006) Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 674–81.

- Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R. and Saunders, C.** (1995) Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol.*, **109**, 1337–1343.
- Chaykin, S., Law, J., Phillips, A.H., Tchen, T.T. and Bloch, K.** (1958) Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**, 998–1004.
- Chen, D.H., Ye, H.C. and Li, G.F.** (2000) Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci.*, **155**, 179–185.
- Chen, F., Tholl, D., D’Auria, J.C., Farooq, A., Pichersky, E. and Gershenzon, J.** (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. *Plant Cell*, **15**, 481–94.
- Chi, Z. and Arneborg, N.** (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 1047–1052.
- Chung, Y.S., Kim, M.D., Lee, W.J., Ryu, Y.W., Kim, J.H. and Seo, J.H.** (2002) Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 809–816.
- Clarke, L. and Carbon, J.** (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, **287**, 504–509.
- Colby, S.M., Alonso, W.R., Katahira, E.J., McGarvey, D.J. and Croteau, R.** (1993) 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23016–24.
- Connolly, J.D. and Hill, R.A.** (1991) Dictionary of terpenoids J. D. Connolly and R. A. Hill, eds., London: Chapman & Hall.
- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., Merwe, G.K. van der, Lonvaud, A., Erasmus, D.J. and Vuuren, H.J.J. van** (2006) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 113–124.
- Crock, J., Wildung, M. and Croteau, R.** (1997) Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)-beta -farnesene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 12833–12838.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G.** (2000) Natural products (Secondary Metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318.
- Crowell, A.L., Williams, D.C., Davis, E.M., Wildung, M.R. and Croteau, R.** (2002) Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **405**, 112–21.
- Crowell, P.L.** (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.*, **129**, 775S–778S.
- Crowell, P.L. and Gould, M.N.** (1994) Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *Crit. Rev. Oncog.*, **5**, 1–22.
- Cseke, L., Dudareva, N. and Pichersky, E.** (1998) Structure and evolution of linalool synthase. *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 1491–8.
- Davidovich-Rikanati, R., Sitrit, Y., Tadmor, Y., et al.** (2007) Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 899–901.

- Degenhardt, J., Köllner, T.G. and Gershenzon, J.** (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, **70**, 1621–37.
- Dejong, J.M., Liu, Y., Bollon, A.P., Long, R.M., Jennewein, S., Williams, D. and Croteau, R.B.** (2006) Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 212–24.
- Delorme, E.** (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Appl. Envir. Microbiol.*, **55**, 2242–2246.
- Delteil, D. and Aizac, T.** (1988) Comparison of yeast inoculation techniques by the use of a “marked” yeast strain. *Aust. NZ Wine Ind. J.*, **3**, 52–56.
- Demel, R.A. and Kruyff, B. de** (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 109–32.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. and Adams, W.W.** (1996) Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.*, **10**, 403–12.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O.** (1997) Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science (80-.)*, **278**, 680–686.
- Dewick, P.M.** (1999) The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **16**, 97–130.
- Dicke, M., Beek, T.A., Posthumus, M.A., Dom, N. Ben, Bokhoven, H. and Groot, A.** (1990) Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions Involvement of host plant in its production. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 381–396.
- Dicke, M. and Bruin, J.** (2001) Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 981–994.
- Diemer, F., Caissard, J.C., Moja, S., Chalchat, J.C. and Jullien, F.** (2001) Altered monoterpene composition in transgenic mint following the introduction of 4S-limonene synthase. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**, 603–614.
- Dihanich, M.E., Najarian, D., Clark, R., Gillman, E.C., Martin, N.C. and Hopper, A.K.** (1987) Isolation and characterization of MOD5, a gene required for isopentenylation of cytoplasmic and mitochondrial tRNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 177–84.
- Dimster-Denk, D., Thorsness, M.K. and Rine, J.** (1994) Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 655–665.
- Donald, K. a, Hampton, R.Y. and Fritz, I.B.** (1997) Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3341–4.
- Donalies, U.E.B., Nguyen, H.T.T., Stahl, U. and Nevoigt, E.** (2008) Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **111**, 67–98.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. and Pichersky, E.** (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell*, **8**, 1137–48.
- Dujon, B.** (1998) European Functional Analysis Network (EUROFAN) and the functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Electrophoresis*, **19**, 617–24.
- Dussourd, D.E. and Hoyle, A.M.** (2000) Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. *Chemoecology*, **10**, 11–16.

