

Ingeniería metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de biocombustibles

MARÍA LAURA CAMESASCA

Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Orientador

Dra. Carina Gaggero

2015

Departamento de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis de Maestría, requirió del esfuerzo, dedicación y sobre todo del apoyo de mucha gente, en especial de mi tutora la Dra. Carina Gaggero. Sus conocimientos, su orientación, su dedicación y paciencia han sido fundamentales tanto para el desarrollo de este trabajo como para mi formación en la ciencia. ¡Muchas gracias!

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por su apoyo mediante la financiación del proyecto del Fondo Sectorial de Energía, FSE_1_2011_1_6068.

Gracias al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por permitirme llevar a cabo este trabajo de maestría dentro de su institución. También quiero agradecer al Laboratorio de Biotecnología de Aromas de Facultad de Química así como también al Laboratorio de Biología Celular de Membranas del Instituto Pasteur de Montevideo, donde se desarrollaron parte de las actividades de este trabajo.

Quiero agradecer por todo su apoyo a todos los que fueron mis compañeros de trabajo durante estos dos años, en especial al Lic. Manuel Minteguiaga, la Dra. Laura Fariña, la Dra. Valentina Salzman y a la Dra. Adriana Geisinger quienes, mediante su colaboración y consejos, fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a Eduardo, quienes han sido fuente de apoyo constante e incondicional en mi vida y más aún en esta última etapa que se volvió tan difícil. En especial, quiero dedicar y expresar mi más grande agradecimiento a dos personas fundamentales en mi vida, mi madre por todo su cariño y apoyo incondicional, y mi padre, quién si bien ya no está, hizo posible gracias a su cariño, su apoyo y su ayuda la culminación de esta etapa de mi carrera.

Índice	
Resumen.....	4
Capítulo 1	5
Introducción	5
1.1 Biocombustibles de uso automotriz.....	6
1.1.1 Bioetanol.....	7
1.1.2 Biodiesel	8
1.1.3 Biocombustibles emergentes	9
Biobutanol.....	9
Biocombustibles isoprenoides	9
Biohidrógeno	10
1.2 Isoprenoides.....	11
1.2.1 Clasificación de isoprenoides.....	12
1.2.2 Uso de los isoprenoides	13
Isoprenoides de importancia farmacéutica.....	13
Isoprenoides en los alimentos	14
1.2.3 Biosíntesis de isoprenoides.....	14
Ruta del Ácido Mevalónico (MVA)	15
Ruta del Metil Eritritol Fosfato (MEP)	16
Síntesis de isoprenoides de cadena larga.....	18
Rutas alternativas para la síntesis de IPP y DMAPP	19
Ruta alternativa en levaduras	21
1.3 Ingeniería de rutas metabólicas para la producción de isoprenoides	24
Modificación de la enzima FPPS en levaduras	25
Capítulo 2	28
Objetivos	28
2.1 Objetivo general.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 3	30
Materiales y Métodos	30
3.1 Cepas y plásmidos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.1.1 Cepas utilizadas y sus genotipos	31
3.1.2 Plásmidos utilizados	31
3.1.3 Cepas construidas	32
3.2 Medios de cultivo.	33
3.2.1 Medios de cultivos generales	33
YPD	33

Símil Mosto (YAN 206 mg/L)	33
Símil Mosto (YAN 75 mg/L)	34
Medio YNB	35
3.2.2 Medios de cultivos selectivos	35
Medio Mínimo –Leu/-Ura.....	35
YPD-G418	35
Medio mínimo SC con glicerol como única fuente de carbono	35
Medio mínimo SC de selección –Lys o –Met-Lys	36
3.3 Preparación de preinóculos y sus condiciones de cultivo.	36
3.4 Ensayos de producción de los compuestos de interés y sus condiciones de cultivo.	37
3.4.1 Ensayos de producción de isoprenoides.....	37
3.4.2 Ensayo de producción de alcoholes.....	38
3.5 Extracción y análisis de isoprenoides.	39
3.5.1 Extracción de isoprenoides en fase sólida	39
3.5.2 Determinación y cuantificación de isoprenoides	39
3.6 Extracción y análisis de alcoholes superiores.....	40
3.6.1 Extracción de alcoholes superiores.....	40
3.6.1 Determinación y cuantificación de alcoholes superiores	40
3.7 Extracción líquido-líquido de isoprenoides con dodecano.....	41
3.8 Protocolo de transformación de levaduras.....	41
3.9 Determinación del porcentaje de pérdida de plásmido.....	42
3.10 Reemplazo de promotores a nivel de cromosoma.	42
3.10.1 Cebadores utilizados	42
3.10.2 Protocolo para el reemplazo del promotor propio de <i>COQ1</i> a nivel del cromosoma.....	43
Amplificación de fragmentos con marcador KAN y promotores específicos	44
Transformación de cepas con fragmentos “kanMX_promotores específicos”	44
Chequeos de las construcciones en el cromosoma.....	45
Mating de las transformantes.....	47
Obtención de las dipolides con promotores <i>GPD</i> y <i>TEF</i>	47
Esporulación y disección de tétradas	50
3.11 Métodos de extracción y cuantificación de proteínas.	51
3.11.1 Extracción de proteínas totales	51
3.11.2 Extracción de proteínas mitocondriales	52
Obtención de los esferoplastos.....	52
Obtención de las proteínas mitocondriales	52
3.11.3 Cuantificación de proteínas	53

3.12	Separación de proteínas en geles de poliacrilamida	53
3.13	Ensayos de Western Blot.	54
3.13.1	Transferencia	54
3.13.2	Detección Inmunológica.....	55
3.13.3	Revelado	55
3.14	Análisis estadístico	56
Capítulo 4	57
Resultados y Discusión	57
4.1	Sobreexpresión del gen <i>COQ1</i> en la cepa de laboratorio BY4743.....	58
4.1.1	Producción de isoprenoides al sobreexpresar el gen <i>COQ1</i> clonado en plásmidos en la cepa de laboratorio BY4743.....	58
4.1.2	Sobreexpresión del gen <i>COQ1</i> en la cepa de laboratorio BY4743 mediante el reemplazo de su promotor a nivel del cromosoma	61
4.1.2.1	Amplificación de región: – marcador(KAN)/promotores específicos –	62
4.1.2.2	Cambio de promotor en cepas BY4741 y BY4742	63
4.1.2.3	Obtención de las diploides con los nuevos promotores de <i>COQ1</i>	66
4.2	Producción de isoprenoides al sobreexpresar <i>COQ1</i> mediante una modificación en el cromosoma de <i>S. cerevisiae</i>	67
4.3	Análisis de la sobreproducción de la proteína Coq1p en las cepas modificadas en el cromosoma.....	70
4.3.1	Medida de la presencia de Coq1p en extractos totales de células.....	70
4.3.2	Medida de la presencia de Coq1p en extractos mitocondriales	72
4.4	Evaluación del crecimiento y producción de isoprenoides en <i>S. cerevisiae</i> en diferentes condiciones de cultivo.....	74
4.5	Producción de isoprenoides al sobreexpresar el gen <i>COQ1</i> clonado en plásmidos en distintos contextos genéticos.	78
4.6	Producción de alcoholes superiores en cepas que sobreexpresan Coq1p. ..	86
4.7	Extracción con dodecano.	88
Capítulo 5	90
Conclusiones	90
Bibliografía	93
Anexo I	100
	Plásmidos de Euroscarf utilizados en el protocolo de Toolbox kit, para los cambios de promotor en el cromosoma.....	101
Anexo II	103
	Análisis estadístico	104

Resumen

Los altos costos y reservas limitadas del petróleo, así como los efectos ambientales de su uso, han repercutido en la investigación y desarrollo de nuevos biocombustibles renovables. Los terpenos o isoprenoides son compuestos derivados del isopreno, producidos mayoritariamente por plantas y utilizados en la producción de medicamentos, fragancias, pesticidas, desinfectantes, aditivos de alimentos, etc. Recientemente se ha considerado su uso como biocombustibles debido a su alto contenido energético y elevado octanaje. En trabajos previos del grupo se demostró que cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de sintetizar monoterpenos *de novo* en un medio artificial que simula un mosto de uva y se propuso la participación de la proteína Coq1p de *S. cerevisiae*. Hasta el momento no se había reportado que *S. cerevisiae* pudiera sintetizar monoterpenos ya que el precursor de los mismos no se encuentra disponible en levaduras, a diferencia de lo que sucede en plantas.

En este trabajo se buscó maximizar la producción de compuestos con propiedades biocombustibles (isoprenoides y alcoholes superiores). Para ello, se sobreexpresó el gen *COQ1*, clonado en plásmidos, en diferentes contextos genéticos y mediante una construcción estable en el cromosoma, reemplazando el promotor propio de *COQ1* por promotores fuertes. Variando la concentración de nitrógeno asimilable en el medio se ajustaron las mejores condiciones de producción tanto de isoprenoides como de alcoholes superiores. Trabajando con la cepa de laboratorio BY4743 en un medio de cultivo sintético que simula un mosto de uva y en presencia de un plásmido de alto número de copias que sobreexpresa el gen *COQ1* fue posible obtener altos niveles del monoterpeno linalol y los sesquiterpenos nerolidol y farnesol. Mediante la sobreexpresión de *COQ1* en el mismo contexto genético pero con una mutación en la farnesil pirofosfato sintasa (mutación K197E en *erg20*) se lograron niveles aún mayores de linalol (por encima de 700 µg/L) y una concentración total de isoprenoides volátiles mayor a 1.3 mg/L. Aunque la sobreexpresión de *COQ1* desde el cromosoma no fue exitosa ya que Coq1p no se localizó correctamente en la mitocondria, en este trabajo se demostró que es posible modular la producción de isoprenoides volátiles de *S. cerevisiae* en ausencia de genes o precursores vegetales. Se logró obtener una concentración final de linalol diez veces mayor que la obtenida hasta el momento mediante la expresión en *S. cerevisiae* de una linalol sintasa vegetal. Se realizaron ensayos preliminares de extracción líquido-líquido que permitiría la extracción y concentración de los isoprenoides en una escala industrial

Capítulo 1

Introducción



1.1 Biocombustibles de uso automotriz

Los combustibles de origen fósil cubren hoy en día, más del 80% de la demanda energética a nivel mundial. Sin embargo, debido a su alto nivel de consumo por la población humana, y su condición de fuentes de energía no renovables, se estima que sus reservas llegarán a un estado crítico dentro de 45, 60 y 120 años para el petróleo, gas natural y carbón respectivamente. Por otra parte, la combustión de estas fuentes de energía ha aumentado drásticamente la emisión de CO₂ desde mediados del siglo XVIII hasta la actualidad contribuyendo a la generación de grandes problemas medio ambientales, tales como el daño a la capa de ozono y el efecto invernadero (Guo et al. 2015). De esta manera, la investigación e invención de nuevas tecnologías, que puedan utilizar recursos renovables, y a su vez resulten amigables con el medio ambiente es uno de los grandes desafíos de la ciencia en la actualidad.

Es en este contexto que surgen los biocombustibles, refiriéndose este término a los combustibles para el transporte obtenidos a partir de materias primas de origen biológico, también referidas como biomasa. El concepto de la utilización de biomasa como fuente de energía renovable, consiste en la captación de la energía solar y CO₂ del ambiente, los cuales son fijados en la biomasa vegetal, para ser posteriormente utilizados directamente como energía (combustión), o convertidos a biocombustibles (Klass 2004). Los biocombustibles son producidos principalmente a partir de cultivos con alto contenido de azúcares, tales como la caña de azúcar y maíz, para dar lugar a la producción de bioetanol, o alto contenido de aceites para la producción de biodiesel. Este tipo de biocombustibles, que proviene de cultivos que también son utilizados en la industria alimentaria, se conocen como biocombustibles de primera generación. En la actualidad, la atención está enfocada hacia la búsqueda de biocombustibles sustentables, que no interfieran en la industria alimentaria. En esta segunda clasificación se encuentran los biocombustibles de segunda generación (desechos sólidos, biomasa lignocelulósica, desechos de cultivos, etc), los de tercera generación (producción de aceites y biodiesel por algas) y los de cuarta generación (utilizan aceites vegetales y biodiesel para la producción de gasolina)(Gupta et al. 2014).

La producción de biocombustibles ha aumentado significativamente a lo largo de estos últimos diez años. Hoy en día, los biocombustibles cubren el 3.4% de la demanda mundial de combustible para el uso automotriz, siendo los principales productores Brasil, Estados Unidos y la Unión Europea, los cuales cubren su demanda utilizando biocombustibles en un 21%, 4% y 3% respectivamente (Ho et al. 2014).

1.1.1 Bioetanol

El bioetanol es el biocombustible producido en mayor volumen a nivel mundial y proviene en un 80% de tecnologías de primera generación (Dutta et al. 2014). Hoy en día existen más de 650 plantas productoras de bioetanol, las cuales en su conjunto producen alrededor de 100 billones de litros por año (Ho et al. 2014). Los principales productores de bioetanol son EE.UU, Brasil, Europa, China y Canadá, a partir de materias primas tales como: maíz, caña de azúcar, trigo, remolacha azucarera y mandioca (Guo et al. 2015).

El bioetanol puede ser producido mediante la fermentación directa de los azúcares simples, como en el caso de la sacarosa de la caña de azúcar; mediante la hidrólisis enzimática de azúcares más complejos como el almidón (maíz, boniato, mandioca, etc) y su posterior fermentación. También puede ser producido, mediante procesos más complejos como es el caso de la biomasa lignocelulósica que requiere de pretratamientos físico-químicos y/o enzimáticos, para liberar las hexosas y pentosas provenientes de la celulosa y hemicelulosa, dejando los azúcares disponibles para ser fermentados a etanol (Gupta et al. 2014).

Actualmente, se utilizan mezclas de bioetanol en gasolina, en distintos porcentajes que van desde 5% hasta el 25% sin provocar alteraciones tanto en el equipamiento como el funcionamiento del vehículo (Naik et al. 2010). En el caso de vehículos de combustible flexible (en inglés flexible-fuel vehicle-FFV-), se utilizan mezclas de hasta 85% de bioetanol, sin inconvenientes (Bergthorson & Thomson 2015).

El proceso de producción de etanol, a partir de materias primas azucaradas, es un proceso simple y ampliamente conocido, ya que la fermentación alcohólica ha sido utilizada en la producción de bebidas alcohólicas desde hace centenares de años. Otra de las grandes ventajas de la producción de etanol, es que existe una gran diversidad de microorganismos conocidos que lo producen. También es importante destacar, que el elevado número de octano¹ del etanol, (RON -Research Octane Number- de 109), lo vuelve muy atractivo ya que en mezclas con gasolina eleva el octanaje de las mismas (Bergthorson & Thomson 2015). Sin embargo, el etanol como biocombustible tiene varias desventajas entre las que se destacan, su miscibilidad total con el agua lo que puede generar problemas en el funcionamiento del vehículo además de dificultar su

¹ El octanaje, es una medida relativa de la capacidad de autoignición de un combustible de interés, medida en un motor, con respecto a los combustibles de referencia primaria, n-heptano cuyo RON (Research Octane Number) es cero, y iso-octano cuyo RON es igual a 100 (Bergthorson & Thomson 2015). El grado de autoignición, disminuye a elevados valores de RON.

purificación, es higroscópico, volátil (lo que puede generar problemas de seguridad) y tiene aproximadamente el 66% del contenido energético de la gasolina (Ho et al. 2014; Ghim et al. 2010).

1.1.2 *Biodiesel*

Otro biocombustible que ha acaparado la atención en lo que refiere a políticas medio ambientales y energéticas es el biodiesel, alcanzando en 2013 una producción mundial mayor a los 23800 millones de litros (Guo et al. 2015). El biodiesel se considera una fuente de energía renovable no tóxica, biodegradable, con pocas emisiones de materiales particulados y gases de efecto invernadero. El método convencional de producción de biodiesel consiste en la transesterificación de triglicéridos, generalmente de origen vegetal, con un alcohol (metanol o etanol) en presencia de un catalizador ácido o básico (Abdelmoez & Mustafa 2014).

Los triglicéridos utilizados para la producción de biodiesel pueden provenir de fuentes muy diversas tales como grasas animales (cebo vacuno, grasa de cerdo, grasa de pollo, etc), aceites obtenidos a partir de algas, y sobre todo, a partir de aceites vegetales. Dentro de las plantas oleaginosas más utilizadas se encuentran la canola, ricino, coco, jatrofa, palma, maní, colza, soja y girasol (Guo et al. 2015).

El biodiesel puede ser utilizado en motores diésel con ignición por compresión, puro o en mezclas con diésel de petróleo. Las mezclas más conocidas a nivel mundial son B2 (2% de biodiesel y 98% de diésel de petróleo), B5, el cual se utiliza actualmente en nuestro país (<http://www.alur.com.uy/>) y consta de 5% de biodiesel y 95% de diésel de petróleo, y B20 (20% de biodiesel y 80% de diésel de petróleo) (Ho et al. 2014). Dentro de sus ventajas se puede destacar que tiene un alto punto de inflamabilidad o del inglés “flash point”² que varía entre los 110-190 °C lo que lo convierte en uno de los combustibles más seguros, así como elevado número de cetano³ que varía entre 50-62. Sin embargo, su valor calórico es aproximadamente un 9% menor al diésel de petróleo variando su densidad energética principalmente con la materia prima utilizada (Aransiola et al. 2014; Guo et al. 2015). También, ya que en su mayoría es producido a partir de materias primas que también son utilizadas en la industria alimenticia (combustibles de

² Flash point o punto de inflamabilidad se define como la temperatura mínima de un líquido a la cual su presión de vapor es lo suficientemente elevada como para producir una mezcla inflamable con aire.

³ El número de cetano, es una propiedad de los combustibles para motores diésel, que mide la propensión a la ignición del combustible pulverizado en un motor estándar de prueba. Altos valores de cetano indican que el combustible se encenderá con mayor rapidez (Bergthorson & Thomson 2015).

primera generación) tiene como desventaja su competencia con el consumo de alimentos (Aransiola et al. 2014).

1.1.3 Biocombustibles emergentes

Biobutanol

El butanol, así como otros alcoholes superiores (propanol, isopropanol, pentanol, etc), se han vuelto objeto de gran interés en la investigación de biocombustibles. Esto se debe a que se ha comprobado que son mejores biocombustibles que la gasolina ya que tienen mayor densidad energética, menor volatilidad, y son menos higroscópicos. Esto permite que el butanol pueda ser utilizado en mezclas en mayor porcentaje que el etanol, sin generar problemas de corrosión (Xue et al. 2014).

Se puede obtener butanol mediante procesos de fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol). Dentro de los microorganismos más utilizados para estos procesos se destacan los del género *Clostridia*, siendo los más utilizados: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*. Estos microorganismos pueden fermentar distintos azúcares (glucosa, xilosa, etc), pudiéndose utilizar como sustrato distintas materias primas azucaradas tales como maíz (almidón), melasas (sacarosa), etc (Guo et al. 2015; Huang et al. 2014).

A pesar de los beneficios que ofrece el butanol como biocombustible, éste cuenta con la gran desventaja de ser tóxico para los microorganismos que lo producen, generándose por lo tanto, en concentraciones no mayores a los 20 g/L de butanol. También, al estar presente en el medio de fermentación en tan baja concentración, se dificulta y vuelve onerosa su separación (Ghim et al. 2010; Huang et al. 2014).

Biocombustibles isoprenoides

Los combustibles de origen isoprenoide se presentan como una alternativa atractiva debido a su gran diversidad estructural que se asemeja a la composición de los combustibles de origen fósil. Se conocen más de 50.000 estructuras isoprenoides diferentes dentro de los que se destacan como potenciales combustibles: isopreno, terpineno, pineno, limoneno, sabineno, farnesano, isopentenol, terpineol, geraniol y farneseol (Ruffing 2013).

Además de las propiedades fisicoquímicas similares a las de los combustibles de origen fósil, los combustibles de origen isoprenoide actuarían disminuyendo la ignición prematura y aumentando el número de octano, ya que la presencia de compuestos ramificados estabiliza a los radicales inducidos por la alta presión. En el caso de los motores con ignición por compresión, si bien los compuestos ramificados disminuyen el número de cetano, pueden disminuir el punto de congelación (Peralta-Yahya et al. 2012). Sin embargo, la producción de biocombustibles isoprenoides se encuentra aún

muy limitada, ya que la producción de estos compuestos por las plantas es muy baja, y la síntesis química es compleja y costosa (Misawa 2011).

Actualmente, la atención se enfoca a la modificación de rutas metabólicas mediante ingeniería genética en microorganismos heterólogos tales como *E. coli* y *S. cerevisiae*, para lograr altos niveles de producción de isoprenoides (Misawa 2011; Peralta-Yahya et al. 2012).

Biohidrógeno

Otro combustible alternativo prometedor es el hidrógeno. Éste puede ser producido a partir de diferentes materias primas, entre las que se encuentran, combustibles fósiles, agua y biomasa. Si bien actualmente la mayor parte del hidrógeno es producido a partir de combustibles fósiles, existe gran interés en la investigación de la producción mediante procesos biológicos. Existe una variedad de microorganismos con la capacidad de producir hidrógeno entre los que se destacan las microalgas y cianobacterias, pudiéndose a su vez utilizar una amplia variedad de sustratos: desechos de la industria alimenticia con restos de almidón, desechos de la industria del biodiesel, materiales lignocelulósicos, desechos orgánicos de hogares, etc (Singh & Wahid 2015; Azwar et al. 2014).

El hidrógeno, tiene un alto contenido energético (122 kJ/g), esto es 2.75 veces más que los combustibles de origen fósil. También se destaca como ventaja que su principal producto de combustión es el agua que a su vez puede ser reutilizada para la producción de hidrógeno. Sin embargo, los rendimientos de producción mediante procesos biológicos son aún muy bajos y costosos. También, su utilización implica una reforma de toda la infraestructura de distribución de combustible, así como otras medidas de seguridad para su manejo, debido a su alto contenido energético (Singh & Wahid 2015; Bergthorson & Thomson 2015).

En la tabla 1, se presentan las ventajas y desventajas de los biocombustibles más utilizados.

Tabla 1. Ventajas y desventajas asociadas a algunos biocombustibles.

