

Índice de contenidos

Introducción	1
1. Terpenos	3
1.1 Clasificación general.....	3
1.2 Función biológica.....	4
1.3 Aplicaciones y comercialización.....	6
1.4 Métodos de obtención.....	7
1.5 Biosíntesis. Ruta del ácido mevalónico y ruta del metil eritritol fosfato.....	9
1.6 Ingeniería metabólica de las rutas de biosíntesis.....	13
2. Monoterpenos	18
2.1 Clasificación.....	18
2.2 Función biológica.....	20
2.3 Aplicación industrial.....	21
2.4 Procesos de obtención.....	22
2.5 Biosíntesis. Monoterpeno sintasas.....	23
2.6 Ingeniería metabólica. Producción en plantas y microorganismos.....	25
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.1 Herramientas moleculares.....	28
3.2 Ruta de síntesis de isoprenoides.....	31
3.3 <i>S. cerevisiae</i> y la fermentación vínica.....	34
4. El aroma del vino	36
4.1 Aroma primario o varietal.....	36
4.2 Aroma secundario. Papel de <i>S. cerevisiae</i>	38
4.3 Aroma terciario. Procesos postfermentativos.....	39
4.4 Estrategias de mejora del aroma del vino.....	39
Objetivos y Plan de Trabajo	45
Materiales y Métodos	49
1. Microorganismos	51
1.1 Bacterias.....	51
1.2 Levaduras.....	51
2. Plásmidos	54
3. Oligonucleótidos	56
4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	58
4.1 <i>E. coli</i>	59

4.1.1 LB.....	59
4.1.2 MTB.....	59
4.2 <i>S. cerevisiae</i>.....	59
4.2.1 Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.....	59
4.2.1.1 SD.....	59
4.2.1.2 YPD.....	60
4.2.1.3 Medio de esporulación.....	60
4.2.1.4 Análisis de la estabilidad plasmídica.....	61
4.2.2 Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación.....	61
5. Manipulación de ácidos nucleicos.....	62
5.1 Construcción de plásmidos.....	62
5.1.1 pGEM-T Easy.....	62
5.1.2 Digestión.....	62
5.1.3 Tratamientos enzimáticos.....	63
5.1.4 Purificación de fragmentos de ADN.....	63
5.1.5 Ligación.....	63
5.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>.....	64
5.2.1 Extracción rápida.....	64
5.2.2 Recuperación de plásmidos.....	64
5.3 Recuperación de plásmidos de <i>S. cerevisiae</i>.....	65
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	65
5.4.1 PCR en gradiente.....	65
5.4.2 PCR de fusión.....	66
5.4.3 PCR asimétrica.....	66
5.5 Secuenciación de fragmentos de ADN.....	67
5.6 Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.....	67
5.7 Extracción de ADN de <i>S. cerevisiae</i>.....	68
5.7.1 Extracción rápida de ADN de <i>S. cerevisiae</i>	68
5.7.2 Extracción de ADN total.....	68
5.7.3 Extracción de ADN genómico.....	69
5.8 Análisis de fragmentos de ADN por el método Southern.....	69
5.9 Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i>.....	70
5.10 Análisis de ARN por el método northern.....	71
6. Manipulación de proteínas.....	71
6.1 Extracción de las proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i>	71
6.2 Cuantificación de proteínas.....	72
6.3 Determinación de actividades enzimáticas.....	72
7. Detección y cuantificación de terpenos.....	72

7.1 Cromatografía de gases.....	72
7.2 Espectrometría de masas.....	73
8. Métodos de transformación de microorganismos.....	73
8.1 <i>E. coli</i>	73
8.1.1 Preparación de células termocompetentes.....	73
8.1.2 Transformación por choque térmico.....	74
8.2 <i>S. cerevisiae</i>	74
9. Análisis bioinformáticos.....	75
Resultados y Discusión.....	79
I. Caracterización de la capacidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
para la producción heteróloga de monoterpenos.....	81
I.1 Evaluación del potencial productor de distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i>	81
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>	84
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>	86
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>	88
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>	90
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>	95
I.2 Selección de un vector de expresión adecuado para la producción de	
monoterpenos en <i>S. cerevisiae</i>	102
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>	106
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.....	109
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>	111
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>	114
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>	116
II. Optimización de la producción de monoterpenos mediante	
técnicas de ingeniería metabólica.....	120
II.1 Sobreexpresión de la región catalítica de la enzima Hmg1p.....	120