- Eden, A., Nederveelde, L. Van, Drukker, M., Benvenisty, N. and Debourg, A.** (2001) Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 296–300.
- Erhart, E. and Hollenberg, C.P.** (1983) The presence of a defective *LEU2* gene on 2 μ DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J. Bacteriol.*, **156**, 625–35.
- Erickson, A.A., Paul, V.J., Alstynne, K.L. Van and Kwiatkowski, L.M.** (2006) Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. *J. Chem. Ecol.*, **32**, 1883–95.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M.A., Ortín, N., Cacho, J. and Ferreira, V.** (2004) Characterization of the aroma of a wine from maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3516–24.
- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S. and León, P.** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22901–9.
- Falara, V., Akhtar, T.A., Nguyen, T.T.H., et al.** (2011) The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol.*, **157**, 770–89.
- Faulkner, J.D.B., Anson, J.G., Tuite, M.F. and Minton, N.P.** (1994) High-level expression of the phenylalanine ammonia lyase-encoding gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system. *Gene*, **143**, 13–20.
- Feranoli, G.** (2002) Handbook of flavour ingredients G. . Burdock, ed., Florida: CRC Press.
- Ferreira, V.** (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1659–1667.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R. and Cacho, J.** (2002) Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4048–4054.
- Fischer, M.J.C., Meyer, S., Claudel, P., Bergdoll, M. and Karst, F.** (2011) Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1883–92.
- Fleet, G. and Heard, G.** (1993) Yeasts: growth during fermentation. In G. H. Fleet, ed. Wine Microbiology and Biotechnology. Hardwood Academic: Reading, pp. 27–54.
- Fleet, G.H.** (2007) Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 170–5.
- Flippi, M., Vondervoort, P.J.I. van de, Ruijter, G.J.G., Visser, J., Arst, H.N. and Felenbok, B.** (2003) Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 11849–57.
- Frank, T., Biert, K. and Speiser, B.** (2002) Feeding deterrent effect of carvone, a compound from caraway seeds, on the slug *Arion lusitanicus*. *Ann. Appl. Biol.*, **141**, 93–100.
- Friedman, M., Henika, P.R. and Mandrell, R.E.** (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, **65**, 1545–60.

- Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G.** (2007) Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures. Springer.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. and Hamachi, M.** (1994) Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Expression of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2786–2792.
- Futcher, A.B. and Cox, B.S.** (1984) Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **157**, 283–90.
- Gamero, A., Manzanares, P., Querol, A. and Belloch, C.** (2011) Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**, 92–7.
- Ganga, M., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D. and Querol, A.** (1999) Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int. J. Food Microbiol.*, **47**, 171–178.
- Gardner, R., Cronin, S., Leader, B., Rine, J. and Hampton, R.** (1998) Sequence Determinants for Regulated Degradation of Yeast 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase, an Integral Endoplasmic Reticulum Membrane Protein. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2611–2626.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., et al.** (2008) Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.*, **7**, 11.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N.** (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 408–14.
- Gietz, R.D. and Sugino, A.** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527–34.
- Gil, J. V., Manzanares, P., Genovés, S., Vallés, S. and González-Candelas, L.** (2005) Overproduction of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.*, **103**, 57–68.
- Gilg, A.B., Bearfield, J.C., Tittiger, C., Welch, W.H. and Blomquist, G.J.** (2005) Isolation and functional expression of an animal geranyl diphosphate synthase and its role in bark beetle pheromone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 9760–9765.
- Goffeau, A., Aert, R., Agostini-Carbone, M.L., et al.** (1997) The yeast genome directory. *Nature*, **387**, 5.
- Gould, M.N.** (1997) Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ. Health Perspect.*, **105 Suppl**, 977–9.
- Gramatica, P., Manitto, P., Ranzi, B.M., Delbianco, A. and Francavilla, M.** (1982) Stereospecific reduction of geraniol to (R)-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*, **38**, 775–776.
- Guardiola, J., Iborra, J.L., Ródenas, L. and Cánovas, M.** (1996) Biotransformation from geraniol to nerol by immobilized grapevine cells (*V. vinifera*). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **56**, 169–180.
- Günata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. and Cordonnier, R.E.** (1985) The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A*, **331**, 83–90.
- Günata, Y.Z., Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, C.B.** (1993) Role of the enzymes in the use of the flavor potential from grape glycosides in winemaking. In P. W. P. Scheier, ed. Progress in Flavor Precursor Studies. Illinois: Allured Publishing Corporation, pp. 219–234.