Biocombustible	Ventajas	Desventajas
<i>Etanol</i>	Fácil producción Altos niveles de producción Procesos conocidos Se produce actualmente a nivel industrial	Es miscible con agua Es higroscópico Bajo contenido energético Muy volátil Necesita motores modificados
<i>Biodiesel</i>	Utiliza desechos de aceite vegetal Alto contenido energético Produce glicerol Se produce actualmente a nivel industrial	Se utilizan sustancias corrosivas Biocatalizadores son muy costosos Necesita la remoción del metanol y catalizador
<i>Butanol</i>	Fácil producción Alto contenido energético Procesos conocidos Baja miscibilidad con el agua No necesita modificación en los motores	Bajos rendimientos de producción Difícil de purificar Mayor toxicidad que el etanol Formación de subproductos no deseados
<i>Isoprenoides</i>	Estructura similar a los combustibles de origen fósil Alto contenido energético Baja miscibilidad con el agua No necesita modificación en los motores	Se obtienen naturalmente en muy baja concentración Difícil extracción de sus fuentes naturales Se necesita mayor información sobre sus procesos de producción.
<i>Hidrógeno</i>	Alto contenido energético Amigable con el medio ambiente Actualmente la mayor parte se produce a partir de combustibles de origen fósil	La obtención mediante procesos biológicos tiene bajos rendimientos Necesita modificación de motores y de la actual infraestructura de distribución de combustible

Adaptado de (Ghim et al. 2010)

1.2 Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenoides forman el grupo más grande y diverso tanto estructuralmente como funcionalmente de compuestos producidos por sistemas biológicos, ya que están involucrados en la síntesis de los esteroides de las membranas plasmáticas eucariotas y carotenoides de algunas bacterias. Tienen roles de gran importancia en diferentes rutas metabólicas tales como la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas, plastoquinona), respiración (ubiquinona), regulación hormonal del metabolismo (esteroides), regulación del crecimiento y desarrollo (ácido giberélico, ácido abscísico, citoquininas, etc), defensa contra el ataque de patógenos, transducción intracelular de señales, integridad y fluidez de la membrana plasmática (esteroides, dolicoles, carotenoides), etc (Tippmann et al. 2013; Maury et al. 2005).

Si bien los isoprenoides de cadena larga están involucrados en roles muy importantes en todos los seres vivos tales como el crecimiento y desarrollo, son aquellos de bajo peso molecular (mono y sesquiterpenos), producidos por plantas y algunos microorganismos, los de mayor interés para los fines de este trabajo. La mayoría de éstos son moléculas lipofílicas con elevada presión de vapor a temperatura ambiente, lo que resulta una propiedad atractiva para su uso como biocombustibles. La baja presión de vapor en un combustible retarda la ignición y genera problemas en la combustión (Loreto et al. 2014; Freitas et al. 2012).

Los isoprenoides pueden ser utilizados en una amplia gama de productos comerciales que abarcan desde artículos farmacéuticos, cosméticos, alimenticios hasta combustibles, lo que les brinda una gran importancia social y comercial.

1.2.1 Clasificación de isoprenoides

Los isoprenoides derivan su nombre de su precursor universal, la molécula de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) y pueden ser clasificados desde el punto de vista estructural, según el número de moléculas de isopreno que componen el esqueleto carbonado. Las moléculas de isopreno metabólicamente activas se conocen como isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). En la tabla 2, se presenta dicha clasificación, con ejemplos de algunos isoprenoides comunes y sus funciones (Closa Calvo 2008; Barquet 2012).

Tabla 2. Clasificación estructural de isoprenoides y sus funciones.

<i>Isoprenoides</i>	<i>Moléculas de IPP</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Funciones</i>	
<i>C₅</i>	<i>Hemiterpenos</i>	1	2-metil-1,3-butadieno	Precursor de isoprenoides. Es liberado por las hojas de los álamos
<i>C₁₀</i>	<i>Monoterpenos</i>	2	Mentol, geraniol, limoneno, pineno, citronelol, etc.	Se encuentran en los aceites esenciales. Tienen actividad antimicrobiana y atraen polinizadores. Se utilizan en la industria de aromas.
<i>C₁₅</i>	<i>Sesquiterpenos</i>	3	Farnesol, nerolidol, artemisina	Muchos se encuentran en los aceites esenciales. Pueden tener actividad antimicrobiana y repelente de herbívoros.
<i>C₂₀</i>	<i>Diterpenos</i>	4	Fitol (forma parte de la clorofila) Vitaminas A, E y K Paclitaxel (Taxol) Giberelinas	Funciones estructurales y hormonales. Importantes en la industria farmacéutica.
<i>C₃₀</i>	<i>Triterpenos</i>	6	Esteroles Brassinosteroides	Estructura y fluidez de la membrana plasmática Reguladores del desarrollo Fitohormonas
<i>C₄₀</i>	<i>Tetraterpenos</i>	8	Xantofilas Carotenos Licopeno Ác. abscísico	Pigmentos vegetales Fitohormonas Importantes en la industria farmacéutica.
<i>C_{>40}</i>	<i>Politerpenos</i>	>8	Cadena lateral de ubiquinona y plastoquinona Dolicoles	Transporte electrónico Glicosilación de proteínas

1.2.2 *Uso de los isoprenoides*

Los isoprenoides, debido a su gran diversidad estructural, resultan de gran importancia tanto en la medicina como en la industria alimenticia. En el primer caso, se destaca el rol antioxidante de los carotenoides así como la abundancia de drogas con estructura isoprenoide utilizadas para tratamientos de diversas enfermedades. En la industria alimenticia se destaca su rol como saborizantes y aromas (limoneno, mentol, etc), así como también colorantes para alimentos (carotenoides) (Maury et al. 2005).

Isoprenoides de importancia farmacéutica

Varios isoprenoides han resultado de gran importancia para la salud humana, siendo los casos más conocidos el de la Artemisina (droga para el tratamiento de la malaria) y el del Taxol (droga para el tratamiento del cáncer).

La Artemisina, una lactona sesquiterpénica, fue aislada en 1972 a partir de plantas de ajeno dulce (*Artemisia annua*). En la actualidad, el tratamiento recomendado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) se basa en terapias combinadas basadas en la artemisina. Este tratamiento, si bien resulta el más efectivo contra el *Plasmodium sp.*, resistente a la cloroquina, es también el más costoso, ya que en las plantas sólo se producen bajas cantidades. La familia de las Artemisinas está también siendo estudiada en busca de compuestos con propiedades anticancerígenas, repelente de insectos, herbicida, etc. Se han desarrollado mejoramientos genéticos de *A. annua*, siendo el más popular el A3, que es actualmente cultivado en el centro y este de África (Odundo et al. 2013; Abdin & Alam 2015; Keasling 2010).

El Paclitaxel, conocido por su nombre comercial Taxol, es un diterpeno extraído del árbol de tejo o *Taxus brevifolia*. Actualmente se usa en tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer, teniendo elevada efectividad en el tratamiento de cáncer de ovario, de mama, de pulmón y melanomas. Actualmente, el Taxol se obtiene por síntesis semisintética a partir de 10-desacetilbaccatina, extraída del árbol de tejo (Gokul Raj et al. 2015; Keasling 2010).

Isoprenoides en los alimentos

En lo que refiere a su rol en la industria alimenticia, uno de los más conocidos es el de los aromas en los vinos. Éste proviene tanto de los compuestos vegetales, como de aquellos producidos por la levadura en el proceso de fermentación. El característico aroma del vino está determinado por más de 1300 compuestos volátiles dentro de los que se encuentran alcoholes, ésteres, ácidos, aldehídos, isoprenoides, lactonas y cetonas en distintas concentraciones (Fariña et al. 2015).

Dentro del grupo de los isoprenoides, los monoterpenos son de gran importancia para el aroma de un vino. Éstos, varían en composición y concentración dependiendo de la variedad utilizada de *Vitis vinifera*. A su vez, los monoterpenos pueden estar libres o glicosilados (sin aroma). Las levaduras, con excepción de algunas pocas especies, no resultan buenas productoras de monoterpenos. Por lo tanto, se llevan a cabo actualmente numerosas investigaciones con el objetivo de construir levaduras modificadas con la capacidad de producir monoterpenos (Cordente et al. 2012; Carrau et al. 2005). También son importantes para la industria de fragancias y como aromas de alimentos, dulces y bebidas.

1.2.3 Biosíntesis de isoprenoides

La biosíntesis de los terpenoides, comenzó a ser dilucidada a partir de la década de los 50 y 60 mediante la utilización de mutantes en enzimas claves, así como también

mediante aproximaciones bioquímicas clásicas y ya luego más tarde a fines de los 90, mediante el seguimiento de los precursores marcados con C¹³ (Rodríguez Villalón 2010; Moise et al. 2014).

Los precursores biosintéticos de los isoprenoides, IPP y/o DMAPP, son producidos en todos los organismos, con la única excepción de aquellos organismos intracelulares obligados, como es el caso de las bacterias del género *Rickettsia* y micoplasmas (Moise et al. 2014).

La biosíntesis de isoprenoides se puede dividir en tres etapas: 1) síntesis de los precursores estructurales IPP o DMAPP, éstos pueden ser sintetizados mediante dos rutas biosintéticas diferentes, la ruta del ácido mevalónico (MVA), o la ruta del eritritol fosfato (MEP); 2) síntesis de geraniol pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeraniol pirofosfato (GGPP), precursores de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos respectivamente; 3) por último, se encuentran todas las reacciones de ciclación, isomerización, hidroxilación, metilación, etc., que dan lugar a la amplia variedad de compuestos isoprenoides existentes en la naturaleza (Closa Calvo 2008).

Ruta del Ácido Mevalónico (MVA)

La ruta MVA, fue la primera en ser estudiada, y durante mucho tiempo se pensó que era la única ruta involucrada en la síntesis de isoprenoides. Esta ruta está presente en el citoplasma de todas las células animales, hongos y arqueobacterias (Moise et al. 2014).

La ruta MVA genera IPP y DMAPP, a partir de acetil-CoA, mediante 7 reacciones enzimáticas. El primer paso de la ruta es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediante la acetil-CoA acetiltransferasa (AACT), para dar lugar a la formación de acetoacetil-CoA. La AACT en levaduras, codificada por *ERG10*, tiene dos isoformas con diferente localización subcelular (citosol y mitocondria). La reacción siguiente, catalizada por la HMG-CoA sintasa (HMGS), producto del gen *ERG13*, da lugar a la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La reacción limitante de la ruta es la reducción de HMG-CoA mediante la utilización de dos equivalentes de NADPH, llevada a cabo por la HMG-CoA reductasa (HMGR), dando como producto ácido mevalónico (MVA). En *S. cerevisiae*, a diferencia de los humanos, existen dos copias del gen que codifica para la HMGR, *HMG1* y *HMG2*, aunque el producto del gen *HMG1* sería el responsable de la mayor parte de la actividad enzimática en cepas salvajes. La disrupción de cualquiera de estos dos genes, da lugar a un mutante inviable. El MVA sufre luego reacciones de fosforilación y descarboxilación para dar lugar a la formación de IPP. Estas reacciones son llevadas a cabo por la mevalonato quinasa (MVK), fosfomevalonato quinasa (PMK)

y mevalonato difosfato descarboxilasa (MPD), productos de los genes *ERG12*, *ERG8* y *ERG19*. El IPP puede ser convertido a DMAPP, por la acción de dos enzimas IPP:DMAPP isomerasas (W. Chang et al. 2013; Maury et al. 2005; Tippmann et al. 2013). Ver esquema de rutas biosintéticas en figura 1.

Ruta del Metil Eritritol Fosfato (MEP)

La ruta del MEP se encuentra presente en los plástidos de plantas y algas verdes, la mayoría de las eubacterias y algunos protozoarios endoparásitos. Las plantas y algunas bacterias (*Streptomyces*) pueden utilizar tanto la vía MEP como la MVA (Moise et al. 2014; W. Chang et al. 2013).

Mediante la ruta MEP se producen IPP y DMAPP en ocho reacciones a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (G3P). La condensación de estas dos moléculas es catalizada por la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), dependiente de timina, para dar lugar al producto desoxixilulosa-5-fosfato (DXP). Esta enzima es la limitante de la ruta de MEP, y existen en plantas dos o más genes que la codifican. En un segundo paso el DXP sufre una isomerización reductiva a 2-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), por la enzima DXP-reducto isomerasa (IspC). Posteriormente el MEP es convertido al precursor activo 4-citidina 5'-difosfato-2-metileritritol (CDP-ME), paso catalizado por la CDP-ME transferasa (IspD). Seguidamente el CDP-ME es fosforilado a 4-citidina 5'-difosfato-2-metileritritol-2-fosfato (CDP-MEP), por la CDP-ME quinasa (IspE), siendo posteriormente ciclado a 2-metileritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-cPP), por la ME-cPP ciclasa (IspF). Los últimos dos pasos de la ruta son catalizados por dos enzimas que contienen grupos (4Fe4S) necesarios para ejercer su actividad reductora. Primero, la 4-hidroxi-3-metil-2-butenil difosfato (HMBPP) sintasa (IspG) lleva a cabo la apertura del anillo de ME-cPP seguido por una reducción por deshidratación, dando lugar a la formación de HMBPP. La HMBPP reductasa (IspH) lleva a cabo la reducción por deshidratación de HMBPP, dando como producto una mezcla de IPP y DMAPP, en una relación 5:1 (Rodríguez Villalón 2010; W. Chang et al. 2013; Moise et al. 2014). Ver esquema de rutas biosintéticas en figura 1.

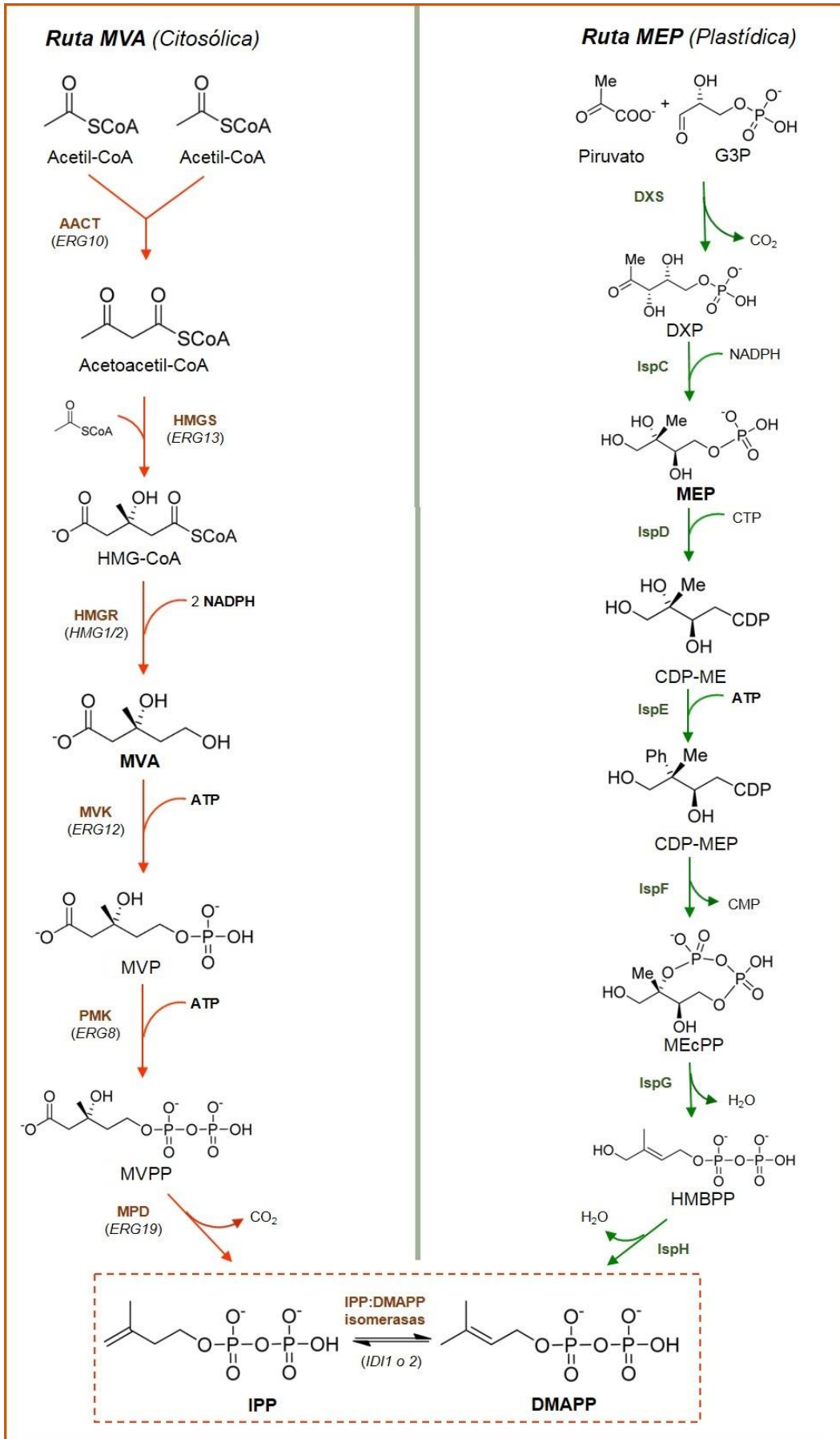


Figura 1. Rutas metabólicas de síntesis de IPP y DMAPP, adaptado de Moise et al. 2014.

Síntesis de isoprenoides de cadena larga

Las moléculas de IPP y DMAPP funcionan como bloques a partir de los cuales se construyen precursores prenildifosfatos de cadena larga, esta acción es realizada por prenildifosfato sintasas que catalizan la condensación secuencial de moléculas de IPP. Mediante la unión de IPP a una molécula de DMAPP se forma el precursor de monoterpenos geraniol difosfato (GPP, C₁₀), la condensación de una segunda molécula de IPP da lugar a la formación de farnesil difosfato (FPP, C₁₅), precursor de sesquiterpenos, y la adición de un tercer IPP da lugar a la formación de geraniol geraniol difosfato (GGPP, C₂₀), precursor de diterpenos. La unión de dos moléculas de FPP da como producto escualeno, precursor estructural de los triterpenos. La unión de dos GGPP da lugar a la formación de tetraterpenos. Los politerpenos se forman mediante la condensación de sucesivas moléculas de IPP sobre FPP. Las prenildifosfato sintasas son selectivas para el largo de la cadena y estereoquímica de sus sustratos. En cambio, las ciclasas de terpenos (encargadas de ciclar el GPP para producir monoterpenos, FPP para producir sesquiterpenos y GGPP para producir diterpenos) pueden utilizar distintos sustratos, e incluso algunas pueden producir numerosos productos a partir de un único sustrato (Closa Calvo 2008; Keasling 2010). En la figura 2 se muestra un esquema simplificado, de estas reacciones.

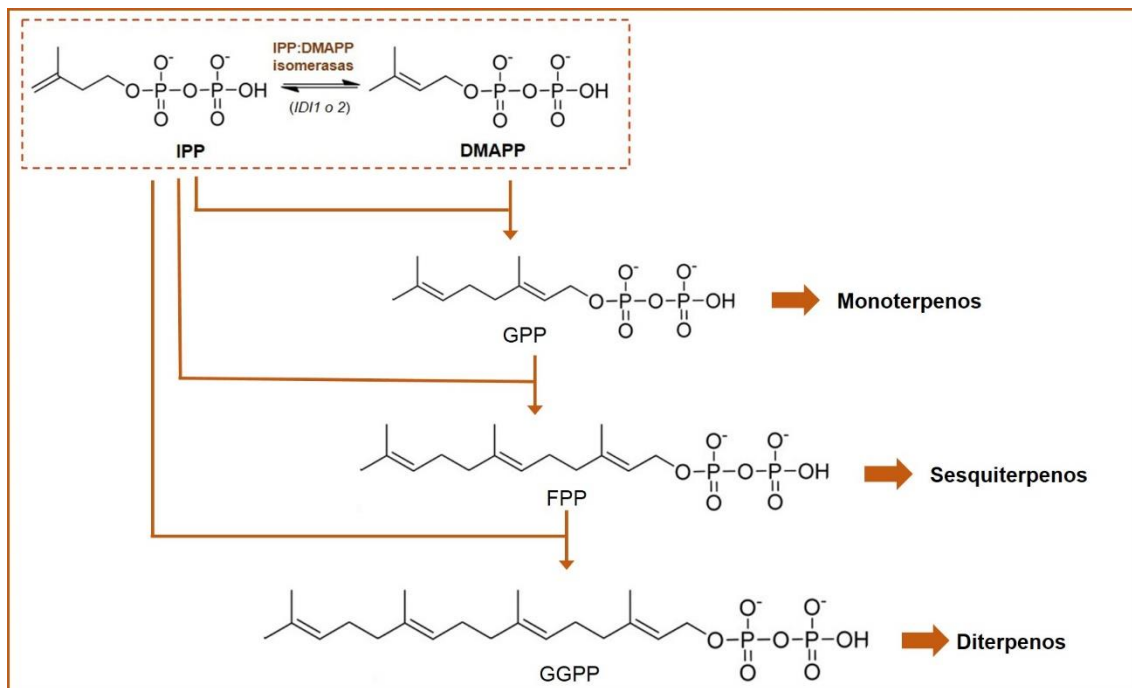


Figura 2. Esquema de la síntesis de isoprenoides de cadena larga a partir de IPP y DMAPP, adaptado de Keasling 2010.

Rutas alternativas para la síntesis de IPP y DMAPP

A partir del análisis de secuencias de genomas de arqueobacterias se observó, que muchas de estas especies carecen de algunas de las enzimas de la ruta del ácido mevalónico, sobre todo, de las últimas (PMK y MPD). En el trabajo de Grochowski et al. 2006 en el que se identificó, a partir de *Methanocaldococcus jannaschii*, una enzima capaz de fosforilar al isopentenil monofosfato (IP) para convertirlo en IPP, se propuso la existencia de una ruta alternativa. En esta ruta alternativa, el 5'-fosfomevalonato (MVP) sería descarboxilado por una enzima PMVD (MVP descarboxilasa) para ser luego fosforilado a IPP por la isopentenil fosfato quinasa (IPK). Si bien la enzima IPK ya ha sido caracterizada a nivel tanto estructural como bioquímico, la enzima PMVD no ha sido aun totalmente caracterizada. Sin embargo, según estudios recientes llevados a cabo por la tesis doctoral de Vannice 2014, en la cual confirman la existencia de una fosfomevalonato descarboxilasa novedosa en *Haloferax volcanii*, apoyan la hipótesis de la existencia de esta ruta alternativa (Grochowski et al. 2006; W. Chang et al. 2013; Pérez-Gil & Rodríguez-Concepción 2013; Vannice 2014). En la figura 3, se muestra un esquema simplificado que involucra las vías clásicas y alternativas.