II.1.1 Construcción de plásmidos para la coexpresión del alelo <i>catHmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> en <i>S. cerevisiae</i>	123
II.1.2 Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresan el alelo <i>catHmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	124
II.1.3 Producción de monoterpenos en cepas derivadas de BQS252 y T ₇₃₋₄ que sobreexpresan el alelo <i>catHmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	125
II.2 Caracterización del efecto que tiene la sobreexpresión del gen <i>IDII</i> sobre la producción heteróloga de monoterpenos en <i>S. cerevisiae</i>	128
II.2.1 Construcción de plásmidos para sobreexpresar en <i>S. cerevisiae</i> el gen <i>IDII</i> junto con los genes <i>LIS</i> o <i>GES</i> , con y sin el alelo <i>catHmg1</i>	131
II.2.2 Obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresan el gen <i>IDII</i> y los genes <i>LIS</i> o <i>GES</i> , en presencia o ausencia del alelo <i>catHmg1</i>	132
II.2.3 La sobreexpresión del gen <i>IDII</i> incrementa la producción de linalol en la cepa de laboratorio BY4741Lis.....	133
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>IDII</i>	136
II.2.5 La mejora de la producción de monoterpenos derivada de la sobreexpresión del gen <i>IDII</i> se mantiene en la cepa vínica T ₇₃₋₄ , previamente seleccionada como la mejor adaptada a la producción heteróloga de estos metabolitos.....	137
II.2.6 La sobreexpresión conjunta del alelo <i>catHmg1</i> y del gen <i>IDII</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>	142
II.3 Manipulación de la síntesis y actividad de la enzima FPPS de <i>S. cerevisiae</i>	145
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>IDII</i> o el alelo <i>catHmg1</i>	148
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 <i>catHmg1</i> o el gen <i>IDII</i>	151
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>	155
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.....	158
II.3.5 Caracterización genética del locus <i>ERG20</i> de la cepa T ₇₃	160
II.3.6 La coexpresión del alelo <i>catHmg1</i> o el gen <i>IDII</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.....	164
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>	166
II.3.8 La sobreexpresión del alelo <i>catHmg1</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.....	170
II.3.9 La sobreexpresión del gen <i>IDII</i> en cepas haploides	
cuya actividad FPPS se ha complementado con el alelo <i>erg20-2</i>	
mejora la producción de linalol.....	172
III. Modulación del perfil aromático del vino	
mediante fermentación con cepas modificadas	
de <i>S. cerevisiae</i> productoras <i>de novo</i> de monoterpenos.....	177
III.1 Ensayos de microvinificación con la cepa vínica T₇₃₋₄	
de <i>S. cerevisiae</i> que expresa el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>.....	180
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 T₇₃₋₄ de <i>S. cerevisiae</i>.....	180
III.1.2 La expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en la cepa T₇₃₋₄ de <i>S. cerevisiae</i>	
da lugar a la producción <i>de novo</i> de cinco caracteres varietales en el vino.....	183
III.2 Regulación de los niveles de terpenoides presentes en el vino	
mediante fermentación mixta y técnicas de ingeniería metabólica.....	188
III.2.1 La fermentación mixta con T₇₃₋₄Ges y cepas de <i>S. cerevisiae</i>	
no productoras de monoterpenos sirve para modular los niveles de terpenoides.....	188
III.2.2 La sobreexpresión del gen <i>IDII</i> incrementa la producción <i>de novo</i>	
de terpenoides en condiciones de microvinificación.....	191
Discusión general.....	199
Conclusiones.....	209
Bibliografía.....	215