- Guth, H.** (1997) Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3027–3032.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V.** (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, 853–860.
- Hampton, R., Dimster-Denk, D. and Rine, J.** (1996) The biology of HMG-CoA reductase: The pros of contra-regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 140–145.
- Hampton, R.Y. and Rine, J.** (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J. Cell Biol.*, **125**, 299–312.
- Han, J.L., Liu, B.Y., Ye, H.C., Wang, H., Li, Z.Q. and Li, G.F.** (2006) Effects of Overexpression of the Endogenous Farnesyl Diphosphate Synthase on the Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. *J. Integr. Plant Biol.*, **48**, 482–487.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557–80.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning. Oxford: IRL Press.
- Heil, M. and Silva-Bueno, J.C.** (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 5467–72.
- Heinemann, J.A. and Sprague, G.F.** (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature*, **340**, 205–9.
- Hernández, I., Molenaar, D., Beekwilder, J., Bouwmeester, H. and Hylckama Vlieg, J.E.T. van** (2007) Expression of plant flavor genes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1544–52.
- Herrero, O., Ramón, D. and Orejas, M.** (2008) Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine. *Metab. Eng.*, **10**, 78–86.
- Herrin, D.L. and Schmidt, G.W.** (1988) Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques*, **6**, 196–7, 199–200.
- Hey, S.J., Powers, S.J., Beale, M.H., Hawkins, N.D., Ward, J.L. and Halford, N.G.** (2006) Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. *Plant Biotechnol. J.*, **4**, 219–29.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A.** (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, **2**, 163–7.
- Hinnen, A., Hicks, J. and Fink, G.** (1978) Transformation of Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1929–1933.
- Hirata, D., Aoki, S., Watanabe, K., Tsukioka, M. and Suzuki, T.** (1992) Stable overproduction of isoamyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* with chromosome-integrated multicopy LEU 4 genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1682–1683.
- Hirata D. and Hiroi T.** (1991) Genes That Cause Overproduction of Isoamyl Alcohol by Increased Gene-Dosage Effect in *Saccharomyces cerevisiae* (Microbiology & Fermentation Industry). *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 919–924.
- Hock, R., Benda, I. and Schreier, P.** (1984) Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **179**, 450–452.
- Huang, B., Guo, J., Yi, B., Yu, X., Sun, L. and Chen, W.** (2008) Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1121–37.

- Huber, D.P.W., Philippe, R.N., Godard, K.-A., Sturrock, R.N. and Bohlmann, J.** (2005) Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Phytochemistry*, **66**, 1427–39.
- Husnik, J.I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z. and Vuuren, H.J.J. van** (2006) Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.*, **8**, 315–23.
- Huxley, C., Green, E.D. and Dunham, I.** (1990) Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.*, **6**, 236.
- Ignea, C., Cvetkovic, I., Loupassaki, S., Kefalas, P., Johnson, C.B., Kampranis, S.C. and Makris, A.M.** (2011) Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids. *Microb. Cell Fact.*, **10**, 4.
- Iijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E.** (2004) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol.*, **134**, 370–9.
- Immethun, C.M., Hoynes-O'Connor, A.G., Balassy, A. and Moon, T.S.** (2013) Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology. *Front. Microbiol.*, **4**, 75.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163–8.
- Ito, M. and Honda, G.** (2007) Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry*, **68**, 446–53.
- Jackson, B.E., Hart-Wells, E.A. and Matsuda, S.P.T.** (2003) Metabolic engineering to produce sesquiterpenes in yeast. *Org. Lett.*, **5**, 1629–32.
- Jia, J.W., Crock, J., Lu, S., Croteau, R. and Chen, X.Y.** (1999) (3R)-Linalool synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **372**, 143–9.
- Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Ridaura, I., Lozano, N. and Olmo, M. del** (2009) Genetic manipulation of *HSP26* and *YHR087W* stress genes may improve fermentative behaviour in wine yeasts under vinification conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, **130**, 122–30.
- Jones, C.G., Keeling, C.I., Ghisalberti, E.L., Barbour, E.L., Plummer, J.A. and Bohlmann, J.** (2008) Isolation of cDNAs and functional characterisation of two multi-product terpene synthase enzymes from sandalwood, *Santalum album* L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**, 121–30.
- Kajiwa, S., Fraser, P.D., Kondo, K. and Misawa, N.** (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **324** (Pt 2, 421–6.
- Kamińska, J., Grabińska, K., Kwapisz, M., Sikora, J., Smagowicz, W.J., Palamarczyk, G., Zoladek, T. and Boguta, M.** (2002) The isoprenoid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* is affected in a *maf1-1* mutant with altered tRNA synthesis. *FEMS Yeast Res.*, **2**, 31–7.
- Kessler, A. and Baldwin, I.T.** (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, **291**, 2141–4.
- Khor, G.K. and Uzir, M.H.** (2011) *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono- and sesquiterpenoids. *Yeast*, **28**, 93–107.
- Khosla, C. and Keasling, J.D.** (2003) Metabolic engineering for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 1019–25.
- King, A. and Richard Dickinson, J.** (2000) Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **16**, 499–506.