Fue demostrado en el trabajo de Erb et al. 2012 la existencia de una ruta alternativa a la ruta de MEP. En este trabajo se demostró, que *Rhodospirillum rubrum* (una proteobacteria fotosintética) puede producir DXP a partir de 5-metiltioadenosina (MTA), un subproducto de la biosíntesis de poliaminas que se origina a partir de S-adenosilmetionina (SAM). El MTA es cortado y luego fosforilado para producir 5-metiltio-D-ribosa 1-fosfato (MTR-1P) por la MTA-fosforilasa (Rru_A0361), que luego es convertido a 5-metiltio-D-ribulosa 1-fosfato (MTRu-1P) por la MTR-1P isomerasa (Rru_A0360). Posteriormente una novedosa enzima de tipo Rubisco (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa – RLP-) isomeriza MTRu-1P a 1-metiltio-D-xilulosa 5-fosfato (MTXP) que es luego convertido a DXP, mediante la pérdida reductiva de metanetiol por la MTXP metilsulfurilasa. El metanetiol puede ser luego utilizado como fuente de azufre para la síntesis de metionina (Erb et al. 2012; Pérez-Gil & Rodríguez-Concepción 2013; W. Chang et al. 2013).

En la figura 3, se esquematizan dichas rutas alternativas y su aporte a la biosíntesis de isoprenoides.

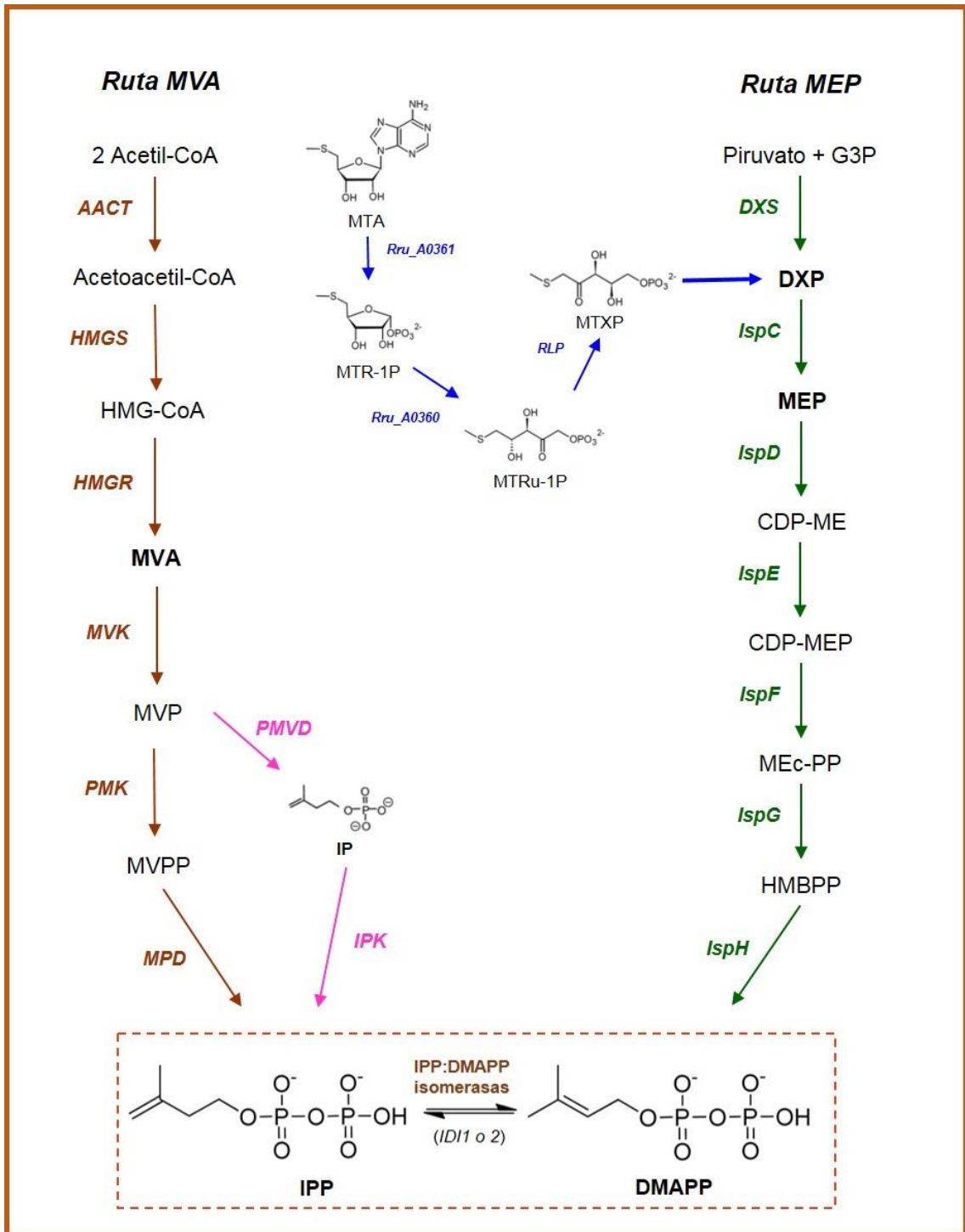


Figura 3. Rutas alternativas de síntesis de IPP y DMAPP, adaptado de Pérez-Gil & Rodríguez-Concepción, 2013.

Ruta alternativa en levaduras

En el trabajo realizado por Carrau et al. 2005, en el cual detectaron la presencia de monoterpenos en niveles del umbral de la percepción humana, en un medio sintético y sin precursores vegetales, se propuso la posibilidad de síntesis de monoterpenos *de novo* en levaduras mediante la utilización de una ruta alternativa. Esta ruta alternativa se interconectaría con una ruta catabólica de Leucina, desviando unidades de isopreno de la ruta de síntesis de colesterol, para dar lugar a la formación de monoterpenos.

La posible interconexión entre la ruta de síntesis de isoprenoides, y una ruta catabólica de la leucina, ya fue propuesta por Rodríguez et al. 2004 para *Aspergillus nidulans*, en la que, unidades de IPP provenientes de la ruta MVA serían convertidas a acetyl-CoA y acetato mediante la participación de las enzimas de la ruta catabólica de la leucina. La enzima mitocondrial 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC), sería de especial importancia en la interconexión de estas dos rutas, ya que actuaría como pivote entre las mismas. En el trabajo de Rodríguez et al. 2004 se demostró, que mutantes para la enzima MCC en cultivo con ácido 3-hidroxi-3-metilglutámico (precursor de la ruta MVA) como fuente de carbono acumulan altas concentraciones de ácido 3-hidroxi-3-metilglutámico (3-HIVA). Éste último surge de la hidratación del intermediario de la ruta catabólica de la leucina, 3-metilcrotonil-CoA, lo que afirma la idea propuesta de la existencia de una interconexión entre dichas rutas, tal como se mencionó anteriormente. Según estos autores, otro posible punto de interconexión de las rutas es a nivel de los isoprenoides lineales, tal como ha sido descrito para *Pseudomonas citronellois* y plantas, donde mediante una serie de reacciones se llega a la formación de 3-metilcrotonil-CoA (Rodríguez et al. 2004; Guan et al. 1999).

Si bien aún no ha sido demostrada experimentalmente la ruta catabólica de la leucina en *Saccharomyces*, en el trabajo de Carrau et al. 2005 se observó mediante análisis de blast que existe gran homología entre varias proteínas de *Saccharomyces* y MCCs conocidas. Por otra parte, también buscaron homología con geranyl difosfato sintasas (ubicadas habitualmente en plástidos de plantas) productoras de geranyl difosfato, precursor de monoterpenos, encontrando un alto nivel de homología entre la GPP sintasa de *Arabidopsis* con una proteína mitocondrial de levaduras, la hexaprenil pirofosfato sintasa, Coq1p. La única función conocida para esta enzima es la catálisis del primer paso en la biosíntesis de ubiquinona (coenzima Q), en levaduras. Debido a estos hallazgos fue propuesto en el trabajo de Carrau et al. 2005, la existencia de una posible ruta alternativa que conectaría la ruta MVA citosólica de biosíntesis de isoprenoides con la ruta metabólica de la leucina en la mitocondria desviando unidades isoprenoides que podrían ser utilizadas para la biosíntesis de monoterpenos. La

formación de estos últimos estaría favorecida en condiciones de microaerobiosis y altas concentraciones de nitrógeno asimilable (YAN⁴) (Carrau et al. 2005). En la figura 4 se presenta dicha ruta propuesta.

La proteína Coq1p es una hexaprenil pirofosfato sintetasa involucrada en la síntesis de la ubiquinona o coenzima Q. En levaduras existen 8 genes COQ involucrados en la síntesis de la ubiquinona. La eliminación o mutación de cualquiera de estos genes da como resultado la pérdida de la capacidad de sintetizar ubiquinona, así como la pérdida de la capacidad de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables.

Se ha demostrado, en el trabajo de Gin & Clarke 2005, que Coq1p se encuentra localizada en la periferia de la membrana mitocondrial interna, de cara a la matriz mitocondrial. Si bien, la única función de Coq1p plenamente identificada es la catálisis del primer paso en la síntesis de ubiquinona, existen pruebas que sugieren un importante rol en la regulación del flujo de precursores de las rutas de síntesis de isoprenoides (Gin & Clarke 2005; Carrau et al. 2005; Huang et al. 2013).

⁴ YAN, refiere a la concentración total de nitrógeno presente, que puede ser asimilable por la levadura, esto incluye: amonio (el cual es consumido preferentemente) y amino ácidos libres, ya que *Saccharomyces* no tiene la capacidad de hidrolizar proteínas, como las proporcionadas por la uva en los mostos, adecuadamente (Buglass 2011).

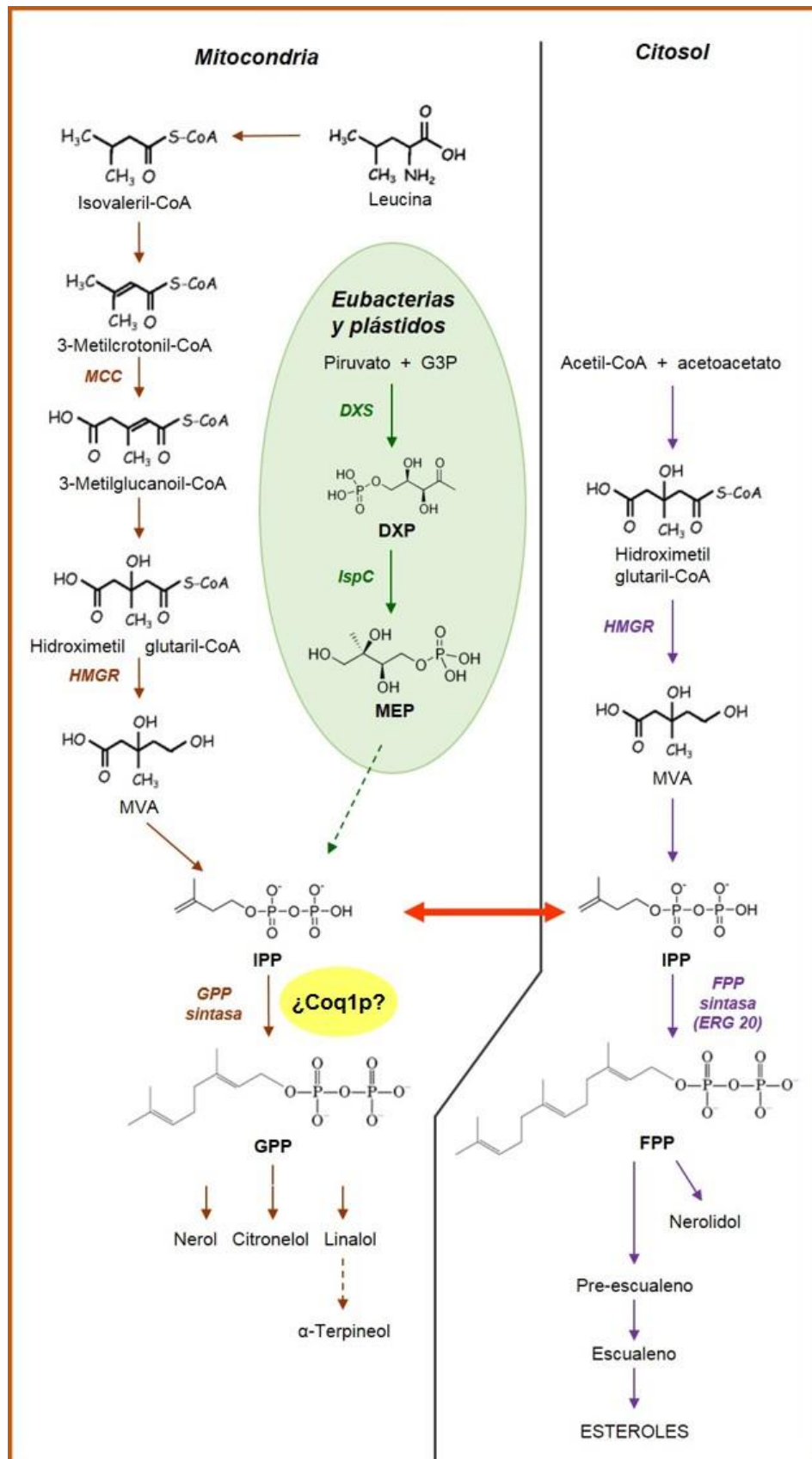


Figura 4. Posible ruta alternativa para la síntesis de isoprenoides en levaduras. La proteína Coq1p, interconectaría la ruta de síntesis de isoprenoides con una ruta catabólica de la leucina situada en la mitocondria, pudiendo actuar como una sintasa de monoterpenos, adaptado de Carrau et al. 2005.

1.3 Ingeniería de rutas metabólicas para la producción de isoprenoides

Debido a la complejidad de la síntesis química de los isoprenoides y los bajos rendimientos en la obtención de los mismos a partir de sus fuentes naturales, las plantas, surge el interés en el desarrollo de otras estrategias que permitan obtener altos niveles de producción y que resulten a su vez, más económicas, tal es el caso de la de ingeniería metabólica. La ingeniería de rutas metabólicas ha tenido un rol muy importante en el reciente interés por los isoprenoides como combustibles alternativos, ya que, ha brindado la posibilidad de obtener niveles de producción próximos a la escala industrial. Tal es el caso de la empresa Total-Amyris, la cual se encuentra desarrollando un combustible para aviones utilizando farnesano, producido por *S. cerevisiae* modificada genéticamente, llevándose a cabo exitosamente el primer vuelo de prueba (<https://amyris.com/>; Lee et al. 2015).

El objetivo de la ingeniería de rutas metabólicas es el de modificar los flujos de compuestos claves en rutas metabólicas, para lograr aumentar los niveles de producción del compuesto de interés. La ingeniería metabólica abarca, desde técnicas que mejoran o aumentan la producción de un metabolito propio del organismo, a técnicas que abarcan la incorporación de nuevas rutas metabólicas o enzimas en organismos heterólogos (Nevoigt 2008).

Existen variadas formas de regular el flujo metabólico mediante ingeniería genética, siendo las más utilizadas (Jones et al. 2015):

1. Modular el número de copias de ADN, mediante la sobreexpresión del gen de interés en plásmidos, o mediante integración en el cromosoma.
2. Modulación a nivel transcripcional, mediante modificación del promotor del gen de interés.
3. Modulación a nivel de la traducción, mediante la modificación de codones.

Los microorganismos en los que se ha llevado a cabo, por excelencia, el mayor número de investigaciones en lo que refiere a modificaciones genéticas para aumentar los niveles de producción de isoprenoides, son *Escherichia coli* y *Sacharomyces cerevisiae*. La mayoría de las estrategias consisten en la sobreexpresión de enzimas que determinan pasos limitantes en las rutas metabólicas. Alguno de estos ejemplos son la expresión heteróloga de las enzimas DXS e IspC de *Bacillus subtilis* en *E. coli*, duplicando la producción de isoprenoides (Zhao et al. 2011); la expresión heteróloga de IPP isomerasas también en *E. coli* (Kajiwara et al. 1997). Otra estrategia es la expresión

de una ruta metabólica de isoprenoides no nativa del microorganismo, lo que permite sobrellevar las limitaciones en la regulación. Por ejemplo, la expresión de las enzimas de la ruta mevalónica de *Saccharomyces cerevisiae* en *E. coli* ha permitido alcanzar mayores niveles de producción de isoprenoides, que cuando se modifica genéticamente la ruta MEP nativa (Ruffing 2013).

En cuanto a las estrategias de ingeniería genética en levaduras, gran parte de estas han estado enfocadas a la expresión de sintasas de terpenos de plantas en levaduras. En el trabajo de Herrero et al 2008 se alcanzaron niveles que superan el umbral de la percepción humana de linalol (77 µg/L), mediante la expresión de una linalol sintasa de la planta *Clarkia breweri*. Del mismo modo, en el trabajo de Ignea et al. 2011 se alcanzaron niveles de producción de monoterpenos del orden de g/L, mediante la incorporación de dos sintasas de terpenos provenientes de *Salvia fruticosa* o *Salvia pomífera*. En cuanto a la producción de sesquiterpenos, también se ha alcanzado el orden de g/L de bisaboleno, el cual tiene potencial valor como diésel *D2* dadas sus propiedades fisicoquímicas, mediante la incorporación de una bisaboleno sintasa de *Abies grandis* (Peralta-Yahya et al. 2011). También es posible obtener altos niveles de monoterpenos, mediante la modificación de enzimas claves en la ruta mevalónica endógena propiamente dicha. En el trabajo de Rico et al. 2010 se logró aumentar seis veces los niveles de producción de linalol, mediante la sobreexpresión del gen que codifica para el sitio catalítico de la isoenzima HMG-CoA reductasa 1, enzima limitante de la ruta MVA, en cepas de *S. cerevisiae* que expresan el gen *LIS*, que codifica para una linalol sintasa vegetal.

En lo que refiere a la modificación de enzimas claves en la ruta mevalónica endógena, es de gran importancia para este trabajo de Maestría, el trabajo realizado por Fischer et al. 2011 en el cual se propone que, al mutar la FPPS de levaduras, parte del GPP que se forma como intermediario en la síntesis de FPP quedaría disponible para la formación de monoterpenos. Las estrategias de ingeniería genética llevadas a cabo por este grupo, se detallan a continuación.

Modificación de la enzima FPPS en levaduras

La enzima FPPS es esencial para la supervivencia en levaduras, y cataliza dos reacciones consecutivas de condensación entre IPP y DMAPP para dar lugar a la formación de GPP, el cual permanece anclado en el sitio catalítico, hasta la adición de otra molécula de IPP para dar lugar a la síntesis de FPP, el cual es liberado del sitio catalítico. En el trabajo de Fischer et al, 2011, basados en trabajos anteriores (Chambon et al. 1990; Blanchard & Karst 1993), observaron que la sola modificación de un

aminoácido específico del sitio catalítico lograba disminuir la actividad específica FPPS. Dicha modificación corresponde, a una mutación puntual en el gen *ERG20*, que tiene como resultado el cambio de una lisina en la posición 197 del sitio catalítico por un ácido glutámico K197→E. El mutante resultante tiene varias propiedades fisiológicas destacables, tales como la excreción de los monoterpenos geraniol y linalol.

Con el objetivo de probar la liberación de GPP de la FPPS y su posterior conversión a geraniol, en el trabajo de Fischer et al., 2011 crearon un modelo para la estructura de la FPPS de levaduras. Éste tomó como referencia la estructura cristalográfica de la FPPS aviar, realizando a su vez numerosos alineamientos de secuencia de FPPS y GGPPS de una amplia variedad de organismos. Estos alineamientos revelaron la existencia de dos motivos ricos en asparragina, el primero con motivos DDXXD o DDXXXXD al que se le llamó FARM (del inglés: first Asp-rich motif) el cual se une a los sustratos alílicos DMAPP, GPP o FPP, y estaría vinculado a la función de determinar el largo de la cadena de sus sustratos; el segundo motivo DDXXD llamado SARM (del inglés: second Asp-rich motif) se une al IPP. Estas dos subunidades se conectarían a través de un eje formado por dos hélices antiparalelas, formando una cavidad rodeada a su vez, por 10 estructuras en hélice, figura 5.

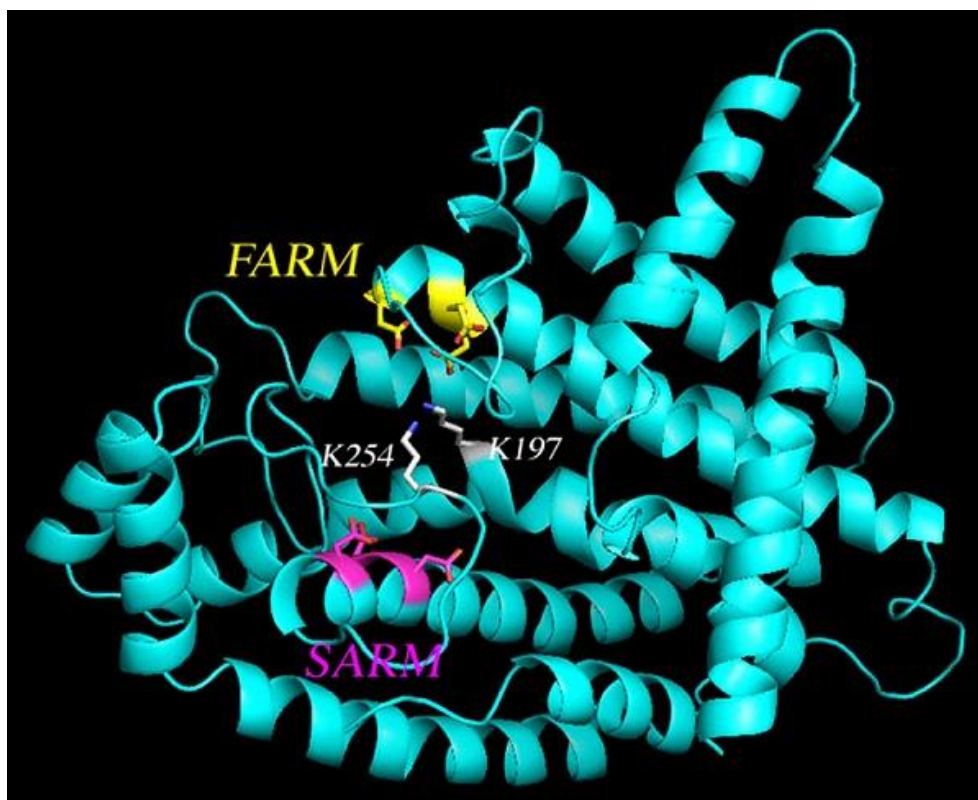


Figura 5. Sitio catalítico de FPPS, con las regiones FARM y SARM en amarillo y rosado respectivamente. Extraído de Fischer et al., 2011.