Listado de figuras

Figura 1. Evolución del mercado mundial de aromas y fragancias.....	7
Figura 2. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte I).....	10
Figura 3. Rutas de biosíntesis de terpenos (parte II).....	12
Figura 4. Cronograma de hitos relacionados con la ingeniería metabólica de terpenos.....	14
Figura 5. Genes implicados en la ruta de síntesis de terpenos de cadena corta en <i>S. cerevisiae</i>	33
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>	86
Figura 7. Producción de linalol en cepas de laboratorio y cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	90
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).....	93
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).....	95
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>	97
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>	107
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>	108
Figura 13. Esquema de las integraciones plasmídicas en el locus <i>URA3</i> de la cepa T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	110
Figura 14. Producción de monoterpenos en la cepa T ₇₃ -4 de <i>S. cerevisiae</i>	113
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>	116
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>	118
Figura 17. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que coexpresen el alelo <i>catHmg1</i> y el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	124
Figura 18. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de <i>catHmg1p</i>	126
Figura 19. Efecto de la sobreexpresión del alelo <i>catHmg1</i> en cepas que expresan el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	127
Figura 20. Plásmidos construidos para la obtención de cepas de <i>S. cerevisiae</i> que sobreexpresen el gen <i>IDII</i> , el alelo <i>catHmg1</i> , el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i> y el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	132
Figura 21. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>IDII</i> , con o sin la delección del gen <i>MOD5</i> , en el fondo genético BY4741Lis.....	135

Figura 22. Producción de linalol en cepas derivadas de T ₇₃₋₄ que sobreexpresan el gen <i>IDII</i> junto con el gen <i>LIS</i> de <i>C. breweri</i>	139
Figura 23. Producción de monoterpenos en cepas derivadas de T ₇₃₋₄ que sobreexpresan el gen <i>IDII</i> junto con el gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i>	141
Figura 24. Efecto de la coexpresión del alelo <i>cat</i> <i>hmg1</i> y el gen <i>IDII</i> sobre la producción de linalol.....	145
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>	150
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>IDII</i> y <i>cat</i> <i>hmg1</i>	151
Figura 27. Representación del proceso de esporulación y selección de las cepas Haploides derivadas de Y21258.....	154
Figura 28. Análisis genético de las cepas haploides derivadas de Y21258.....	155
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	157
Figura 30. Producción de linalol en la cepa Y21258.....	160
Figura 31. Alineamiento de las secuencias del gen <i>ERG20</i> de la cepa T ₇₃ y S288.....	163
Figura 32. Incremento de la producción de linalol mediante la sobreexpresión de la enzima <i>cat</i> <i>Hmg1p</i> o del gen <i>IDII</i> en la cepa Y21258Lis.....	165
Figura 33. Incremento de la producción de linalol mediante la complementación de la deleción del gen <i>ERG20</i> con el alelo <i>erg20-2</i>	168
Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de los alelos <i>erg20-2</i> y <i>cat</i> <i>hmg1</i> sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus <i>ERG20</i>	172
Figura 35. Efecto de la sobreexpresión de los alelos <i>erg20-2</i> e <i>IDII</i> sobre la producción de linalol en tres fondos genéticos diferentes para el locus <i>ERG20</i>	174
Figura 36. Mejora global de la producción de linalol a partir de la cepa de laboratorio BY4743.....	176
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>	181
Figura 38. Efecto de la cofermentación con cepas de <i>S. cerevisiae</i> productoras y no productoras de geraniol.....	190
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>IDII</i> y <i>LIS</i>	193
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>IDII</i> y <i>GES</i>	194
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).....	196

Listado 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>	17
Tabla 2. Clasificación de los monoterpenos.....	19
Tabla 3. Uso habitual de monoterpenos y derivados como aditivos en la industria alimentaria.....	21
Tabla 4. Relación de algunos de los genes que codifican monoterpeno sintasas.....	24
Tabla 5. Percepción sensorial de algunos monoterpenos y derivados.....	37
Tabla 6. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	51
Tabla 7. Listado de plásmidos utilizados en este estudio.....	54
Tabla 8. Oligonucleótidos.....	56
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>	100
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.....	113
Tabla 11. Valores de producción absoluta ^a (µg/L) y concentración relativa ^b (%) 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>IDII</i>	142
Tabla 12. Análisis metabolómico 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>	183
Tabla 13. Concentración de terpenoides detectada en vinos de la variedad Parellada fermentados con cepas derivadas de T ₇₃	186
Tabla 14. Terpenoides derivados de la expresión del gen <i>GES</i> de <i>O. basilicum</i> en la cepa T ₇₃	188