- Kirby, J. and Keasling, J.D.** (2009) Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 335–55.
- Kirby, J., Romanini, D.W., Paradise, E.M. and Keasling, J.D.** (2008) Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*-beta-amyrin synthase from *Artemisia annua*. *FEBS J.*, **275**, 1852–9.
- Klein, C.J., Olsson, L., Rønnow, B., Mikkelsen, J.D. and Nielsen, J.** (1996) Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by MIG1 disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4441–4449.
- Kodama, Y., Omura, F., Keiji, M. and Toshihiko, A.** (2001) Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **59**, 157–162.
- Kuzuyama, T.** (2002) Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1619–27.
- Lacey, M.J., Allen, M.S., Harris, R.L.N. and Brown, W.V.** (1991) Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 103–108.
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S.** (2000) Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *S Afr J Enol Vitic*, **21**, 97–129.
- Landmann, C., Fink, B., Festner, M., Dregus, M., Engel, K.-H. and Schwab, W.** (2007) Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**, 417–29.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. and Croteau, R.** (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13172–7.
- Langenheim, J.** (1994) Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, **20**, 1223–1280.
- Lashkari, D.A., DeRisi, J., McCusker, J., Namath, A., Gentile, C., Hwang, S., Brown, P. and Davis, R.** (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 13057–13062.
- Latorre-García, L., Adam, A.C. and Polaina, J.** (2008) Overexpression of the glucoamylase-encoding *STAI* gene of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in laboratory and industrial strains of *Saccharomyces*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 2957–2963.
- Laurent, P., Braekman, J.C., Daloze, D. and Pasteels, J.** (2003) Biosynthesis of Defensive Compounds from Beetles and Ants. *European J. Org. Chem.*, **2003**, 2733–2743.
- Lavy, M., Zuker, A., Lewinsohn, E., Larkov, O., Ravid, U., Vainstein, A. and Weiss, D.** (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Mol. Breed.*, **9**, 103–111.
- Lee, P.C., Momen, A.Z.R., Mijts, B.N. and Schmidt-Dannert, C.** (2003) Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.*, **10**, 453–62.
- Lee, S. and Chappell, J.** (2008) Biochemical and genomic characterization of terpene synthases in *Magnolia grandiflora*. *Plant Physiol.*, **147**, 1017–33.
- Lee, S., Peterson, C.J. and Coats, J.R.** (2003) Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.*, **39**, 77–85.
- Lee, S.J. and Noble, A.C.** (2003) Characterization of odor-active compounds in Californian chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 8036–44.
- Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., et al.** (2001) Enhanced Levels of the Aroma and Flavor Compound S-Linalool by Metabolic Engineering of the Terpenoid Pathway in Tomato Fruits. *Plant Physiol.*, **127**, 1256–1265.

- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D. and Pretorius, I.S.** (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, **23**, 641–59.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S.** (2000) Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 744–753.
- Lin, C., Shen, B., Xu, Z., Köllner, T.G., Degenhardt, J. and Dooner, H.K.** (2008) Characterization of the monoterpene synthase gene tps26, the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. *Plant Physiol.*, **146**, 940–51.
- Lindahl, A.L., Olsson, M.E., Mercke, P., Tollbom, O., Schelin, J., Brodelius, M. and Brodelius, P.E.** (2006) Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 571–80.
- Liscum, L., Finer-Moore, J., Stroud, R., Luskey, K., Brown, M. and Goldstein, J.** (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **260**, 522–530.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J. and Lemoine, Y.** (1989) High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **5**, 497–507.
- Lombard, J. and Moreira, D.** (2011) Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 87–99.
- Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., Aar, P.C. van der, Heerikhuizen, H. van, Raúe, H.A. and Planta, R.J.** (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene*, **79**, 199–206.
- Lu, S., Xu, R., Jia, J.W., Pang, J., Matsuda, S.P.T. and Chen, X.Y.** (2002) Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol.*, **130**, 477–86.
- Lubertozzi, D. and Keasling, J.D.** (2006) Marker and promoter effects on heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 1014–23.
- Lücker, J., Bouwmeester, H.J., Schwab, W., Blaas, J., Plas, L.H.W. Van Der and Verhoeven, H.A.** (2001) Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside. *Plant J.*, **27**, 315–324.
- Lücker, J., Bowen, P. and Bohlmann, J.** (2004) *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*, **65**, 2649–59.
- Lücker, J., Schwab, W., Hautum, B. van, Blaas, J., Plas, L.H.W. van der, Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A.** (2004) Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol.*, **134**, 510–9.
- Lücker, J., Tamer, M.K. El, Schwab, W., Verstappen, F.W.A., Plas, L.H.W. van der, Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A.** (2002) Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3160–71.
- Lunde, C.S. and Kubo, I.** (2000) Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1943–53.

- Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I.** (1958) Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene, III. *Angew. Chemie*, **70**, 738–742.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B.** (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8915–20.
- Manzanares, P., Orejas, M., Gil, J. V., Graaff, L.H. de, Visser, J. and Ramón, D.** (2003) Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* Gene, Encoding an α -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7558–7562.
- Marasco, E.K. and Schmidt-Dannert, C.** (2007) Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. In R. Verpoorte, A. W. Alfermann, and T. S. Johnson, eds. *Applications of Plant Metabolic Engineering2*. Springer, pp. 1–43.
- Martin, D.M. and Bohlmann, J.** (2004) Identification of *Vitis vinifera* (-)- α -terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. *Phytochemistry*, **65**, 1223–9.
- Martin, D.M., Fäldt, J. and Bohlmann, J.** (2004) Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.*, **135**, 1908–27.
- Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. and Keasling, J.D.** (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 796–802.
- Martini, A. and Martini, A.V.** (1990) Grape must fermentation: past and present. In J. F. T. Spencer and D. M. Spencer, eds. *Yeast technology*. New York: Springer-Verlag, pp. 105–123.
- Maruyama, T., Ito, M., Kiuchi, F. and Honda, G.** (2001) Molecular Cloning, Functional Expression and Characterization of d-Limonene Synthase from *Schizonepeta tenuifolia*. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 373–377.
- Maruyama, T., Saeki, D., Ito, M. and Honda, G.** (2002) Molecular cloning, functional expression and characterization of d-limonene synthase from *Agastache rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 661–5.
- Mason, A.B. and Dufour, J.P.** (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, **16**, 1287–98.
- Masuda, M. and Nishimura, K.** (1971) Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochemistry*, **10**, 1401–1402.
- Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. and Sauer, M.** (2004) Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.*, **113**, 121–35.
- Mauricio, J.C. and Ortega, J.M.** (1993) Influence of fermentation conditions on specific activity of the enzymes alcohol and aldehyde dehydrogenase from yeasts. *Microbios*, **75**, 95–106.
- Maury, J., Asadollahi, M.A., Möller, K., Clark, A. and Nielsen, J.** (2005) Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **100**, 19–51.
- Messchendorp, L., Gols, G.J.Z. and Loon, J.J.A.** (2000) Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.*, **95**, 217–227.

- Mills, J.J., Chari, R.S., Boyer, I.J., Gould, M.N. and Jirtle, R.L.** (1995) Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res.*, **55**, 979–83.
- Momoi, M., Tanoue, D., Sun, Y., Takematsu, H., Suzuki, Y., Suzuki, M., Suzuki, A., Fujita, T. and Kozutsumi, Y.** (2004) *SLII (YGR212W)* is a major gene conferring resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor ISP-1, and encodes an ISP-1 N-acetyltransferase in yeast. *Biochem. J.*, **381**, 321–8.
- Monfort, A., Finger, S., Sanz, P. and Prieto, J.A.** (1999) Evaluation of different promoters for the efficient production of heterologous proteins in baker's yeast. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 225–229.
- Mulder-Krieger, T., Verpoorte, R., Svendsen, A.B. and Scheffer, J.J.C.** (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, **13**, 85–154.
- Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M.** (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119–22.
- Muñoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J.** (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metab. Eng.*, **10**, 166–77.
- Nacken, V., Achstetter, T. and Degryse, E.** (1996) Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **175**, 253–60.
- Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A. and Hamachi, M.** (1998) Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokay No. 7. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 1852–1857.
- Nagegowda, D.A., Gutensohn, M., Wilkerson, C.G. and Dudareva, N.** (2008) Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant J.*, **55**, 224–39.
- Nakanishi, M., Goldstein, J. and Brown, M.** (1988) Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8929–8937.
- Nelson, N.** (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375–380.
- Nevoigt, E.** (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 379–412.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L. and Stahl, U.** (2002) Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res.*, **2**, 225–232.
- Nieto, A., Prieto, J.A. and Sanz, P.** (1999) Stable high-copy-number integration of *Aspergillus oryzae* alpha-AMYLASE cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 459–66.
- Nualkaew, N., De-Eknamkul, W., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H.** (2006) Membrane-bound geranylgeranyl diphosphate phosphatases: purification and characterization from *Croton stellatopilosus* leaves. *Phytochemistry*, **67**, 1613–20.
- Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S.** (2009) Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenol alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 837–45.