Los residuos de Asp están involucrados en la condensación de IPP a los sustratos alílicos, mediante la coordinación de 3 iones Mg^{2+} , en el sitio catalítico. En el modelo propuesto por Fischer et al., 2011 probaron, que K197 se encuentra en el centro del sitio catalítico rodeado por los motivos FARM y SARM participando en la coordinación de los iones Mg^{2+} . Al ser sustituido el residuo K197 por un ácido glutámico se vería afectada la reacción de catálisis, ya que el grupo ϵ -amino de la lisina activaría el grupo difosfato saliente, así como también estaría involucrada en la estabilización de los carbocationes intermediarios y desprotonación del C2 de IPP. A su vez, en el modelo de Fischer et al., 2011 se mostró, que el ácido glutámico provocaría que el bolsillo catalítico sea más profundo, ésto disminuiría la actividad FPPS del mutante K197E.

Capítulo 2

Objetivos



2.1 Objetivo general

Modificar genéticamente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar la producción de compuestos de origen isoprenoide con propiedades biocombustibles.

2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar los niveles de compuestos isoprenoides obtenidos al sobreexpresar Coq1p clonado en plásmidos donde el gen *COQ1* está bajo el control de diferentes promotores.
- II. Determinar los niveles de compuestos isoprenoides obtenidos al sobreexpresar *COQ1* a partir de una construcción estable en el cromosoma de *S. cerevisiae*.
- III. Determinar los niveles de compuestos isoprenoides obtenidos al sobreexpresar Coq1p clonado en plásmidos de alto número de copias, bajo el control de un promotor fuerte, en los distintos contextos genéticos, BY4743, K197K y K197E.
- IV. Determinar los niveles de alcoholes superiores obtenidos al variar el contenido de YAN para aquellas cepas que hayan tenido mejor rendimiento en la producción de isoprenoides.

Capítulo 3

Materiales y Métodos



3.1 Cepas y plásmidos de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.1 Cepas utilizadas y sus genotipos

Las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo, se detallan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

	Genotipo	Referencias
BY4743	<i>Mat a/α; his3Δ0/ his3Δ0; leu2Δ0/ leu2Δ0; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ ura3Δ0</i>	UCDavis
BY4741	<i>Mat a; his3Δ1, leu2Δ0, LYS2, met15Δ0, ura3Δ0</i>	UCDavis
BY4742	<i>Mat α; his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0</i>	UCDavis
33138	mutante homocigota de BY4743 en el gen <i>COQ1</i>	Saccharomyces Genome Deletion Project
K197K	<i>Mat α, his3Δ, leu2Δ0, ura3-, trp1Δ63, YJL167W::kanMX4 [pLB41_K197K]</i>	(Fischer et al. 2011)
K197E	<i>Mat α, his3Δ, leu2Δ0, ura3-, trp1Δ63, YJL167W::kanMX4 [pLB41_K197E]</i>	(Fischer et al. 2011)
K197G	<i>Mat α, his3Δ, leu2Δ0, ura3-, trp1Δ63, YJL167W::kanMX4 [pLB41_K197G]</i>	(Fischer et al. 2011)

Las cepas K197K, K197E y K197G son cepas construidas a partir de BY4743 en el trabajo de Fischer et al. 2011. En el mencionado trabajo, se construyeron las cepas haploides K197K, K197E y K197G con genotipos *Mat α, his3Δ, leu2Δ0, ura3-, trp1Δ63, YJL167W::kanMX4 [pLB41_K197K]* o *[pLB41_K197E]* o *[pLB41_K197G]*, las cuales tienen “deletado” el gen *ERG20* en su genoma pero acarrean en el plásmido pLB41 el ORF de FPPS con una mutación puntual en K197 por una E, en el caso de K197E, una G en el caso de K197G, o la sustitución de K197 por otra K en la cepa control K197K.

3.1.2 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados para la sobreexpresión de *COQ1* en las diferentes cepas utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos con el gen *COQ1* clonado bajo el control de diferentes promotores.

	Características	Referencias
<i>pADCL</i>	Tamaño: aproximadamente 8 Kb Vector multi-copia Promotor de expresión constitutivo: <i>ADH1</i> Marcadores: <i>LEU2</i> , ampR Replicon: 2 micrones MCS: HindIII...SfiI Tag (HA), hemaglutinina del virus de influenza	(Gin & Clarke 2005; Spain et al. 1995)
<i>pHA1-1</i>	Vector <i>pADCL</i> , con el gen <i>COQ1</i> expresado bajo control del promotor <i>ADH1</i> .	(Gin & Clarke 2005)
<i>pRS316</i>	Deriva de <i>pBLUESCRIPT</i> y <i>pBLUESCRIBE</i> Tamaño: aproximadamente 3 Kb Marcadores: <i>URA3</i> , ampR Plásmido replicativo mitótico: cassette <i>CEN/ARS</i> de 518 pb (Secuencia centromérica de levaduras y secuencia de replicación autónoma, respectivamente)	(Sikorski & Hieter 1989; Gin & Clarke 2005)
<i>pRSQ1-1</i>	Vector <i>pRS316</i> , con el gen <i>COQ1</i> expresado bajo control de su promotor propio.	(Gin & Clarke 2005)

En la tabla 5, se detallan los plásmidos del Toolbox kit (Janke et al. 2004), utilizados para la modificación en el cromosoma de *S. cerevisiae*.

Tabla 5. Plásmidos utilizados para la modificación en el cromosoma (Janke et al. 2004).

	Características	Referencias
<i>pYM-N1</i>	Tamaño: 4424 pb Marcadores: KanMX, ampR Promotor: <i>CUP1-1</i>	Euroscarf (Anexo I)
<i>pYM-N14</i>	Tamaño: 4621 pb Marcadores: KanMX, ampR Promotor: <i>GPD</i>	Euroscarf (Anexo I)
<i>pYM-N18</i>	Tamaño: 4375 pb Marcadores: KanMX, ampR Promotor: <i>TEF</i>	Euroscarf (Anexo I)

3.1.3 Cepas construidas

En la tabla 6, se presentan las cepas construidas en el desarrollo de este trabajo ya sea mediante la transformación con los distintos plásmidos de la tabla 4, o modificadas en el cromosoma.

Tabla 6. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas.

	Descripción
<i>BYpADCL</i> (*)	<i>BY4743</i> transformada con el plásmido <i>pADCL</i>
<i>BYpHA1-1</i> (*)	<i>BY4743</i> transformada con el plásmido <i>pHA1-1</i>
<i>BYpRS316</i> (*)	<i>BY4743</i> transformada con el plásmido <i>pRS316</i>
<i>BYpRSQ1-1</i> (*)	<i>BY4743</i> transformada con el plásmido <i>pRSQ1-1</i>
<i>KKpADCL</i>	<i>K197K</i> transformada con el plásmido <i>pADCL</i>
<i>KKpHA1-1</i>	<i>K197K</i> transformada con el plásmido <i>pHA1-1</i>
<i>KEpADCL</i>	<i>K197E</i> transformada con el plásmido <i>pADCL</i>
<i>KEpHA1-1</i>	<i>K197E</i> transformada con el plásmido <i>pHA1-1</i>
<i>33138pHA1-1</i>	<i>33131</i> transformada con el plásmido <i>pHA1-1</i>
<i>BY_CUP1-1</i>	<i>BY4743</i> con cambio del promotor propio de <i>COQ1</i> por el promotor fuerte, inducible por Cu^{2+} , en las dos copias del cromosoma.
<i>BY_GPD</i>	<i>BY4743</i> con cambio del promotor propio de <i>COQ1</i> por el promotor constitutivo <i>GPD</i> , en las dos copias del cromosoma.
<i>BY_TEF</i>	<i>BY4743</i> con cambio del promotor propio de <i>COQ1</i> por el promotor constitutivo <i>TEF</i> , en las dos copias del cromosoma.

(*) Cepas transformadas en el marco de la tesis de maestría de Barquet 2012, del departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

3.2 Medios de cultivo.

3.2.1 Medios de cultivos generales

YPD

El medio YPD, es un medio rico, que facilita el rápido crecimiento de las levaduras. El mismo contiene: extracto de levadura (10 g/L), peptona bacteriológica (20 g/L), glucosa (20 g/L), agar (20 g/L).

Símil Mosto (YAN 206 mg/L)

El medio símil mosto es un medio sintético que simula el mosto de uva, pero sin la presencia de precursores vegetales. El mismo consta de: glucosa (60 g/L), fructosa (60 g/L), KH_2PO_4 (1.14 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.23 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.44 g/L), tartrato ácido de potasio (2.5 g/L), ácido L-málico (3 g/L), ácido cítrico (0.2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (400 mg/L), 1 mL cada 100 mL de medio de una solución stock 100X de vitaminas esterilizada por filtración, 1 mL cada 100 mL de medio de una solución stock 100X de aminoácidos esterilizada por filtración, 1 mL cada 1000 mL de medio de una solución stock 1000X de

microelementos esterilizada por filtración y ergosterol (12.5 mg/L) disuelto previamente en una solución de 1 volumen de etanol 95% y un volumen de Nonidet, incubándose a 70 °C con agitación esporádica en un agitador de tubos tipo vórtex.

La concentración final de vitaminas en el medio símil mosto es: myo-inositol (100 mg/L), piridoxina.HCl (2 mg/L), ácido nicotínico (2 mg/L), pantotenato de calcio (1 mg/L), tiamina.HCl (0.5 mg/L), ácido paraaminobenzóico (PABA-K, 0.2 mg/L), riboflavina (0.2 mg/L), biotina (0.125 mg/L) y ácido fólico (0.2 mg/L).

La concentración final de microelementos en el medio símil mosto es: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (200 $\mu g/L$), $ZnCl_2$ (135 $\mu g/L$), $FeCl_2$ (30 $\mu g/L$), $CuCl_2$ (15 $\mu g/L$), H_3BO_3 (5 $\mu g/L$), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (30 $\mu g/L$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (25 $\mu g/L$) y KIO_3 (10 $\mu g/L$).

La concentración final de aminoácidos en el medio símil mosto es: Ala (5.9 mg/L), Arg (137.3 mg/L), ASN (36.5 mg/L), ASP (23.1 mg/L), Gln (48.7 mg/L), Glu (30.8 mg/L), Gly (4.1 mg/L), His (45.8 mg/L), Ile (24.1 mg/L), Lys (61.5 mg/L), Met (20 mg/L), Phe (11.6 mg/L), Ser (48.2 mg/L), Thr (42.2 mg/L), Trp (12.1 mg/L), Tyr (2.4 mg/L) y Val (24.1 mg/L). Para todos los desarrollos de inóculo, así como para los experimentos del ítem 4.1, se mantuvo la presión de selección, para cada plásmido mediante la omisión del agregado del aminoácido de selección, leucina o uracilo. Se agregaron Leu o Ura (según el medio de selección correspondiente -Leu/-Ura) o ambos (para el medio con todos los aminoácidos) en una concentración final de 20 mg/L.

El medio símil mosto se lleva a pH 3.5 mediante el agregado de NaOH 2M y se esteriliza posteriormente por filtración.

Símil Mosto (YAN 75 mg/L)

El medio Símil Mosto con 75 mg/L de YAN, consta de los mismos compuestos que el medio Símil Mosto con YAN 206 mg/L y en las mismas concentraciones, excepto para los aminoácidos y $(NH_4)_2HPO_4$ el cual se omite, ya que los requerimientos de nitrógeno se cubren con la solución aminoacídica. En este caso se utilizó una solución stock (20 X) de aminoácidos modificada (con menor concentración de aminoácidos, con el agregado de prolina y sin metionina). La concentración final de aminoácidos en el símil mosto YAN 75 mg/L es: Ala (2.95 mg/L), Arg (68.65 mg/L), ASN (18.25 mg/L), ASP (11.55 mg/L), Gln (24.35 mg/L), Glu (15.4 mg/L), Gly (2.05 mg/L), Ile (12.05 mg/L), Lys (30.75 mg/L), Phe (5.8 mg/L), Ser (24.1 mg/L), Thr (21.1 mg/L), Trp (6.05 mg/L), Tyr (1.2 mg/L), Val (24.1 mg/L), His (50 mg/L), Ura (25 mg/L) y Pro (30.15 mg/L).

Medio YNB

El medio está compuesto por YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma) sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1.7 g/L (se prepara una solución stock 10X y se esteriliza por filtración), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g/L), glucosa (10 g/L) y 1 mL cada 100 mL de medio de una solución stock de aminoácidos concentrada 100X con los siguientes aminoácidos en concentraciones finales de: His (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Leu (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Ura (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fischer et al. 2011). También se utilizó, a modo de estudiar el efecto de éstos aminoácidos en la producción de isoprenoides, un medio YNB modificado, el cual contiene los aminoácidos His, Leu y Ura en las siguientes concentraciones finales: 125, 500 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Pronk 2002).

3.2.2 Medios de cultivos selectivos

Medio Mínimo –Leu/-Ura

El medio mínimo se ha utilizado como medio de selección de la levadura de interés, mediante la ausencia del aminoácido de selección. El medio contiene: YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma) sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1.7 g/L (se prepara una solución stock 10X y se esteriliza por filtración), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g/L), glucosa (30 g/L), agar (15 g/L), 1 mL cada 100 mL de medio de una solución stock 100X esterilizada por filtración conteniendo los aminoácidos histidina, metionina, triptófano y lisina. La concentración final en el medio de éstos aminoácidos fue de: His (20 mg/L), Met (20 mg/L), Trp (50 mg/L) y Lys (50 mg/L). Al medio se le agregó leucina o uracilo, dependiendo de la cepa a seleccionar en concentraciones finales de 100 mg/L y 20 mg/L respectivamente.

YPD-G418

El medio YPD-G418, consta del medio YPD descrito en el ítem anterior, con el agregado de 200 mg/L del antibiótico geneticina (G418). El antibiótico es agregado cuando el medio se encuentra aún en estado líquido, pero a temperatura moderada (que se pueda tolerar al tacto).

Medio mínimo SC con glicerol como única fuente de carbono

El medio contiene: YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma) sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 1.7 g/L (se prepara una solución stock 10X y se esteriliza por filtración), 1 mL de un Drop out (10X) de amino ácidos cada 10 mL de medio; Glicerol (20 g/L) y agar (15 g/L).

La concentración final de aminoácidos del medio por el agregado del Drop out es la siguiente: Adenina (40 mg/L), His (20 mg/L), Leu (100 mg/L), Met (20 mg/L), Trp (50

mg/L), Ura (20 mg/L), Lys (50 mg/L), Arg (50 mg/L), Asp (80 mg/L), Ile (50 mg/L), Phe (50 mg/L), Thr (100 mg/L), Tyr (50 mg/L) y Val (140 mg/L).

Medio mínimo SC de selección –Lys o –Met-Lys

El medio mínimo de selección se prepara de la misma forma que el medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, excepto que en vez de glicerol, se utilizó glucosa (20 g/L). También se utilizó esta vez un Drop out de amino ácidos con todos los amino ácidos anteriores, excepto lisina y metionina. Para la preparación del medio mínimo –Lys, se agregó metionina 1X, a partir de una solución madre 40X, previamente esterilizada por filtración.

Medio de esporulación RICH-SPO:

El medio Rich-Spo, es un medio mínimo, de baja concentración de nitrógeno, que promueve la esporulación en levaduras. El mismo contiene: extracto de levadura (2.5 g/L), KOAc (15 g/L), glucosa (0.5 g/L) y 1 mL del mismo Drop out (10X) de amino ácidos utilizado anteriormente, cada 10 mL de medio.

3.3 Preparación de preinóculos y sus condiciones de cultivo.

Para cada desarrollo de inóculo se partió de cultivos stock guardados a -80 °C en glicerol al 20%. Se sembró una ansada de cada cultivo en un medio rico YPD, y se incubó a 25 °C durante 24 horas. Posteriormente, en el caso de las cepas transformadas con los diferentes plásmidos, se repicó una colonia de cada placa de YPD en un medio mínimo sin leucina o sin uracilo, y se incubó a 25 °C durante 48 horas. En el caso de las cepas modificadas en el cromosoma, estas fueron sembradas en un medio YPD-G418 directamente a partir de los cultivos stock.

Se sembraron colonias aisladas, en matraces de 125 mL con 30 mL de medio Símil Mosto (-Leu o –Ura en el caso de las cepas transformadas con los plásmidos y con todos los aminoácidos en el caso de las cepas modificadas en el cromosoma) y tapón de algodón. Cada preinóculo se realizó por duplicado, a partir de colonias aisladas diferentes (duplicado biológico). Los preinóculos se incubaron durante 24 horas a 25 °C o a 20°C (únicamente para los ensayos de alcoholes superiores), en un agitador orbital WIS-30R Daihan a 150 rpm.

Para el desarrollo de inóculo de aquellas cepas utilizadas para los ensayos de Western Blot, se utilizaron preinóculos de 10 mL en matraces de 50 mL.

3.4 Ensayos de producción de los compuestos de interés y sus condiciones de cultivo.

3.4.1 Ensayos de producción de isoprenoides

Los ensayos fueron llevados a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 120 mL de medio Símil Mosto con YAN de 206 mg/L y sin el aminoácido de selección (Leu o Ura) para los experimentos presentados en el ítem 4.1, o con todos los aminoácidos para los demás casos. Se usaron tapones de algodón y se incubaron los matraces a 25 °C y agitación orbital de 150 rpm. Los ensayos se iniciaron mediante el agregado de un volumen adecuado de preinóculo tal que el número inicial de células fuese 1×10^5 cél/mL. A las 48, 72 y 96 horas se llevó a cabo el procesamiento de duplicados biológicos para cada cepa mediante la eliminación de las células por centrifugación durante 10 minutos a 5000 rpm, en una centrífuga Sorvall RC5. Se guardó el sobrenadante tras el agregado de 400 µL de una solución de 15 g/L de metabisulfito de potasio en heladera a 4 °C hasta la extracción y análisis de isoprenoides. Se llevó a cabo el control de crecimiento del cultivo y su viabilidad mediante recuento en cámara de Neubauer cada 24 horas, y plaqueo en medio YPD respectivamente.

Para el caso de los experimentos realizados con la cepa BY_CUP1-1, cuyos resultados se presentan en el ítem 4.2, se llevó a cabo la inducción con cobre a concentraciones finales de 0 y 100 µM de CuSO_4 . Para ello se agregó a los matraces que serían inducidos con cobre 100 µM, 120 µL de una solución stock de CuSO_4 100 mM, al comienzo de la fermentación.

En el caso de los cultivos utilizados para los ensayos de Western Blot, se trabajó con volúmenes más pequeños de 60 mL de medio en matraces de 125 mL.

En la figura 6, se muestra un esquema general de trabajo, desde la selección de las colonias aisladas para el desarrollo de inóculo, hasta el procesamiento de los duplicados biológicos a diferentes tiempos, para la extracción de los isoprenoides.

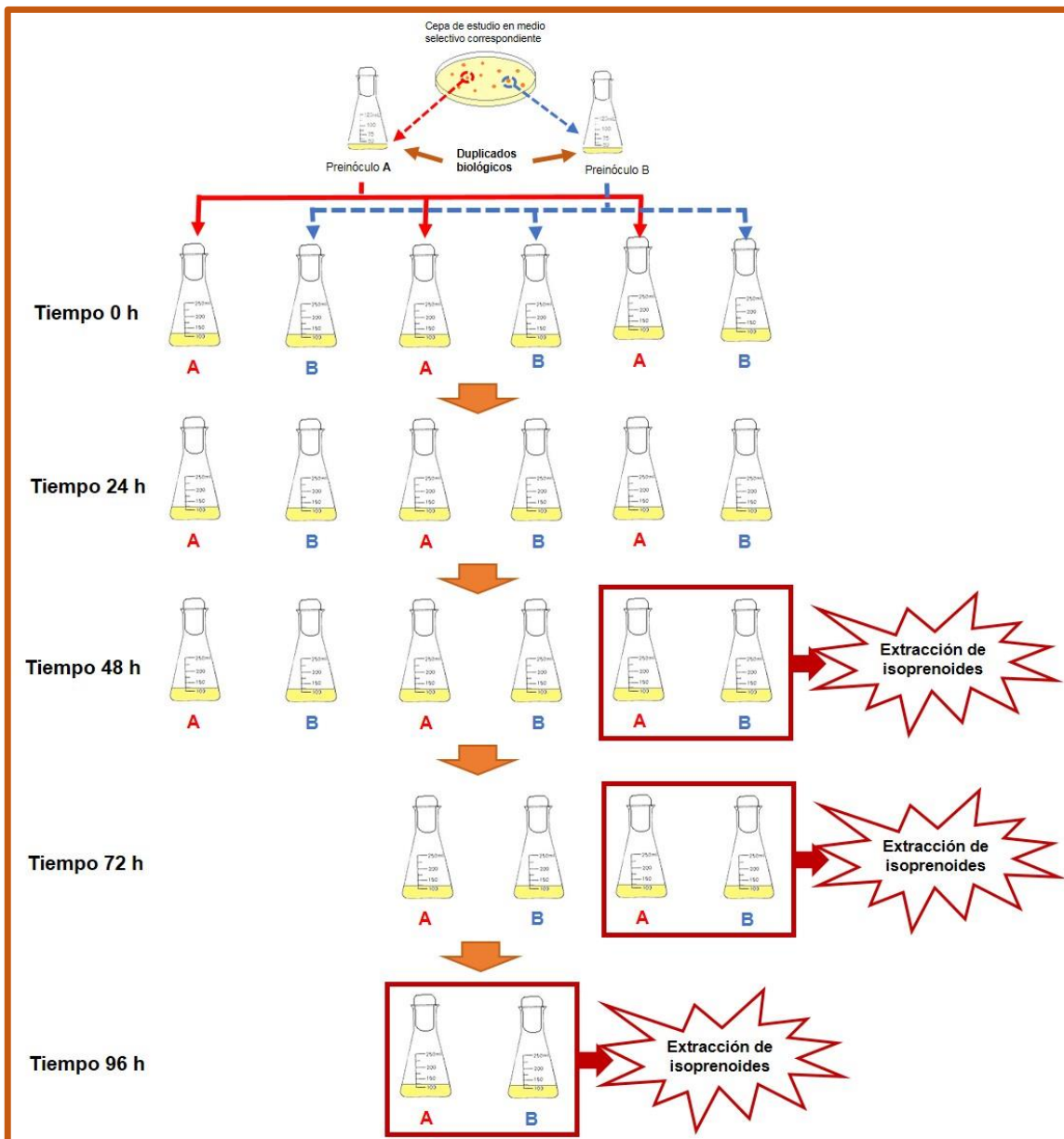


Figura 6. Esquema de trabajo para una cepa dada de las actividades de preinóculo y cultivo en condiciones de producción de isoprenoides.

3.4.2 Ensayo de producción de alcoholes

Los ensayos de producción de alcoholes fueron realizados del mismo modo que en el ítem anterior con las siguientes modificaciones:

- Se utilizó para estos experimentos el medio Símil Mosto con YAN 75 mg/L.
- Los matraces se incubaron a 20 °C, sin agitación.
- En el transcurso de 24 hs de fermentación, los tapones de algodón fueron reemplazados por válvulas de Müller, con ácido sulfúrico. Este dispositivo, cumple el rol de retener las gotas de agua evaporadas durante la fermentación (Medina et al. 2008).

- Se siguió el avance de la fermentación mediante la pérdida en peso de dióxido de carbono. Se consideró finalizada la fermentación al llegar al peso constante de los matraces. Estas duraron aproximadamente 21-23 días.
- Las extracciones se realizaron al fin de fermentación para todos los ensayos, excepto para el ensayo con la cepa K197E, transformada con los plásmidos de alto número de copias, para la cual también se realizaron extracciones a mitad de la fermentación (aproximadamente 11 días).

3.5 Extracción y análisis de isoprenoides.

3.5.1 Extracción de isoprenoides en fase sólida

La extracción de isoprenoides se realizó mediante el pasaje del cultivo líquido (libre de células), por columnas de separación en fase sólida Isolute ENV+® (copolímero reticulado de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado, Biotage, Suecia). Previo a la extracción, las columnas fueron acondicionadas mediante el agregado de metanol y posteriormente agua miliQ. Se agregaron, a modo de estándar interno, 100 µL de una solución de octanol de 0.352 mg/mL (Sigma), a 50 mL del cultivo líquido libre de células, llevándose mediante el agregado de agua miliQ a 100 mL. Esta solución fue pasada a través de la columna utilizando un equipo manifold con bomba de vacío. Inmediatamente después, se lavó la columna mediante el pasaje de agua miliQ, para eliminar azúcares y demás compuestos hidrosolubles. La elución de los isoprenoides se llevó a cabo mediante el pasaje de 30 mL de CH₂Cl₂. Finalmente, se extrajeron las impurezas remanentes en la columna, mediante el pasaje de 30 mL de metanol.

Previo al análisis de los isoprenoides, las muestras fueron concentradas, en una primera instancia, a un volumen aproximado de 3 mL mediante la utilización de columnas Vigreux, y posteriormente, mediante el venteado con nitrógeno, la muestra fue concentrada a un volumen final de aproximadamente 200 µL.

3.5.2 Determinación y cuantificación de isoprenoides

El análisis de los isoprenoides fue realizado por el servicio de cromatografía de gases del IIBCE, a cargo del Lic. Manuel Minteguiaga y con colaboración de la Dra. Laura Fariña, dentro del marco del Proyecto FSE_1_2011_1_6068, titulado: “Ingeniería metabólica para la producción de biocombustibles isoprenoides”. Para esto se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) Shimadzu GCMS-QP2010 con inyección automática. La columna utilizada fue DB-Wax

(30m x 0.25mm x 0.25 μ m; J and W Columns-Agilent Technologies, USA), utilizando helio como gas carrier. Se inyectó 1 μ L de muestra, con una relación de "Split" de 1:25. La temperatura del inyector, interfaz y fuente de iones fue de 250 °C. El programa de temperaturas utilizado para el horno fue el siguiente: 40°C (8 min)-3°C/min-180°C (0 min)-5°C/min-220°C (20 min)-20°C/min-230°C (7min). La fuente de iones fue operada a 70 eV. La identificación de linalol, (E)-nerolidol y (E,E)-farnesol fue llevada a cabo mediante la comparación con espectros disponibles en librerías comerciales (NIST, Wiley), así como también se inyectaron estándares puros (Sigma-Aldrich) de cada compuesto como referencia. Los análisis de GC-MS fueron llevados a cabo en modos TIC (Total Ion Current) para la identificación de los compuestos y SIM (Single Ion Monitoring) para la cuantificación de los mismos.

3.6 Extracción y análisis de alcoholes superiores.

3.6.1 Extracción de alcoholes superiores

Dado que los alcoholes quedan en la mezcla de fermentación, es necesario destilarlos para su posterior análisis. Para ello se miden 50 mL de la muestra, se le agregan 100 μ L del estándar interno 3-pentanol (34.8 mg/L) y se pasan a un balón de 100 mL. Se arma el equipo de destilación con manta eléctrica y se destila hasta recoger un volumen de destilado de aproximadamente 33 mL. Una vez recogido el volumen necesario, se enrasa con agua miliQ a 50 mL en matraz aforado. De no ser inyectado en el momento, las muestras fueron guardadas en freezer a -20 °C.

3.6.1 Determinación y cuantificación de alcoholes superiores

El análisis de los alcoholes superiores fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Aromas en Facultad de Química, a cargo de los licenciados Manuel Minteguiaga y Andrés Barchi, dentro del marco del Proyecto FSE_1_2011_1_6068, mencionado anteriormente. Para estos análisis se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de la llama o detector FID (Flame Ionization Detector; Shimadzu 14B, Shimadzu Ltda, Japón). Se inyectó 1 μ L de muestra manteniéndose la temperatura del detector e inyector a 200 °C. El programa de temperaturas utilizado para el horno fue el siguiente: 35 °C (6.5 min.), subiendo 15 °C/min hasta los 60 °C y luego 2 °C/min hasta los 200 °C (10 min). Para la identificación de los componentes se realizó el análisis de la mezcla en el mismo programa de temperaturas anteriormente descrito en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS; Shimadzu QP2010, Shimadzu Ltda, Japón) comparando los espectros de masa

experimentales con los presentes en bases de datos comerciales (NIST, Wiley). La cuantificación de los componentes se realizó por comparación de áreas con el estándar interno inyectado.

3.7 Extracción líquido-líquido de isoprenoides con dodecano.

A modo de disminuir costos y maximizar la producción de isoprenoides, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con dodecano. Los isoprenoides, tienen mayor afinidad por la fase orgánica (dodecano), por lo que se concentran en esta fase (Newman et al. 2006; Davies et al. 2014). La extracción consistió en el agregado de una capa de 10 mL de dodecano, sobre un cultivo líquido de 120 mL de Símil Mosto. Se extrajeron muestras de 5 mL para análisis, reponiéndose otros 5 mL de dodecano nuevo a la capa, a los 6, 11 y 22 días.

3.8 Protocolo de transformación de levaduras.

Las levaduras modificadas a lo largo de este trabajo, se transformaron según el protocolo de Jason Brickner's y Gustavo Pesce's optimizado por P. Aguilar 2005, el cual se basa en la incubación con acetato de litio seguido de shock térmico. El mismo consta de los siguientes pasos:

1. Partir de 50 mL de cultivo en medio YPD, en fase exponencial.
2. Una vez alcanzada una densidad óptica entre 0.4 y 0.8, centrifugar 3 minutos a 3000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender con cuidado las células en 1 mL de 1x LITE, y transferirlas a tubos eppendorf de 1.5 mL, todo en condiciones de esterilidad.
4. Centrifugar 2 min a 3000 rpm, descartar sobrenadante y resuspender el pellet en un volumen tal, que el volumen final sea de 300 μ L.
5. Poner en 3 tubos eppendorf, 10 μ L de ADN de esperma de salmón.
6. Dividir los 300 μ L en los 3 tubos eppendorf que contienen el ADN de esperma de salmón (100 μ L en cada uno).
7. Agregar 10 μ L (0.25 μ g) de ADN transformante a cada tubo, excepto al control negativo, al cual no se le pone ADN.

8. Agregar 750 μ L de PEGLITE a cada uno.
9. Incubar en estufa a 30 °C durante 30 min, agitando por inversión a los 15 min.
10. Agregar 100 μ L de DMSO a cada uno
11. Centrifugar 2 min a 3000 rpm y descartar el sobrenadante.
12. Resuspender las células en 300 μ L de YPD e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
13. Sembrar en placas del medio selectivo correspondiente (Medio mínimo –Leu).

Soluciones:

- LITE (5X): 0.5 M de acetato de litio, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA.
- LITE (1X): 0.1 M de acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA.
- PEGLITE: 40 % PEG2000, 1X LITE (4 partes de PEG2000 al 50% y una parte de LITE 5x)

3.9 Determinación del porcentaje de pérdida de plásmido.

Para todos los ensayos en los que no hubo presión de selección, se llevó a cabo el control del porcentaje de pérdida de plásmido mediante el repique de 100 colonias viables, a un medio mínimo sin el correspondiente aminoácido de selección y posteriormente a un medio mínimo con todos los aminoácidos. Aquellas que crecieran en la segunda placa y no en la primera, se consideraron como colonias con pérdida del plásmido.

3.10 Reemplazo de promotores a nivel de cromosoma.

3.10.1 Cebadores utilizados

Los cebadores utilizados para llevar a cabo el reemplazo del promotor propio de *COQ1* en el cromosoma fueron diseñados en el marco de la maestría (Barquet 2012). Los mismos se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la modificación a nivel de cromosoma.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Función
<i>S1_Fw</i>	TTCTACAACACAAGAAGTGTGCCATTC AGTCCGAATTGAGTCAGTGGGACGAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC	Cebador largo, híbrido, diseñado para dirigir la sustitución en el cromosoma.
<i>S4_Rev</i>	GGCATCTTCGAGTGAAATCAATTTGAT GTGATGAGCAGCGCCAGACCTTTGAA ACATCGATGAATTCTCTGTCTCG	Cebador largo, híbrido, diseñado para dirigir la sustitución en el cromosoma.
<i>pYM-N1_CUP1_Fw</i>	GAAGCAAATAACTCCTTGTCTTG	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones. (Sikorski & Hieter 1989; Gin & Clarke 2005)
<i>pYM-N14_GPD_Fw</i>	GACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.
<i>pYM-N18_TEF_Fw</i>	TTCGATGACCTCCCATTGAT	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.
<i>Prom_COQ1_Fw</i>	GCATTTTGTGGCATCTTCG	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.
<i>Prom_COQ1_Rev</i>	CAGGAACATCCGACTTGCA	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.
<i>KanC_Fw</i>	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.
<i>KanB_Rev</i>	TGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Cebador utilizado para la verificación de las construcciones.

3.10.2 Protocolo para el reemplazo del promotor propio de *COQ1* a nivel del cromosoma

Con el propósito de tener una cepa BY4743 modificada en los dos alelos, se optó por realizar las actividades de modificación en el cromosoma con las cepas haploides BY4741 y BY4742, para luego mediante mating obtener la diploide BY4743 modificada.

El cambio del promotor propio de *COQ1* en *Saccharomyces cerevisiae* fue llevado a cabo según el protocolo de Toolbox kit (Janke et al. 2004), utilizándose los plásmidos pYM-N18, pYM-N14 y pYM-N1 (ver Anexo I), de Euroscarf, que contienen los promotores constitutivos *TEF*, *GPD* y el promotor fuerte inducible *CUP1-1*, respectivamente. Las herramientas propuestas en el Toolbox kit permiten la introducción de secuencias presentes en una colección de plásmidos (cambio de promotores, C-terminal o N-terminal tagging) en cualquier gen seleccionado de *S. cerevisiae*. La estrategia para el cambio de promotor consiste en el diseño de oligonucleótidos híbridos largos para PCR, los cuales marcan directamente el locus cromosomal deseado. Los

extremos homólogos dirigen la integración hacia el locus deseado y por recombinación homóloga producen la sustitución. En *S. cerevisiae* una región de homología de unas 50 bases es suficiente para que la recombinación homóloga sea exitosa.

Amplificación de fragmentos con marcador KAN y promotores específicos

Se levantaron los fragmentos dentro de los cuales se encuentran los promotores *CUP1-1*, *GPD* y *TEF* de los plásmidos pYM-N1, pYM-N14 y pYM-N18 respectivamente mediante PCR, en un equipo Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, utilizándose los cebadores híbridos S1 y S4, descritos en la tabla 7. En la figura 7, se muestran las regiones que hibridan en el cromosoma y las que hibridan en el plásmido. Los plásmidos, también permiten la incorporación del marcador de selección KAN-MX, el cual se selecciona con el antibiótico G418 (geneticina).

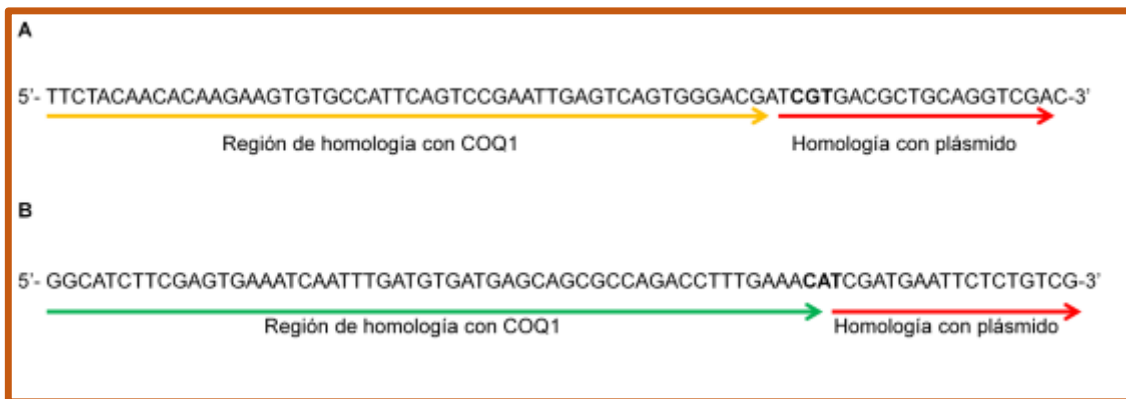


Figura 7. Esquema de cebadores híbridos S1_Foward y S4_Reverse.

Se llevó a cabo la reacción de PCR según lo establecido en (Janke et al. 2004), con las siguientes modificaciones:

- Desnaturalización: 4 min. → 95 °C
 - Desnaturalización: 30 seg. → 95 °C
 - Hibridación: 30 seg. → 54 °C
 - Elongación: 2 min. 40 seg. → 68 °C
 - Elongación: 7 min. → 68 °C
- } 30 ciclos

Transformación de cepas con fragmentos “kanMX promotores específicos”

BY4741 y BY4742 fueron transformadas con el producto de PCR obtenido anteriormente, según el protocolo de transformación detallado anteriormente.

Una vez transformadas con el fragmento lineal que contiene el nuevo promotor y marcador KAN, se espera que este hibride en el cromosoma con sus regiones de homología, dando la posibilidad a que ocurra un doble evento de recombinación

homóloga. Al llevarse ésta a cabo, se habrá incorporado el ADN foráneo con el marcador KAN y promotor específico, corriente arriba del gen COQ1 (figura 8).

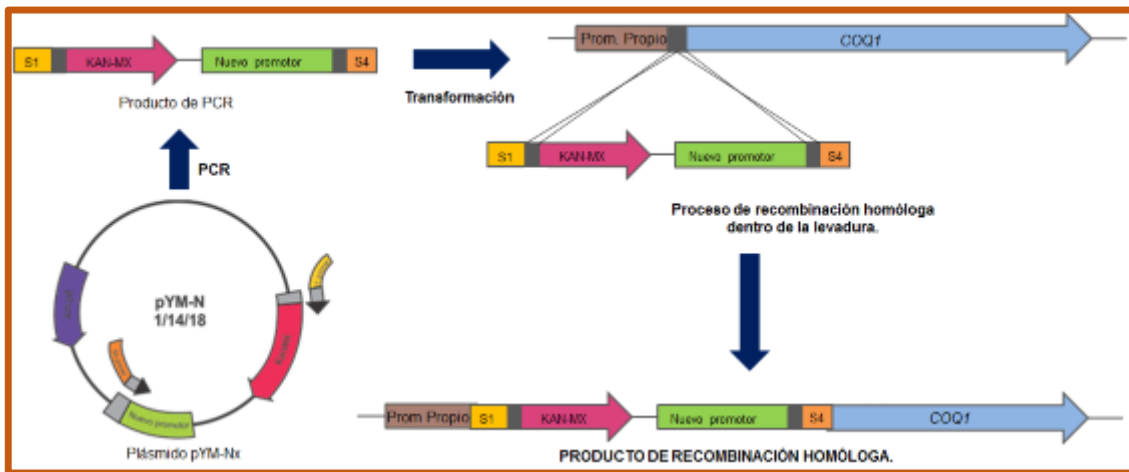


Figura 8. Esquema del proceso de cambio de promotor en las cepas BY4741 y BY4742.

Las células transformantes, que incorporaron el nuevo fragmento de ADN en su cromosoma fueron seleccionadas en medio YPD con el antibiótico de selección G418 200 mg/L. Las colonias seleccionadas se repicaron dos veces en el medio YPD-G418, para confirmar la pureza de la cepa.

Chequeos de las construcciones en el cromosoma

Con el propósito de corroborar que la inserción en el cromosoma se llevó a cabo en la dirección y lugares esperados se llevaron a cabo varias instancias de verificación. En un principio se llevó a cabo “colony PCR” sobre las colonias seleccionadas anteriormente, utilizando los pares de cebadores KanC_Fw el cual hibrida en la región comprendida dentro del marcador de selección (KAN_MX) y Prom_COQ1_rev, el cual hibrida con una región específica dentro del gen de COQ1. También se llevaron a cabo “colony PCR” sobre las mismas colonias, con cebadores específicos para cada promotor y Prom_COQ1_rev así como también con el par de cebadores Prom_COQ1_Fw y KanB_rev a modo de confirmar la correcta inserción del fragmento en el cromosoma en ambos extremos del fragmento.

Para llevar a cabo la PCR sobre colonias (colony PCR), es necesario primero llevar a cabo la extracción de ADN de las mismas, el cual se realizó siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Resuspender la colonia en 20 μ L de NaOH 20 mM.
- Incubar a 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos.
- Agitar en vortex.
- Centrifugar 30 segundos a máxima velocidad.
- Guardar el sobrenadante.

El programa de amplificación utilizado para los pares de cebadores KanC_fw/Prom_COQ1_rev y Prom_COQ1_fw/KanB_rev, fue el siguiente:

- Desnaturalización: 4 min. \rightarrow 94 $^{\circ}$ C
 - Desnaturalización: 30 seg. \rightarrow 94 $^{\circ}$ C
 - Hibridación: 30 seg. \rightarrow 54 $^{\circ}$ C
 - Elongación: 2 min. \rightarrow 72 $^{\circ}$ C
 - Elongación: 7 min. \rightarrow 72 $^{\circ}$ C
- } 30 ciclos

El programa de amplificación utilizado para los pares de cebadores de cada promotor específico (pYM-N1_CUP1_fw/pYM-N14_CUP1_fw/pYM-N18_CUP1_fw) y el cebador Prom_COQ1_rev, fue el siguiente:

- Desnaturalización: 4 min. \rightarrow 94 $^{\circ}$ C
 - Desnaturalización: 30 seg. \rightarrow 94 $^{\circ}$ C
 - Hibridación: 30 seg. \rightarrow 54 $^{\circ}$ C
 - Elongación: 45 seg. \rightarrow 72 $^{\circ}$ C
 - Elongación: 7 min. \rightarrow 72 $^{\circ}$ C
- } 30 ciclos

Puesto que en el desarrollo de esta actividad se detectó un error en el diseño del cebador híbrido S4 (omisión de una Adenina, figura 9), dando lugar a la formación de una versión trunca de la proteína Coq1p, fueron necesarias otras instancias de verificación para corroborar si en los eventos de recombinación homóloga había sido incorporada esa región defectuosa.

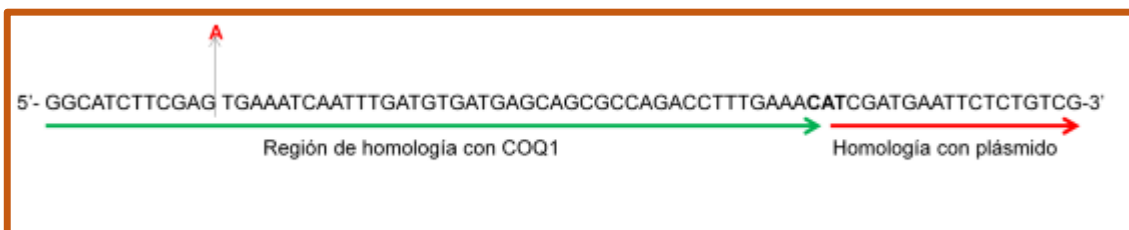


Figura 9. Esquema del cebador híbrido defectuoso S4.

Como primera instancia de verificación, se sembraron las colonias candidatas (aquellas que daban producto de PCR para los pares de cebadores utilizados en el paso anterior), en un medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono. La estrategia de crecimiento en un medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono, se basa en el hecho de que en las levaduras, hay ocho genes *COQ* requeridos para la biosíntesis de la Coenzima Q, la cual actúa a modo de transportador lipídico de electrones en la cadena de transporte electrónico en las mitocondrias de eucariotas. Las mutaciones o deleciones en cualquiera de estos genes dan lugar a la pérdida de producción de la Coenzima Q e impide el crecimiento de la levadura en fuentes de carbono no fermentables, como etanol y glicerol (Ashby & Edwards 1990). Posteriormente, como última instancia de verificación, se llevó a cabo la secuenciación de los productos de PCR (para los pares de cebadores específicos de cada promotor y el cebador Prom_COQ1_rev), de aquellas colonias que crecieron en el medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono. La secuenciación fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. También se secuenciaron algunas colonias que no crecieron en glicerol a modo de control negativo.

Mating de las transformantes

Se llevó a cabo el “mating” de aquellas cepas que fueron positivas para los chequeos anteriores:

BY4741_CUP1-1 x BY4742_CUP1-1

Siendo estas las cepas BY4741 y BY4742 con el nuevo promotor *CUP1-1*.

El mating se lleva a cabo mediante el sembrado de dos colonias de cepas de mating type complementario, una sobre otra, en un medio YPD. Se debe incubar en estufa a 30 °C por un período de al menos 4 horas para permitir el mating de las células haploides, dando lugar a la formación de una diploide.

Para el caso de los otros promotores *GPD* y *TEF*, estos fueron incorporados correctamente sólo en la cepa BY4741. Por lo tanto, para la obtención de la diploide con copia del nuevo promotor en cada alelo, se llevaron a cabo otras estrategias, que se detallan a continuación.