- Ohto, C., Muramatsu, M., Obata, S., Sakuradani, E. and Shimizu, S. (2010) Production of geranylgeraniol on overexpression of a prenyl diphosphate synthase fusion gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1327–34.
- Okkels, J.S. (1996) A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **782**, 202–7.
- Orr-Weaver, T.L. and Szostak, J.W. (1983) Multiple, tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 747–9.
- Oswald, M., Fischer, M., Dirninger, N. and Karst, F. (2007) Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **7**, 413–21.
- Palomo, E.S., Pérez-Coello, M.S., Díaz-Maroto, M.C., González Viñas, M.A. and Cabezudo, M.D. (2006) Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *Food Chem.*, **95**, 279–289.
- Panda, T. and Devi, V.A. (2004) Regulation and degradation of HMGCo-A reductase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 143–52.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 12923–8.
- Parent, S.A., Fenimore, C.M. and Bostian, K.A. (1985) Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **1**, 83–138.
- Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J. and Maury, J. (2010) Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **27**, 955–64.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. and Kole, C.R. (1997) Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, **89**, 39–46.
- Paul, V.J., Puglisi, M.P. and Ritson-Williams, R. (2006) Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 153–80.
- Paul, V.J. and Ritson-Williams, R. (2008) Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 662–95.
- Paul, V.J., Seo, Y., Cho, K.W., Rho, J.R., Shin, J. and Bergquist, P.R. (1997) Sesquiterpenoids of the drimane class from a sponge of the genus *Dysidea*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 1115–20.
- Pechous, S.W. and Whitaker, B.D. (2004) Cloning and functional expression of an (E, E)-alpha-farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*, **219**, 84–94.
- Pérez-González, J.A., González, R., Querol, A., Sendra, J. and Ramón, D. (1993) Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Envir. Microbiol.*, **59**, 2801–2806.
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Barrio, E. and Querol, A. (2012) Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *Int. J. Food Microbiol.*, **156**, 102–11.
- Phillips, M.A., Wildung, M.R., Williams, D.C., Hyatt, D.C. and Croteau, R. (2003) cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)-alpha-pinene synthase and (-)-alpha-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): stereocontrol in pinene biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **411**, 267–76.

- Pichersky, E., Lewinsohn, E. and Croteau, R.** (1995) Purification and Characterization of S-Linalool Synthase, an Enzyme Involved in the Production of Floral Scent in *Clarkia breweri*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 803–07.
- Polakowski, T., Stahl, U. and Lang, C.** (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 66–71.
- Pozo, L. del, Abarca, D., Claros, M.G. and Jiménez, A.** (1991) Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr. Genet.*, **19**, 353–8.
- Pretorius, I.S. and Bauer, F.F.** (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.*, **20**, 426–432.
- Puig, S., Ramón, D. and Pérez-Ortín, J.E.** (1998) Optimized Method To Obtain Stable Food-Safe Recombinant Wine Yeast Strains. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1689–1693.
- Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. and Ramón, D.** (1992) Dry Yeast Strain For Use in Fermentation of Alicante Wines: Selection and DNA Patterns. *J. Food Sci.*, **57**, 183–185.
- Querol, A. and Ramón, D.** (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, **7**, 73–78.
- Quintana, A., Reinhard, J., Faure, R., Uva, P., Bagnères, A.G., Massiot, G. and Clément, J.L.** (2003) Interspecific variation in terpenoid composition of defensive secretions of European Reticulitermes termites. *J. Chem. Ecol.*, **29**, 639–52.
- Rad, S.A., Zahiri, H.S., Noghabi, K.A., Rajaei, S., Heidari, R. and Mojallali, L.** (2012) Type 2 IDI performs better than type 1 for improving lycopene production in metabolically engineered *E. coli* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 313–21.
- Raguso, R.A. and Light, D.M.** (1998) Electroantennogram responses of male Sphinx perelegans hawkmoths to floral and “green-leaf volatiles.” *Entomol. Exp. Appl.*, **86**, 287–293.
- Ramón, D., Genovés, S., Gil, J. V., et al.** (2005) Milestones in wine biotechnology. *Minerva. Biotechnol.*, **17**, 33–45.
- Rapp, A. and Mandery, H.** (1986) Wine aroma. *Experientia*, **42**, 873–884.
- Rasmann, S., Köllner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenson, J. and Turlings, T.C.J.** (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, **434**, 732–7.
- Rastogi, N., Araul, J., Goh, K.S., Devallois, A., Philogène, E. and Bourgeois, P.** (1998) Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**, 267–73.
- Rensburg, P. van and Pretorius, I.** (2000) Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **52–73**.
- Ribéreau-Gayon, P., Boidron, J.N. and Terrier, A.** (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 1042–1047.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D. and Donèche, B.** (2006) The microbiology of wine and vinifications. In P. Ribéreau-Gayon, ed. *Handbook of enology*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Rico, J., Pardo, E. and Orejas, M.** (2010) Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6449–54.