Obtención de las diploides con promotores *GPD* y *TEF*

Para la obtención de las diploides con nuevo promotor en los dos alelos, se llevó a cabo en una primera instancia, el “mating” de la cepa BY4741 modificada con BY4742 salvaje, donde se crea una diploide con un alelo mutante y el otro salvaje. El objetivo de este paso es que se lleve a cabo la recombinación homóloga entre las copias

provenientes de cada una de las haploides. De este modo, al tratar posteriormente a esta diploide en condiciones de privación de fuente de nitrógeno en el medio RICH SPO, las células esporulan, dando lugar a la formación de cuatro esporas con las distintas combinaciones genotípicas, las cuales se muestran en la tabla 8. Mediante disección de las tétradas se separan las esporas con micromanipulador, tal como se detalla en el siguiente ítem, y se selecciona por pasaje a distintos medios selectivos, aquella con el fenotipo Mat a/KAN (marcador del nuevo promotor), para luego llevar a cabo el mating entre ésta y la Mat a/KAN (BY4741 modificada), obtenida anteriormente. El procedimiento de la obtención de las diploides con los promotores *GPD* y *TEF* se esquematiza en la figura 10.

Tabla 8. Genotipos posibles para las esporas.

<i>Mating type</i>	Genotipo
<i>a/α</i>	<i>Prom COQ1 wt/ MET/ lys</i>
<i>a/α</i>	<i>Prom COQ1 wt/ met/ LYS</i>
<i>a/α</i>	<i>Prom COQ1 wt/ MET/ LYS</i>
<i>a/α</i>	<i>Prom COQ1 wt/ met/ lys</i>
<i>a/α</i>	<i>GPD o TEF_KAN/ MET/ lys</i>
<i>a/α</i>	<i>GPD o TEF_KAN/ met/ LYS</i>
<i>a/α</i>	<i>GPD o TEF_KAN/ MET/ LYS</i>
<i>a/α</i>	<i>GPD o TEF_KAN/ met/ lys</i>

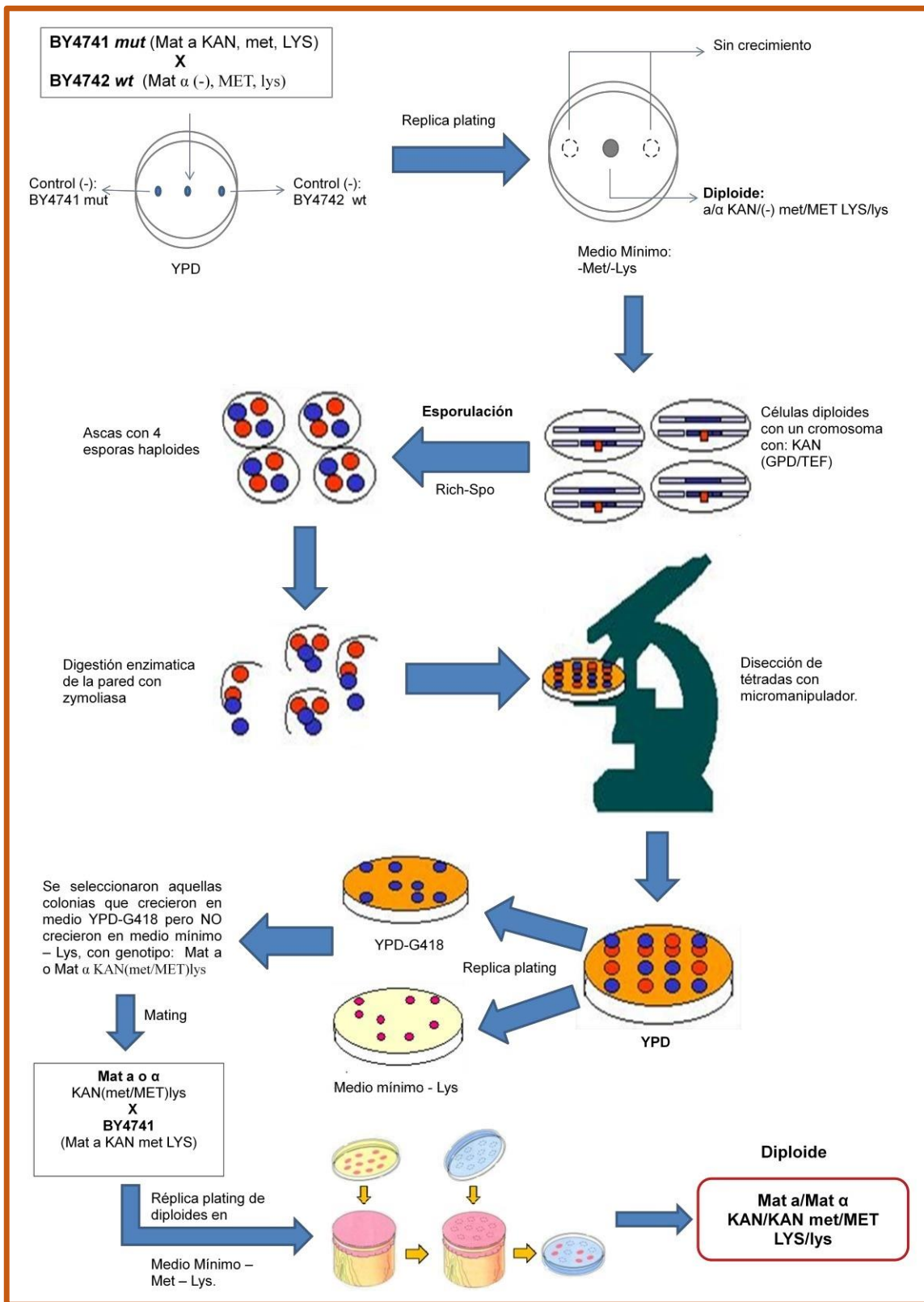


Figura 10. Esquema de trabajo para la obtención de las diploides BY4743 mut, con genotipos Mat a/α, KAN(GPD o TEF)/KAN(GPD o TEF), met/MET, LYS/lys.

Esporulación y disección de tétradas

Se resuspende una colonia de interés en un tubo con 2 mL del medio RICH-SPO, y se incuba a 30 °C durante un período de 2 a 4 días (todos los ensayos fueron realizados en duplicado).

Se verifica que el cultivo haya esporulado, mediante observación al microscopio.

Tratamiento de esporas previo a la disección:

- Tomar 1 mL del cultivo y centrifugar 3 minutos a 3000 rpm.
- Resuspender el pellet en 200 µL de Buffer Zymo (1.2 M sorbitol, 20 mM fosfato de potasio, pH 7.4), sin zymoliasa.
- Transferir 50 µL, a un tubo eppendorf y centrifugar 3 minutos a 3000 rpm.
- Resuspender el pellet en 5 µL de Buffer Zymo.
- Agregar 5 µL de Zymoliasa (0.5 ng/mL).
- Incubar por un período de 20-30 minutos a 30 °C.
- Diluir en 1000 µL de Buffer Zymo.

Disección de esporas:

- Colocar 20 µL de la suspensión en un costado de una placa de YPD y mover la placa para que el cultivo se deslice a través de la placa, en línea recta. Dejar secar unos minutos. Colocar la placa en el micromanipulador
- Separar una tetrada a la posición 1 de la placa e inmediatamente separar las esporas a las posiciones 1^a, 1b, 1c y 1d, tal como se muestra en la figura 11 . Separar otra tétrada a la posición 2 y así sucesivamente.
- Incubar a 28°C.

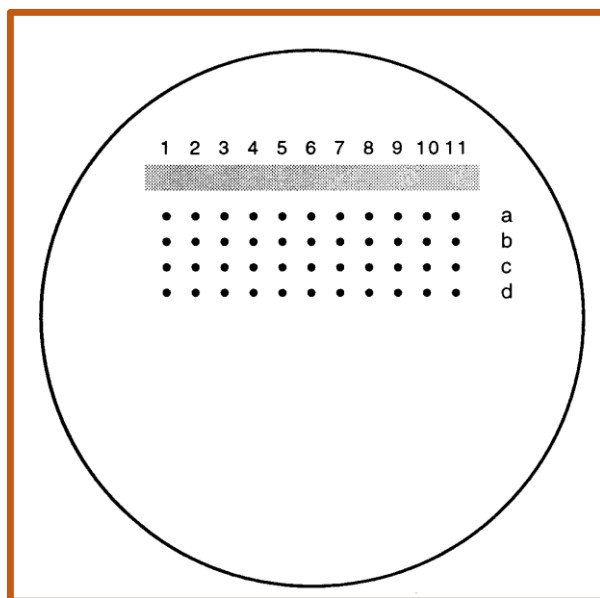


Figura 11. Esquema de la grilla para micromanipulación de tetradas y esporas.

3.11 Métodos de extracción y cuantificación de proteínas.

3.11.1 Extracción de proteínas totales

Los ensayos de expresión de proteínas se realizaron sobre las siguientes cepas: 33138 que corresponde al mutante nulo para *COQ1* (control negativo), BY4743 como control positivo, BY4743_GPD (cepa de análisis), BY4743pHA1-1 como cepa de referencia (Gin & Clarke 2005), y 33138pHA1-1, como un control extra, ya que sólo expresa *COQ1* a partir del plásmido pHA1-1. En las cepas transformadas con el plásmido pHA1-1, Coq1p es producida con un tag en el extremo N terminal, por lo que tiene un patrón de migración diferente en los geles a los de la proteína Coq1p sola.

Para la extracción de proteínas, se centrifugaron 15 mL de cultivos de 48 horas de las cepas en estudio, durante 10 minutos a 5000 rpm, en una centrífuga Sorvall RC5. Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Resuspender el pellet en 200 μ L de una solución Urea/HEPES
2. Agregar aproximadamente 200 μ L de glass beads.
3. Agitar en vórtex durante 5 minutos, pausando cada 1 minuto para incubar en hielo durante el mismo tiempo, para evitar la degradación de las proteínas al aumentar la temperatura.
4. Agregar 50 μ L de SDS al 10%.
5. Incubar a 65 °C durante 5 minutos.

6. Centrifugar a 4 °C a máxima velocidad (13000 rpm) durante 10 minutos. Se utilizó una centrifuga Sorvall Legend Micro 17 R con refrigeración.
7. Recolectar el sobrenadante. Se repartió el sobrenadante en alícuotas de 30 µL y se guardó en freezer a -20 °C.

Soluciones:

- Solución Urea/HEPES: Urea 8 M, y HEPES (ácido [N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]) 50 mM.
- SDS 10%: Se pesaron 10 gr de SDS para 100 mL de agua miliQ.

3.11.2 Extracción de proteínas mitocondriales

La extracción de proteínas mitocondriales, se puede dividir en dos etapas. Una primera etapa de obtención de los esferoplastos, y la segunda, de obtención de las proteínas mitocondriales.

Obtención de los esferoplastos

Se centrifugó 1 L de cultivo celular de 36 horas en medio Símil Mosto, durante 10 min a 6000 g en una centrifuga Sorvall LYNX 4000 (Thermo Scientific). El pellet se resuspendió en 15 mL de buffer de esferoplastos, previo lavado en sorbitol 1 M, y se incubó durante 15 min a 30 °C en agitación suave. Posteriormente se agregaron β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 % (v/v) y Lyticasa (Sigma), aproximadamente 4000 U (11 mg), y se incubó en las mismas condiciones de 30 a 40 min. Se obtuvieron los esferoplastos mediante el centrifugado a 1000 g durante 10 min. Adaptado de (Adams & Gross 1991).

Obtención de las proteínas mitocondriales

Los esferoplastos obtenidos en el paso anterior son homogenizados, previo 2 lavados en buffer de homogenización frío (6.5 mL de buffer/g de peso húmedo de pellet), mediante 15 bajadas del émbolo de un homogenizador Potter-Elvehjem de 10 mL de capacidad en un volumen del mismo buffer. Mediante la centrifugación de la muestra a 4 °C durante 5 min, a 1500 g, se separan las células sin romper, núcleos y restos celulares. Posteriormente se centrifuga el sobrenadante, primero 5 min a 3000 g, y el sobrenadante obtenido se centrifuga 15 min a 12000 g, siempre a 4 °C. Se resuspende el pellet en buffer de homogenización frío (6,5 mL de buffer/g de peso húmedo de pellet) y se centrifuga 5 min a 3000 g. El sobrenadante es centrifugado durante 15 min a 12000 g a 4 °C, el pellet obtenido, correspondiente a la fracción mitocondrial, es finalmente

resuspendido en 300 μ L e buffer SEM y guardado en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado. Adaptado de (Gregg et al. 2009).

Soluciones:

- Buffer de esferoplastos (pH 7.5): Sorbitol 1.4 M, HEPES 40 mM y MgCl_2 0.5 mM.
- Buffer de homogenización (pH 7.4): Tris base 10 mM, Sorbitol 0.6 M, EDTA 1 mM y BSA 0.2 % (p/v).
- Buffer SEM: MOPS/KOH 10 mM (pH 7.2) y EDTA 1 mM.

3.11.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford, la cual se basa en la unión del colorante azul de coomasie G-250, a la región interior, hidrofóbica de la proteína. El complejo azul brillante colorante-proteína tiene un máximo de absorción diferente a la del colorante sólo, el cual tiene un color azul pardo. Dicha técnica se describe a continuación:

1. Realizar una curva de calibración con BSA con los siguientes puntos: 1, 0.8, 0.6, 0.3, 0.1 y 0 mg/mL de la proteína.
2. Realizar diluciones de las muestras problemas (1/5, 1/10, 1/50, 1/100).
3. Poner 100 μ L de cada punto de la curva de calibración y de las diluciones de las muestras problema en tubos de vidrio y agregarles 1 mL de reactivo de Bradford.
4. Medir absorbancia a 595 nm. El color es estable durante aproximadamente una hora.

Soluciones:

- Reactivo de Bradford (100 mL): 10 mg de azul de coomasie G-250 en 10 mL e ácido fosfórico al 88 %, agregar 4.7 mL de etanol absoluto y llevar en matraz aforado hasta 100 mL con agua miliQ.

3.12 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.

Se realizó electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las muestras proteicas obtenidas, a modo de separar las proteínas. Se utilizó una cuba de electroforesis *Mini* PROTEAN 3 Cell (BioRad).

Se sembraron 30 μ g de cada muestra proteica, en un gel concentrador con la siguiente composición: acrilamida (4.8 %), bisacrilamida (0.13 %), SDS (0.1 %) en Tris 0.12 M pH 6.8. El gel separador constó de: acrilamida (12 %), bisacrilamida (0.3 %),

SDS (0.1 %) en Tris 0.38 M pH 8.7. Como catalizadores de la polimerización se utilizaron APS (persulfato de amonio) y TEMED (1,2-di-(dimetilamino)etano) ambos a una concentración final de 0.15 %.

Se utilizó para correr el gel, un buffer Tris-Glicina, realizándose la corrida a 90 V para el gel concentrador y subiéndose el voltaje a 150 V una vez que las muestras comenzaron a correr en el gel separador.

Los geles utilizados para verificar la extracción de proteínas, y optimizar las condiciones de corrida fueron teñidos incubándose overnight con una solución a base de azul de coomasie. Para extraer el excedente de colorante, se usó una solución de desteñido. Una vez teñidos, estos geles no pueden ser utilizados para transferencia a membrana, ya que las proteínas quedan fijadas al colorante.

Soluciones:

- Solución stock de acrilamida/bisacrilamida: acrilamida al 30 % (p/v) y bisacrilamida al 0.8 % (p/v) en agua miliQ.
- Solución stock de SDS: 10 % (p/v) en agua miliQ.
- Solución stock de APS: 10 % (p/v) en agua miliQ.
- Buffer de corrida: glicina 0.112 M, SDS 0.1% y Tris 25 mM (pH 8.5).
- Solución de teñido: coomasie brilliant blue 1.125 % (p/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v).
- Solución de desteñido: etanol 25 % (v/v) y ácido acético glacial al 10 % (v/v).

3.13 Ensayos de Western Blot.

3.13.1 Transferencia

Se llevó a cabo la transferencia de las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Orotran™ 0.45 µm NC, en una cuba de transferencia *Mini TRANS-BLOT Cell* (BioRad) a 85 V durante 40 minutos. Para la transferencia se utilizó un buffer Tris-Glicina.

Se evaluó la eficacia de la transferencia mediante tinción con Rojo Ponceau. Este colorante, se une reversiblemente de manera inespecífica a todas las proteínas, lo que permite evaluar si efectivamente hubo transferencia de las proteínas, pudiéndose luego eliminar el colorante con lavados consecutivos de agua miliQ.

Soluciones:

- Buffer de transferencia (pH 7.6): Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.01 % (p/v) y metanol 10 % (v/v), el cual se agrega al momento de ser utilizado.
- Rojo Ponceau: Rojo PonceauS (Sigma) 0.1 % en ácido acético glacial al 5 %.

3.13.2 Detección Inmunológica

Para detectar la presencia de la proteína de interés, Coq1p, se utilizó suero con el anticuerpo anti-Coq1, cedido por la Dra. Catherine F. Clarke, del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de California, EEUU. Para la detección inmunológica se siguieron los siguientes pasos:

1. Bloquear la membrana con TBSt-leche overnight a 4 °C.
2. Lavar la membrana 2 veces 15 minutos cada vez, en TBSt.
3. Incubar durante dos horas, en agitación suave a temperatura ambiente, con una dilución 1/1000 en TBSt del anticuerpo primario anti-Coq1.
4. Descartar el buffer con el anticuerpo primario, y lavar la membrana 3 veces con TBS-t y agitación durante 10 minutos cada vez.
5. Descartar el TBS-t y agregar 10 mL de TBS-t-leche con el anticuerpo secundario (Goat anti Rabbit IgG acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce, #31460)) con una concentración final de 1/10000.
6. Incubar durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
7. Descartar el buffer con el anticuerpo secundario, y lavar la membrana 3 veces con TBS-t y agitación durante 10 minutos cada vez.

Soluciones:

- TBSt (pH 7.6): Tris base 50 mM, NaCl 150 mM y Tween20 0.5 % (v/v).
- TBSt-leche: TBSt con el agregado de 5 % (p/v) de leche en polvo descremada.

3.13.3 Revelado

Para el revelado, se incubó la membrana durante 5 minutos, en una solución que constó de partes iguales de cada reactivo del kit de revelado quimioluminiscente *HRP SuperSignal West Pico* (Pierce). Posteriormente se expuso la membrana en un cassette de rayos-X a un film de rayos X durante tiempos variables (15-90 segundos). En última instancia, los films fueron revelados con las soluciones comerciales de revelado y fijado habituales. Todo el proceso fue realizado en cuarto oscuro de revelado fotográfico.

3.14 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza ANOVA, utilizando el test de Tukey, sobre los datos experimentales a modo de evaluar si las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos son estadísticamente significativas ($p = 0.05$). Para ello se utilizó el programa InfoStat/Estudiantil versión 2015 (Di Rienzo et al. 2015).

Capítulo 4

Resultados y Discusión



4.1 Sobreexpresión del gen *COQ1* en la cepa de laboratorio BY4743.

Teniendo en cuenta los resultados previos del grupo donde se trabajó con cepas industriales (Carrau et al, 2005), se decidió sobreexpresar el gen *COQ1* en una cepa de laboratorio de contexto genético conocido como BY4743. Para los ensayos de sobreexpresión se trabajó con plásmidos que sobreexpresaban *COQ1* en diferentes niveles y también, paralelamente, se decidió reemplazar el promotor de *COQ1* a nivel del cromosoma por diferentes promotores fuertes.

4.1.1 Producción de isoprenoides al sobreexpresar el gen *COQ1* clonado en plásmidos en la cepa de laboratorio BY4743

Se evaluó la producción de isoprenoides bajo el efecto de la sobreexpresión del gen *COQ1*, clonado en distintos plásmidos y bajo el control de diferentes promotores. Dado que en un trabajo anterior del Departamento de Biología Molecular (Barquet 2012), se observó que la producción de isoprenoides se vincula al final de la fase exponencial de crecimiento y comienzo de la fase estacionaria, se realizaron extracciones de isoprenoides a las 48, 72 y 96 horas de fermentación.

Mediante análisis de GC-MS se identificaron una amplia variedad de monoterpenos tales como limoneno, citronelol, linalol, α -terpineol, geraniol y nerol, sesquiterpenos como nerolidol, farnesol y bisabolol así como también el precursor de triterpenos, escualeno. Las concentraciones de estos compuestos variaron entre 7-30 $\mu\text{g/L}$ para el limoneno, 2-14 $\mu\text{g/L}$ citronelol, 3.5-4.5 $\mu\text{g/L}$ α -terpineol, 0-0.6 $\mu\text{g/L}$ nerol, 4-7.5 $\mu\text{g/L}$ bisabolol y entre 0-26.5 $\mu\text{g/L}$ de escualeno. Dado que los monoterpenos linalol y geraniol y los sesquiterpenos nerolidol y farnesol, son los compuestos que mostraron cambios más significativos en los diferentes tratamientos estudiados, el análisis de los resultados se centró principalmente en estos compuestos. También desde un punto de vista de su posible uso como biocombustibles los isoprenoides volátiles de 10 y 15 carbonos serían los adecuados.

Tal como se observa en la figura 12 A, se alcanzó un crecimiento máximo de las cepas BYpADCL y BYpHA1-1 del orden de 1×10^8 cél/mL siendo las cepas BYpRS y BYpRSQ1-1, las de menor crecimiento, en el orden de 2×10^7 . La viabilidad celular, tal como se observa en la figura 12 B, se mantuvo muy alta a lo largo de todo el ensayo variando desde un 97 % (aproximadamente 1×10^7 cél/mL) para las cepas BYpRS y BYpRSQ1-1 al 99 % para las cepas BYpADCL y BYpHA1-1.

En las figuras 13 y 14, se muestran los resultados obtenidos con estas cepas para los monoterpenos linalol y geraniol y los sesquiterpenos nerolidol y farnesol

respectivamente. Se realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) utilizando el test de Tukey. Tal como se observa en las figuras 13 y 14, se describe el grado de significancia de los datos con una letra sobre la barra correspondiente. La presencia de la misma letra en dos barras implica que no existen diferencias significativas entre ellos. La máxima concentración de linalol obtenida fue de 15.6 $\mu\text{g/L}$ para la cepa BYpHA1-1 (BY4743pHA1-1) a las 96 horas y la máxima concentración de geraniol obtenida fue de 1.3 $\mu\text{g/L}$ por la cepa BYpADCL (BY4743pADCL) también a las 96 horas. Estos valores son mayores a los reportados en el trabajo de Carrau et al. 2005, donde utilizaron cepas industriales sin plásmidos.

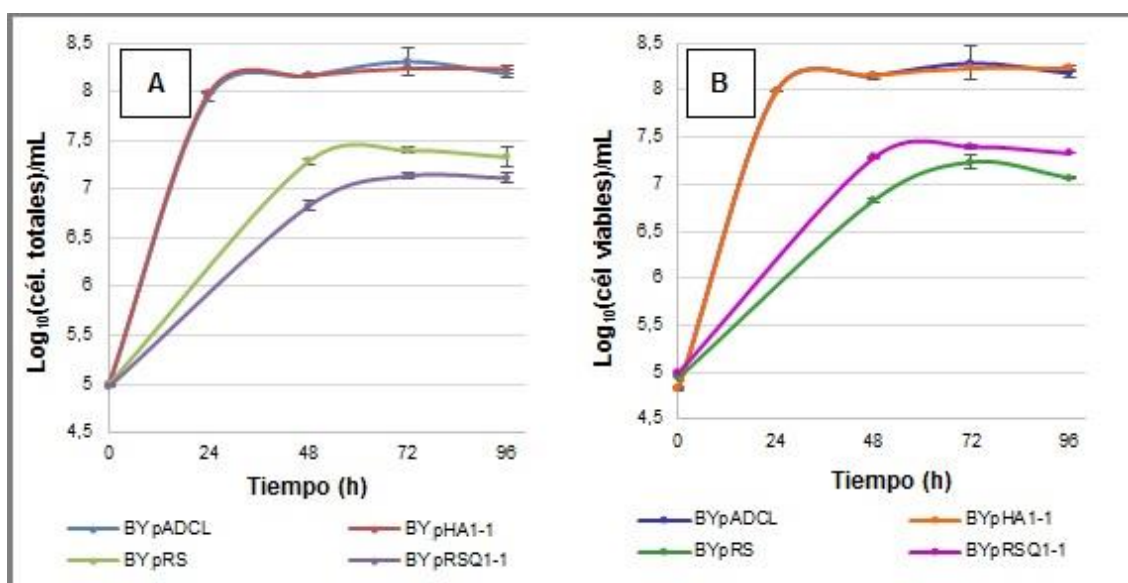


Figura 12. Perfil de crecimiento celular: A, células totales por mL y B, células viables por mL de cultivo. Todas las medidas fueron realizadas al menos por duplicado.

En lo que refiere a la producción de linalol, se observa un aumento en la producción del mismo de 1.6 $\mu\text{g/L}$ para BYpHA1-1 (concentración máxima de 15.6 $\mu\text{g/L}$) con respecto a BYpADCL (concentración máxima de 14.0 $\mu\text{g/L}$). También las cepas transformadas con los plásmidos de bajo número de copias, BYpRS (BY4743 con el plásmido vacío pRS316) y la cepa BYpRSQ1-1 (BY4743 transformada con el plásmido pRSQ1-1, que sobreexpresa *COQ1* bajo control de su promotor propio), presentan un aumento en su producción de linalol. Al igual que para la producción de linalol, habría mayor producción de geraniol por las cepas transformadas con los plásmidos de alto número de copias, aunque no se observa una tendencia clara y los niveles son muy bajos.

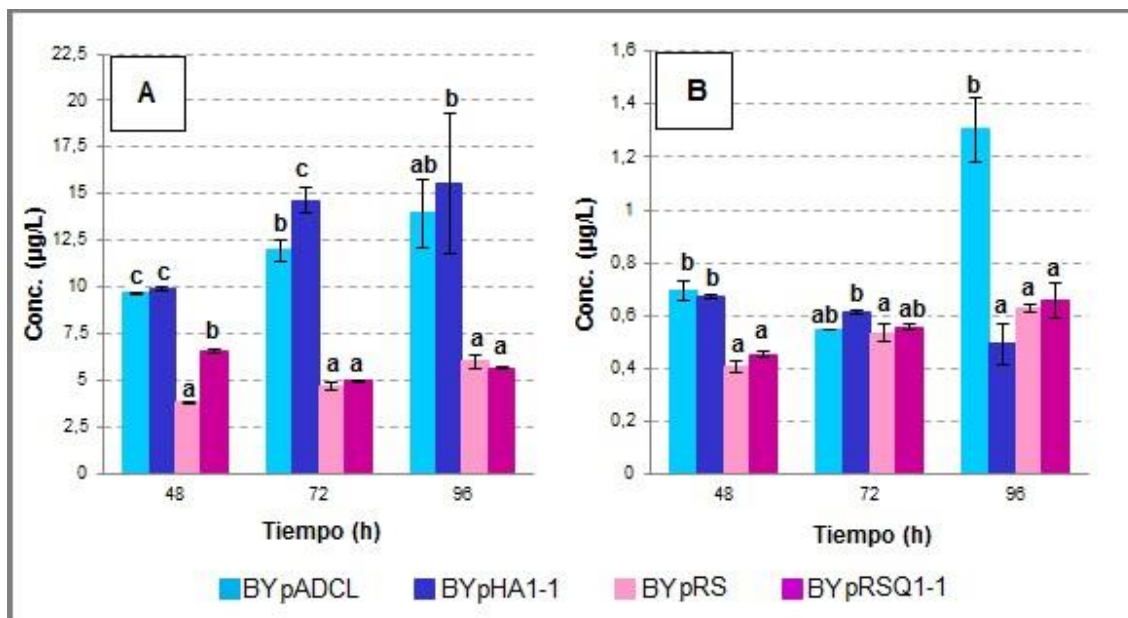


Figura 13. Concentraciones de Linalol (A) y Geraniol (B), obtenidos al sobreexpresar *COQ1* en plásmidos bajo el control de diferentes promotores. Se utilizó el medio Símil Mosto con 206 mg/L de YAN y presión de selección. Sobre las barras se indican con las letras a,b y c la significancia estadística de los datos, letras diferentes, implica que las diferencias entre esos tratamientos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se realizaron duplicados biológicos y técnicos para cada ensayo.

Al observar la producción de sesquiterpenos, en la figura 14, encontramos nuevamente, que la presencia de un plásmido aumenta la producción tanto de farnesol como nerolidol. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, parecería que existe un efecto positivo de los plásmidos que sobreexpresan *COQ1* en comparación a las cepas transformadas con los respectivos plásmidos vacíos. Lo que sí se observa claramente y es estadísticamente significativo es que se produce mayor concentración de farnesol y nerolidol en presencia de los plásmidos de alto número de copias con respecto a los de bajo número de copias. Las concentraciones máximas de nerolidol y farnesol fueron 307.5 y 292 µg/L a las 48 horas respectivamente, para la cepa BYpHA1-1 en ambos casos. En el caso de las cepas transformadas con los plásmidos de bajo número de copias, la concentración máxima de nerolidol fue de 125.4 µg/L a las 96 horas y la de farnesol 139.4 µg/L a las 48 horas. Estos valores, son superiores a los reportados por Carrau et al. 2005. Sin embargo, los valores de farnesol son 28 veces menores a los reportados por Ohto et al. 2009, sobreexpresando *HMG-CoA* reductasa en *Saccharomyces* y 5 veces menor al valor reportado por Chambon et al. 1990, en una cepa de *Saccharomyces* mutante para *Erg9* (ver tabla 12).

En el trabajo de Gin & Clarke se demuestra que los niveles de Coq1p que se logran con el plásmido pRSQ1-1 son menores a los alcanzados con el plásmido pHA1-1. Si la proteína Coq1p está vinculada a la producción de isoprenoides, se esperaría que a

mayores niveles de Coq1p se obtuvieran mayores niveles de isoprenoides, tal como efectivamente se obtuvo. Sin embargo, llama la atención los altos niveles de isoprenoides obtenidos con las cepas que portan los plásmidos vacíos. Debido a que el marcador de selección para el mantenimiento de los plásmidos de alto número de copias es diferente del que portan los plásmidos de bajo número de copias, no es posible comparar los resultados de estos experimentos ya que fueron realizados en medios diferentes. La sobreexpresión de *COQ1* a partir del cromosoma permitiría realizar ensayos en un mismo medio de cultivo y también resultaría en una construcción estable.

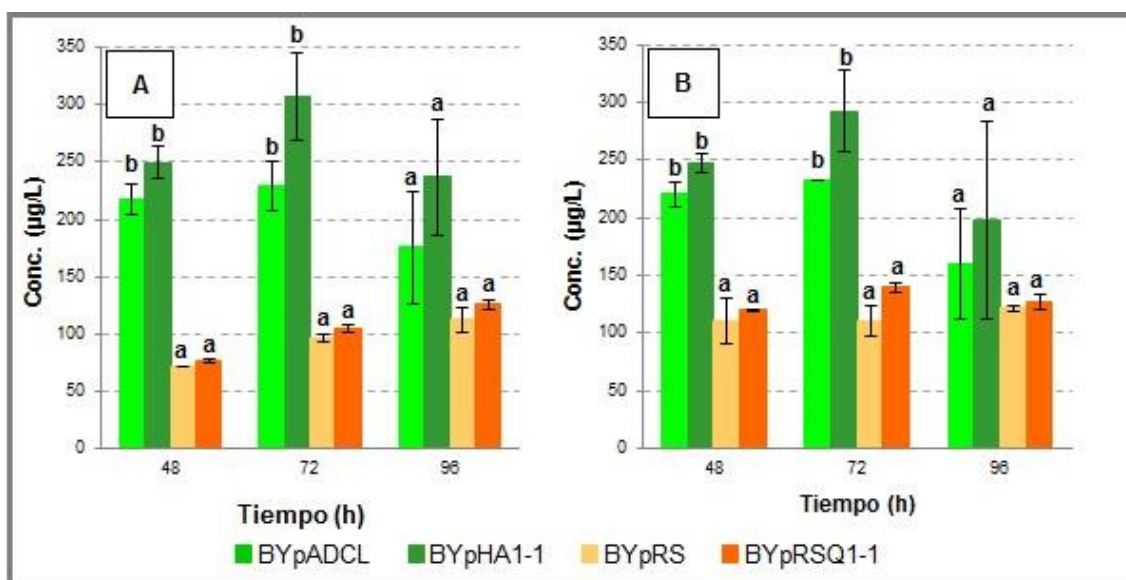


Figura 14. Concentraciones de Nerolidol (A) y Farnesol (B), obtenidos al sobreexpresar *COQ1* en plásmidos bajo el control de diferentes promotores. Se utilizó el medio Símil Mosto con 206 mg/L de YAN y presión de selección. Sobre las barras se indican con las letras a y b la significancia estadística de los datos, letras diferentes, implica que las diferencias entre esos tratamientos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se realizaron duplicados biológicos y técnicos para cada ensayo.

4.1.2 Sobreexpresión del gen *COQ1* en la cepa de laboratorio BY4743 mediante el reemplazo de su promotor a nivel del cromosoma

El objetivo de esta etapa es el de lograr modular la expresión de *COQ1* mediante el reemplazo de su promotor en el cromosoma. Esta estrategia, tiene la ventaja de crear una construcción estable, a diferencia de las construcciones en plásmidos que tienden a perderse a medida que envejece el cultivo. Esto resulta interesante, si se quisiera hacer un escalado a reactor por ejemplo, ya que mantener la presión de selección para no perder plásmidos, implicaría trabajar con medios sintéticos, de composición conocida, lo que no resulta económicamente viable a grandes escalas.

Para esta estrategia, se utilizaron los plásmidos pYM-N18, pYM-N14 y pYM-N1 del Toolbox kit (Janke et al. 2004), que contienen los promotores constitutivos *TEF*, *GPD* y el promotor fuerte inducible *CUP1-1*, respectivamente. La estrategia para el cambio de promotor, tal como se describió previamente en Materiales y Métodos, consiste en el diseño de cebadores híbridos largos para PCR, los cuales marcan directamente el locus cromosomal deseado. Los extremos homólogos dirigen la integración hacia el locus deseado y por recombinación homóloga producen la sustitución.

4.1.2.1 Amplificación de región: – marcador(KAN)/promotores específicos –

Se obtuvieron los fragmentos de ADN con el marcador KAN y los respectivos promotores, mediante una reacción de PCR, utilizando los oligos S1 y S4, tal como fue descrito en Materiales y Métodos. Los tamaños obtenidos de los productos de PCR de pYM-N1, pYM-N14 y pYMN18, concuerdan con los valores reportados por Janke et al. 2004, de 1990, 2143 y 1932 pares de bases respectivamente. En la figura 15, se muestra la foto de dichos productos de PCR, en un gel de agarosa de 0.7%. Estos productos de PCR, fueron utilizados posteriormente para transformar las cepas BY4741 y BY4742.

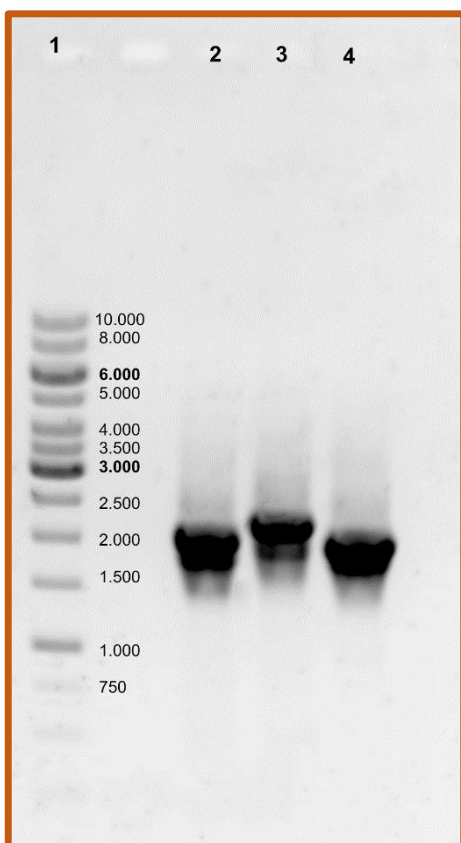


Figura 15. Productos de PCR obtenidos a partir de los plásmidos: 2) pYM-N1, 3) pYM-N14, 4) pYM-N18. En el carril 1, se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de Fermentas. Gel de agarosa de 0.7 %.

4.1.2.2 Cambio de promotor en cepas BY4741 y BY4742

Se transformaron las cepas BY4741 y BY4742 con los productos de PCR obtenidos anteriormente, como forma de asegurarse que el cambio de promotor se llevara a cabo en las dos copias del cromosoma. Los extremos homólogos de estos fragmentos, dirigen la recombinación homóloga con el locus de interés en el cromosoma. Posteriormente se llevó a cabo la selección de los recombinantes de interés, en medio YPD con antibiótico G418, cuyo gen de resistencia fue utilizado como marcador en la región de interés. En la figura 16, se muestra el esquema del producto de recombinación esperado en las cepas BY4741 y BY4742.

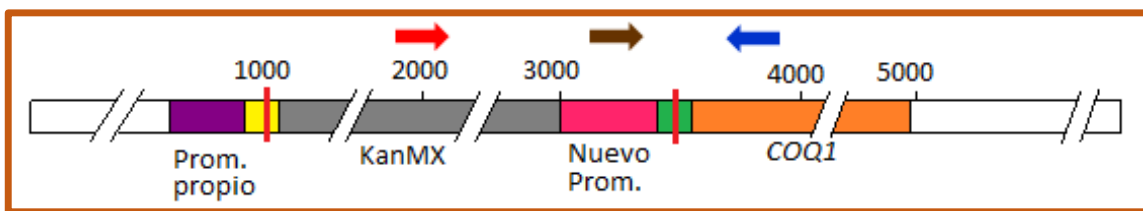


Figura 16. Esquema del producto de recombinación esperado. En rojo el primer KanC_Fw, en azul el primer Prom_COQ1_rev y en marrón el cebador específico de cada promotor.

Se obtuvieron en la mayoría de los casos, más de 100 transformantes por placa de YPD-G418. Dada la posibilidad de que hubiera inserción inespecífica, se llevaron a cabo “colony PCR” sobre las transformantes obtenidas, para verificar la correcta inserción de los fragmentos de ADN en el cromosoma. Se realizaron las siguientes PCR de confirmación:

1. PCR con oligos KanC_Fw y Prom_COQ1_rev, ver figura 17.
2. PCR con oligos específicos de cada promotor y Prom_COQ1_rev, ver figura 18.

En la tabla 9, se muestran los tamaños esperados para los productos de las PCR de verificación.

Tabla 9. Tamaños esperados para los productos de PCR de verificación.

	Primer foward	Primer reverse	Tamaño (pb)
<i>pYM-N1</i>	KanC_fw	Prom_COQ1_rev	1404
	pYM-N1-CUP1_fw	Prom_COQ1_rev	495
<i>pYM-N14</i>	KanC_fw	Prom_COQ1_rev	1612
	pYM-N14-GPD_fw	Prom_COQ1_rev	496
<i>pYM-N18</i>	KanC_fw	Prom_COQ1_rev	1358
	pYM-N18-TEF_fw	Prom_COQ1_rev	521

Se muestran en la figura 17, las fotos de las bandas obtenidas en las PCR de confirmación para BY4742 y BY4741 con los pares de cebadores KanC_fw y Prom_COQ1_rev. Tal como se observa en la parte A, tres de las tres colonias analizadas de la cepa BY4742 transformadas con el fragmento con el promotor *CUP1-1* (*pYM-N1*), al igual que las dos colonias de la cepa BY4741 analizadas (ver parte B de la figura 17), dieron productos de 1400 pb tal como se esperaba. En el caso de las transformantes con el promotor *GPD* (*pYM-N14*), se analizaron tres colonias para cada cepa, BY4742 y BY4741, obteniéndose en ambos casos bandas de aproximadamente 1600 pb. Para las transformantes con el promotor *TEF* (*pYM-N18*), se analizaron dos colonias de la cepa BY4742 y tres de la cepa BY4741, obteniéndose en ambos casos, bandas de aproximadamente 1360 pb, tal como se esperaba.

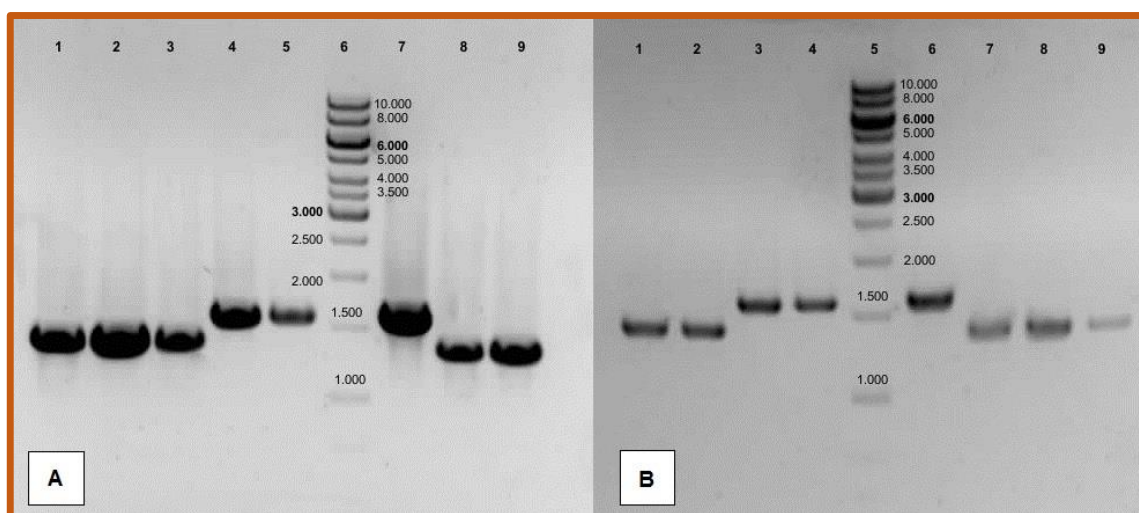


Figura 17. Productos de PCR amplificados a partir de distintas colonias, con cebadores KanC_Fw y Prom_COQ1_rev. A) BY4742: 1,2,3 productos de *pYM-N1*; 4,5,7 productos de *pYM-N14*; 8 y 9 productos de *pYM-N18*. B) BY4741: 1 y 2 productos de *pYM-N1*; 3, 4 y 6 productos de *pYM-N14*; 7, 8 y 9 productos de *pYM-N18*. Geles de agarosa al 1 %, en ambos geles se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de Fermentas.

En la figura 18, se presentan los resultados para la PCR de verificación utilizando el par de cebadores Prom_COQ1_rev y cebadores específicos para cada uno de los promotores: pYM-N1-CUP1_Fw, pYM-N14-GPD_Fw y pYM-N18-TEF_Fw, obteniéndose bandas de aproximadamente 500 pares de bases tal como se esperaba (siendo los tamaños esperados 495, 496 y 521 pb respectivamente).

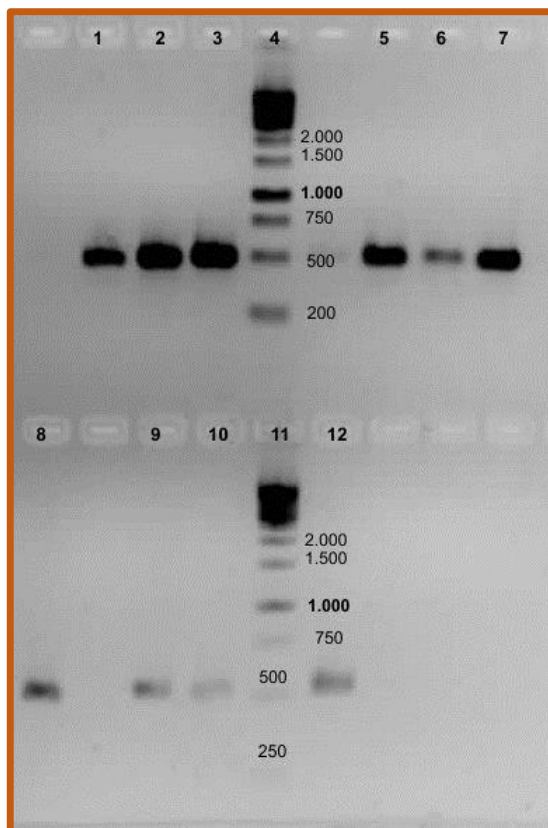


Figura 18. Productos de PCR amplificados a partir de distintas colonias, con cebadores para cada uno de los promotores específicos y Prom_COQ1_rev: 1) producto de pYM-N1 en BY4741, 2) y 3) producto de pYM-N1 en BY4742, 5) y 6) producto de pYM-N14 en BY4741, 7) y 8) producto de pYM-N14 en BY4742, 9) y 10) producto de pYM-N18 en BY4741 y 12) producto de pYM-N18 en BY4742. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder de Fermentas. Gel de agarosa al 1 %.