- Ro, D.K., Ouellet, M., Paradise, E.M., Burd, H., Eng, D., Paddon, C.J., Newman, J.D. and Keasling, J.D.** (2008) Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol.*, **8**, 83.
- Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., et al.** (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, **440**, 940–3.
- Rocha, S.N., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M.E., Gombert, A.K. and González-Siso, M.I.** (2011) Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 375–85.
- Rocha, S.N., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. and Gombert, A.K.** (2010) Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb. Cell Fact.*, **9**, 4.
- Rohmer, M.** (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.*, **16**, 565–574.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. and Manzanares, P.** (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 181–188.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J.** (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**, 423–488.
- Ruzicka, L.** (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **9**, 357–396.
- Saerens, S.M.G., Verstrepen, K.J., Laere, S.D.M. Van, Voet, A.R.D., Dijck, P. Van, Delvaux, F.R. and Thevelein, J.M.** (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.*, **281**, 4446–56.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. and Ramón, D.** (1996) Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* *abfB* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 189–94.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. and Ramón, D.** (1998) Heterologous Expression of a *Candida molischiana* Anthocyanin-beta-glucosidase in a Wine Yeast Strain. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 354–360.
- Sathikge, N.D.** (2008) Process for the preparation of geraniol and nerol from crude sulphated turpentine stream, Nelson Mandela Metropolitan University.
- Schie, C.C.N. van, Haring, M.A. and Schuurink, R.C.** (2007) Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol. Biol.*, **64**, 251–63.
- Schreier, P.** (1979) Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 59–111.
- Schuller, D. and Casal, M.** (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 292–304.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. and Lewinsohn, E.** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.*, **54**, 712–32.
- Seker, T., Möller, K. and Nielsen, J.** (2005) Analysis of acyl CoA ester intermediates of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 119–124.
- Sengstag, C., Stirling, C., Schekman, R. and Rine, J.** (1990) Genetic and biochemical evaluation of eucaryotic membrane protein topology: multiple transmembrane domains of *Saccharomyces cerevisiae* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 672–680.

- Shields, V.D. and Hildebrand, J.G.** (2001) Recent advances in insect olfaction, specifically regarding the morphology and sensory physiology of antennal sensilla of the female sphinx moth *Manduca sexta*. *Microsc. Res. Tech.*, **55**, 307–29.
- Shimada, H., Kondo, K., Fraser, P.D., Miura, Y., Saito, T. and Misawa, N.** (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2676–2680.
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M., Ueda, T., Kita, M. and Omura, M.** (2004) Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. *Plant Sci.*, **166**, 49–58.
- Slaninová, M., Farkašová, E., Chovanec, M., Vlčková, V., Nälund, M., Henriques, J.A.P. and Brozmanová, J.** (1995) Expression of *Escherichia coli* recA and ada genes in *Saccharomyces cerevisiae* using a vector with geneticin resistance. *Folia Microbiol. (Praha)*, **40**, 257–262.
- Staden, R.** (1996) The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.*, **5**, 233–241.
- Starmans, D.A.J. and Nijhuis, H.H.** (1996) Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, **7**, 191–197.
- Steussy, C.N., Robison, A.D., Tetrick, A.M., Knight, J.T., Rodwell, V.W., Stauffacher, C. V and Sutherlin, A.L.** (2006) A structural limitation on enzyme activity: the case of HMG-CoA synthase. *Biochemistry*, **45**, 14407–14.
- Steyer, D., Erny, C., Claudel, P., Riveill, G., Karst, F. and Legras, J.L.** (2013) Genetic analysis of geraniol metabolism during fermentation. *Food Microbiol.*, **33**, 228–34.
- Struhl, K., Stinchcomb, D., Scherer, S. and Davis, R.** (1979) High-Frequency Transformation of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1035–1039.
- Szczepanik, M., Dams, I. and Wawrzęczyk, C.** (2005) Feeding Deterrent Activity of Terpenoid Lactones with the p -Menthane System Against the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, **34**, 1433–1440.
- Szkopińska, A., Grabińska, K., Delourme, D., Karst, F., Rytka, J. and Palamarczyk, G.** (1997) Polyprenol formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: effect of farnesyl diphosphate synthase overexpression. *J. Lipid Res.*, **38**, 962–8.
- Szostak, J.W. and Blackburn, E.H.** (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, **29**, 245–55.
- Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Shimase, M., Katayama, Y., Nakayama, Y. and Watari, J.** (2010) The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of Geraniol and β -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool. *J. Inst. Brew.*, **116**, 251–260.
- Tavormina, P.A., Gibbs, M.H. and Huff, J.W.** (1956) The utilization of β -hydroxy- β -methyl- δ -valerolactone in cholesterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498–4499.
- Thierry, A., Fairhead, C. and Dujon, B.** (1990) The complete sequence of the 8.2 kb segment left of MAT on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for a yeast ribokinase. *Yeast*, **6**, 521–34.
- Thomas, B.J. and Rothstein, R.** (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619–630.
- Thomas, D.S., Hossack, J.A. and Rose, A.H.** (1978) Plasma-Membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **117**, 239–245.

- Tokuhiro, K., Muramatsu, M., Ohto, C., et al.** (2009) Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5536–43.
- Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B. and Turlings, T.C.J.** (2007) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.*, **49**, 16–26.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., et al.** (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, **294**, 2364–8.
- Turlings, T.C., Tumlinson, J.H. and Lewis, W.J.** (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, **250**, 1251–3.
- Vandamme, E.** (2003) Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Divers.*, **13**, 153–166.
- Vaudano, E., Moruno, E. and Stefano, R. Di** (2004) Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation. *J. Inst. Brew. Res.*, **110**, 213–219.
- Verstrepen, K.J., Moonjai, N., Bauer, F.F., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S. and Delvaux, F.R.** (2003) Brewing Yeast Fermentation Performance. In K. Smart, ed. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Vezzaro, A., Krause, S.T., Nonis, A., Ramina, A., Degenhardt, J. and Ruperti, B.** (2012) Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (*Olea europaea*) fruits. *J. Plant Physiol.*, **169**, 908–14.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S. and Manzanares, P.** (2008) Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.*, **25**, 778–85.
- Vilanova, M. and Sieiro, C.** (2006) Determination of free and bound terpene compounds in Albariño wine. *J. Food Compos. Anal.*, **19**, 694–697.
- Vourc'h, G., Garine-Wichatitsky, M. De, Labbé, A., Rosolowski, D., Martin, J.L. and Fritz, H.** (2002) Monoterpene effect on feeding choice by deer. *J. Chem. Ecol.*, **28**, 2411–27.
- Voynova, N.E., Rios, S.E. and Miziorko, H.M.** (2004) *Staphylococcus aureus* Mevalonate Kinase: Isolation and Characterization of an Enzyme of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway. *J. Bacteriol.*, **186**, 61–67.
- Wang, C.W., Oh, M.K. and Liao, J.C.** (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 235–41.
- Wang, G.** (2002) Amplification of HMG-CoA Reductase Production Enhances Carotenoid Accumulation in *Neurospora crassa*. *Metab. Eng.*, **4**, 193–201.
- Wang, K. and Ohnuma, S.** (1999) Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 445–451.
- Wilding, E.I., Brown, J.R., Bryant, A.P., et al.** (2000) Identification, Evolution, and Essentiality of the Mevalonate Pathway for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis in Gram-Positive Cocci. *J. Bacteriol.*, **182**, 4319–4327.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B. and Massy-Westropp, R.A.** (1982) Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, 2013–2020.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., et al.** (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901–6.

- Wise, M. and Croteau, R.** (1999) Monoterpene biosynthesis. In *Comprehensive Natural Products Chemistry. Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Oxford: Pergamon Press, pp. 97–153.
- Wolfertz, M., Sharkey, T.D., Boland, W. and Kühnemann, F.** (2004) Rapid regulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway during isoprene synthesis. *Plant Physiol.*, **135**, 1939–45.
- Wright, R., Basson, M., D'Ari, L. and Rine, J.** (1988) Increased amounts of HMG-CoA reductase induce “karmellae”: a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J. Cell Biol.*, **107**, 101–114.
- Yan, G., Liang, H., Duan, C. and Han, B.** (2012) Enhanced production of β -carotene by recombinant industrial wine yeast using grape juice as substrate. *Curr. Microbiol.*, **64**, 152–8.
- Yang, T., Li, J., Wang, H.X. and Zeng, Y.** (2005) A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry*, **66**, 285–93.
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T. and Sone, H.** (2002) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 501–8.
- Yu, S.G., Hildebrandt, L.A. and Elson, C.E.** (1995) Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J. Nutr.*, **125**, 2763–7.
- Yuan, T.T., Chen, Q.Q., Zhao, P.J., Zeng, Y., Liu, X.Z. and Lu, S.** (2011) Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol. *Nat. Products Bioprospect.*, **1**, 108–111.
- Yuba, A., Yazaki, K., Tabata, M., Honda, G. and Croteau, R.** (1996) cDNA cloning, characterization, and functional expression of 4S(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**, 280–7.
- Zietsman, A.J.J., Klerk, D. de and Rensburg, P. van** (2011) Coexpression of α -l-arabinofuranosidase and β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **11**, 88–103.