A partir de la información obtenida a partir de las “colony PCR” de confirmación, con los distintos juegos de cebadores (KanC_Fw/Prom_COQ1_rev y pYMN1-CUP1_Fw o pYM-N14-CUP1_Fw o pYM-N18-CUP1_Fw/ Prom_COQ1_rev), se concluye que efectivamente la nueva región recombinante se insertó en el lugar deseado, ya que, en el primer juego de cebadores KanC_Fw se encuentra dentro de la región recombinante y Prom_COQ1_rev se encuentra en una región del gen *COQ1* lejana, fuera de la región recombinante. También, a partir del segundo par de cebadores, nos aseguramos que el doble evento de recombinación, fue hacia los extremos de la región recombinante, permitiendo que se incorpore el nuevo promotor exitosamente. Sin embargo, en ninguno de estos casos obtenemos información acerca de si la región de S4 que contiene el error en una base, ha sido o no incorporada. Por lo tanto, para esto, se llevaron a cabo otras instancias de verificación, tales como crecimiento en medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono (únicamente para aquellas colonias que dieron productos de

PCR de los tamaños esperados), y posterior secuenciación de aquellas cepas que crecieron en el medio mínimo con glicerol, así como algunas que no lo hicieron, a modo de control negativo.

La estrategia de crecimiento en un medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono permite discriminar las cepas que expresan una proteína Coq1p funcional de las que no lo hacen.

En la tabla 10, se muestran los resultados obtenidos para las 10 cepas secuenciadas.

Tal como se esperaba, aquellas recombinantes que crecieron en glicerol, no incorporaron la región de S4 con el error, mientras que si lo hicieron aquellas que no crecieron en glicerol.

Tabla 10. Característica de las muestras secuenciadas.

Muestra	Cepa	Promotor	Crecimiento en glicerol	Incorporación de error (S4)
1	BY4741	<i>CUP1-1</i>	Sí	No
2	BY4742	<i>CUP1-1</i>	No	Sí
3	BY4742	<i>CUP1-1</i>	Sí	No
4	BY4741	<i>GPD</i>	Sí	No
5	BY4741	<i>GPD</i>	No	Sí
6	BY4742	<i>GPD</i>	No	Sí
7	BY4742	<i>GPD</i>	No	Sí
8	BY4741	<i>TEF</i>	Sí	No
9	BY4741	<i>TEF</i>	No	Sí
10	BY4742	<i>TEF</i>	No	Sí

4.1.2.3 Obtención de las diploides con los nuevos promotores de COQ1

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos según la tabla 10, se llevó a cabo el mating de las recombinantes 1 y 3, correspondientes a BY4741_CUP1 y BY4742_CUP1, obteniéndose la cepa diploide modificada BY4743_CUP1. En cambio, al no obtenerse las cepas BY4742 modificadas con los promotores *GPD* y *TEF*, fueron necesarias otras técnicas de manipulación genética, las cuales fueron ya detalladas en Materiales y Métodos. Las mismas consistieron, en la obtención de cepas diploides híbridas, mediante el mating de las cepas BY4741 recombinantes con las cepas BY4742 sin modificar, por lo tanto esta diploide tiene sólo una copia de *COQ1* con nuevo promotor, mientras que la otra copia contiene a *COQ1* con su promotor original.

Posteriormente, se indujo la esporulación de dicha diploide híbrida y mediante la disección de las tétradas con micromanipulador, se obtienen 4 células haploides con

distintas combinaciones genotípicas. Se seleccionaron aquellas haploides que contienen el marcador KAN. Luego de llevado a cabo el mating entre éstas y BY4741 mutante para *GPD* o *TEF* (sólo se podrá realizar mating con una cepa haploide con mating type α , complementario al de BY4741 *mut*), se llevó a cabo la selección de la cepa diploide con las dos copias mutantes, mediante manipulación en distintos medios de selección, tal como se describe en la figura 10 en Materiales y Métodos.

Se obtuvieron exitosamente las siguientes cepas:

- BY4743_CUP1-1 (diploide con dos copias de *COQ1* bajo control del promotor *CUP1-1*).
- BY4743_GPD (diploide con dos copias de *COQ1* bajo control del promotor *GPD*).
- BY4743_TEF (diploide con dos copias de *COQ1* bajo control del promotor *TEF*).

4.2 Producción de isoprenoides al sobreexpresar *COQ1* mediante una modificación en el cromosoma de *S. cerevisiae*.

Se evaluó la producción de isoprenoides en medio Símil Mosto, a las 48 y 72 horas de cultivo, de las cepas modificadas en el cromosoma BY_CUP1-1 (BY4743_CUP1-1) y BY_GPD (BY4743_GPD). Ya que BY_GPD y BY_TEF (BY4743_TEF), tienen promotores constitutivos, se optó por analizar en un principio únicamente BY_GPD. Se muestra en la figura 19, el perfil de los crecimientos de las cepas en medio Símil Mosto, comparado a la cepa BY4743 sin modificar, en ensayos paralelos en las mismas condiciones.

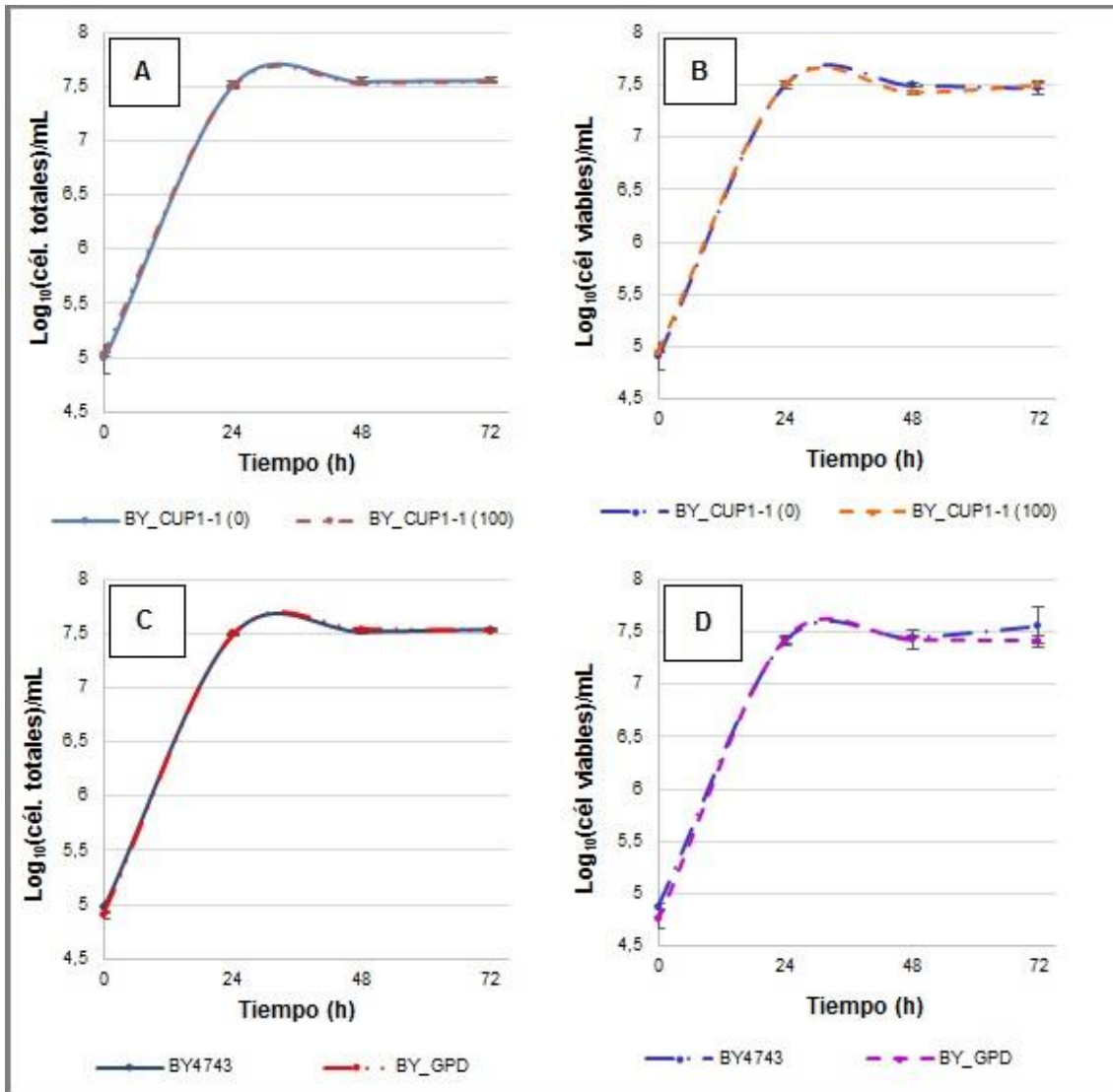


Figura 19. Perfil de crecimiento celular de cepas modificadas en el cromosoma, en medio Símil Mosto (YAN 206 mg/L): A, células totales por mL de las cepas BY_CUP1-1, sin agregado de CuSO_4 , BY_CUP1-1(0) y con el agregado de CuSO_4 , concentración final de 100 μM , BY_CUP1-1(100); B, células viables por mL de cultivo de las cepas BY_CUP1-1 con y sin CuSO_4 ; C, células totales por mL de las cepas BY4743 y BY_GPD y D, células viables por mL de cultivo de las cepas utilizadas en C. Medidas realizadas con duplicados técnicos y biológicos.

Se alcanzaron niveles de células totales de $3,7 \times 10^7$ y $3,6 \times 10^7$ cél/mL para BY_CUP1-1 sin el agregado de CuSO_4 y BY_CUP1-1 con CuSO_4 a una concentración de 100 μM . La viabilidad celular de estas cepas varió entre el 98-99 % de las células totales, lo que indica que el crecimiento celular no se vio afectado por el agregado de CuSO_4 hasta 100 μM . En lo que refiere al crecimiento de la cepa BY_GPD esta alcanzó niveles de $3,4 \times 10^7$ cél/mL, muy similares a los de la cepa BY4743 sin modificación, que alcanzó una concentración celular de $3,5 \times 10^7$ cél/mL. La viabilidad celular se mantuvo alta, de 98 % con respecto al número de células totales, para ambas cepas.

En lo que refiere a la producción de monoterpenos, al contrario de lo que se esperaba, las cepas modificadas en el cromosoma, resultaron malas productoras, encontrándose bajas concentraciones de linalol, y ausencia de geraniol para todos los casos, tal como se muestra en la figura 20.

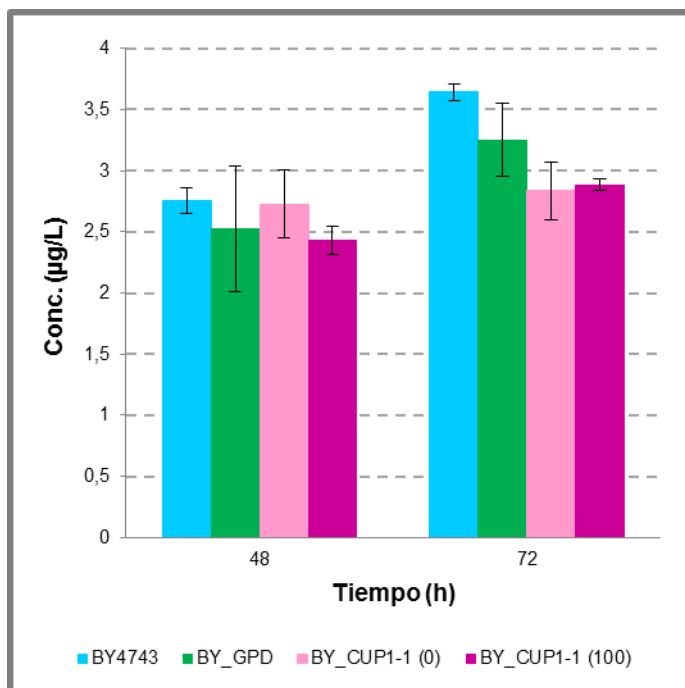


Figura 20. Concentraciones de Linalol obtenidas al sobreexpresar *COQ1* a partir de una modificación a nivel de cromosoma, en un medio Símil Mosto (YAN 206 mg/L). Se muestran las cepas BY4743 (sin modificar), BY_GPD (BY4743 con sustitución del promotor propio de *COQ1* por el promotor constitutivo *GPD*) y BY_CUP1-1 (BY4743 con sustitución del promotor propio de *COQ1* por el promotor fuerte inducible por Cu *CUP1-1*). BY_CUP1-1 (0), sin adición de CuSO_4 . BY_CUP1-1 (100) con concentración final de CuSO_4 de 100 μM . Se realizaron duplicados biológicos y técnicos para cada ensayo.

No se registraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de linalol, para las cepas BY_GPD y BY_CUP1-1, con y sin inducción con cobre, con respecto a la cepa BY4743 sin modificación.

En la figura 21, se muestran las concentraciones obtenidas para los sesquiterpenos nerolidol y farnesol. Tal como se observa, las concentraciones obtenidas de ambos sesquiterpenos, fueron muy inferiores a las obtenidas en los estudios realizados con las cepas transformadas con los distintos plásmidos.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de nerolidol o farnesol para ninguna de las cepas, con respecto a la cepa BY4743 sin modificación.

En virtud de estos resultados, se podría pensar que el aumento en la producción de isoprenoides visto para las cepas transformadas con los distintos juegos de plásmidos, es debido a otra causa desconocida y no a la sobreexpresión de *COQ1*. A su vez, otra posibilidad sería que a pesar de haber confirmado las construcciones en el cromosoma, la proteína Coq1p no se sobreprodujera o no se localizara o plegara correctamente. Por lo tanto, para verificar la existencia de una sobreproducción de la proteína mitocondrial

Coq1p, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot a partir de extractos de proteínas totales y de la fracción mitocondrial, tal como se describe a continuación.

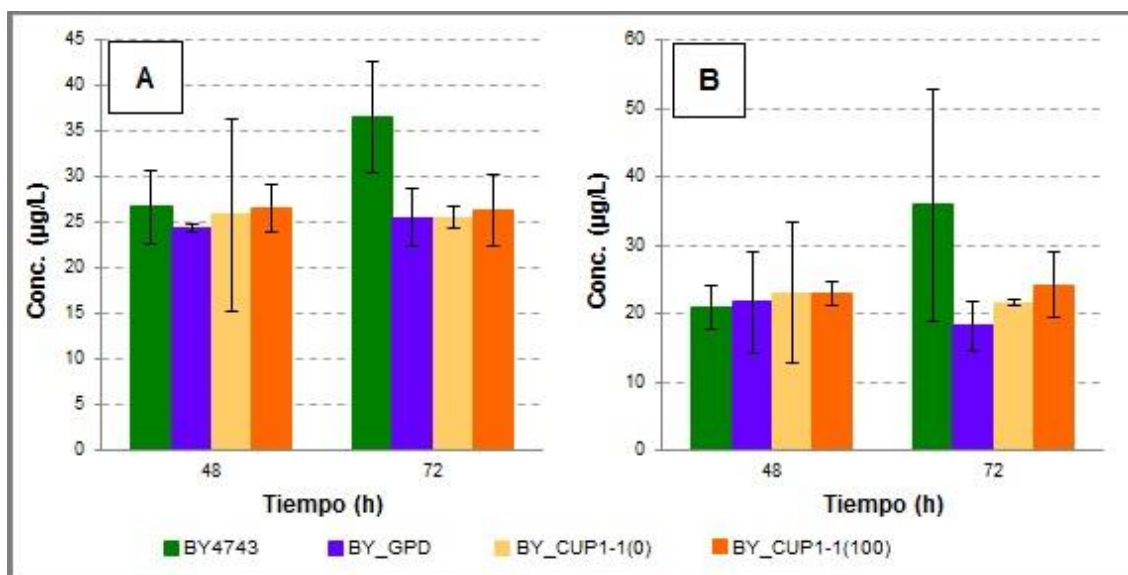


Figura 21. Concentraciones de Nerolidol (A) y Farnesol (B), obtenidos al sobreexpresar *COQ1* a partir de una modificación a nivel de cromosoma, en un medio Símil Mosto (YAN 206 mg/L). Se muestran las cepas BY4743 (sin modificación), BY_GPD (BY4743 con sustitución del promotor propio de *COQ1* por el promotor constitutivo *GPD*) y BY_CUP1-1 (BY4743 con sustitución del promotor propio de *COQ1* por el promotor fuerte inducible por Cu *CUP1-1*). BY_CUP1-1 (0), sin adición de CuSO_4 . BY_CUP1-1 (100) con concentración final de CuSO_4 de 100 μM . Se realizaron duplicados biológicos y técnicos para cada ensayo.

4.3 Análisis de la sobreproducción de la proteína Coq1p en las cepas modificadas en el cromosoma.

Se llevó a cabo la verificación de la sobreproducción de Coq1p, mediante ensayos de revelado inmunológico de proteínas. Esta estrategia permite corroborar si efectivamente, el cambio de promotor del gen *COQ1* en el cromosoma de *S. cerevisiae*, resulta en un aumento en la producción de la proteína Coq1p. También nos permite comprobar, si la proteína de interés, está siendo producida en la mitocondria, tal como es esperado de acuerdo a datos bibliográficos (Gin & Clarke 2005).

4.3.1 Medida de la presencia de Coq1p en extractos totales de células

En una primera instancia, se llevó a cabo el revelado inmunológico de Coq1p, en extractos totales, de lisados celulares. En la figura 22 se muestran foto de la tinción de las proteínas totales con Rojo Ponceau en la membrana de nitrocelulosa luego de la transferencia, y el revelado inmunológico con el anticuerpo antiCoq1p.

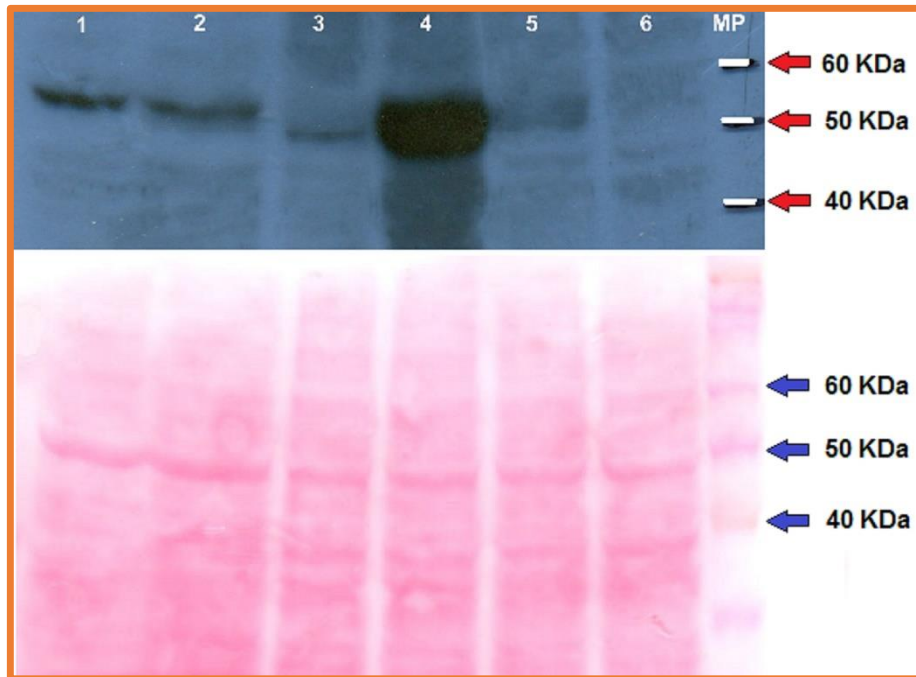


Figura 22. Detección inmunológica de Coq1p, en lisado celular. Arriba, lámina fotográfica del revelado inmunológico o Western Blot; Abajo tinción de proteínas en la membrana de transferencia con Rojo Ponceau. Carriles: 1) 33138pHA1-1, 2) BYpHA1-1, 3) BYpRSQ1-1, 4) BY_GPD, 5) BY4743, 6) 33138 y a la derecha MP, marcador de peso molecular.

Para análisis de la expresión proteica, se utilizó como control negativo a la cepa 33138, que tiene el mismo contexto genético que BY4743, pero con las copias del gen *COQ1* “deletadas”. Como control positivo se utilizó a la cepa BY4743, y como controles del grado de expresión de la proteína se utilizaron BYpHA1-1 (BY4743 sobreexpresando *COQ1* desde un plásmido de alto número de copias y bajo control del promotor fuerte ADH1), BYpRSQ1-1 (BY4743 sobreexpresando *COQ1* desde un plásmido de bajo número de copias y bajo control de su promotor propio) y 33138pHA1-1 (33138 transformada con el plásmido pHA1-1).

A partir de la figura 22, vemos que hubo una buena transferencia de proteínas a la membrana. En cuanto al revelado inmunológico, tal como se esperaba, no se observó la presencia de bandas a la altura de la proteína Coq1p (carril 6). Se conoce de bibliografía, que la proteína Coq1p tiene un tamaño de aproximadamente 52,56 KDa (Ashby & Edwards 1990). En el carril 5, BY4743, expresa una banda tenue, a la altura de los 50 KDa, tal como se esperaba. En el carril 3, se tiene a BY4743, sobreexpresando *COQ1* a partir del plásmido de bajo número de copias pRSQ1-1 y bajo control de su promotor propio. Se obtuvo, como se esperaba, mayor expresión de Coq1p, comparado a BY4743 sin modificación. En los carriles 1 y 2, se tiene a las cepas 33138 y BY4743, transformadas con el plásmido pHA1-1, de alto número de copias, que sobreexpresa *COQ1* bajo el control del promotor ADH1. Es importante destacar que, en este plásmido,

se le ha agregado a *COQ1* un tag N terminal (Gin & Clarke 2005), por lo que es de esperar, que tenga un tamaño levemente superior a Coq1p sin tag. Si observamos el carril 1, correspondiente a 33138pHA1-1, vemos que se obtuvo una banda fuerte, de un tamaño levemente superior al de BY4743 y BYpRSQ1-1. Lo mismo sucede en el carril 2, con BYpHA1-1, con la diferencia que en este caso, BYpHA1-1, no sólo expresa Coq1p a partir del plásmido, sino que, dado que *COQ1* no ha sido “deletado” de su genoma (a diferencia de 33138), se obtiene también una banda tenue, a la misma altura que en los carriles 3 y 5, correspondiente a la presencia de Coq1p sin el tag. En el carril 4, se tiene a la cepa modificada en el cromosoma BY_GPD, obteniéndose una muy alta expresión de Coq1p.

Teniendo en cuenta este resultado, y los resultados del ítem 4.2, podría pensarse que la sobreexpresión de *COQ1* no afectaría la producción de isoprenoides. Sin embargo, este ensayo no nos aporta la información acerca de la localización subcelular de Coq1p. Ésta podría estar localizándose en otro compartimento subcelular, y por tanto, no estaríamos apreciando el resultado deseado. Por lo tanto, fue necesario, un análisis de la expresión proteica a nivel subcelular, en la fracción mitocondrial, donde se sabe por bibliografía, que se localiza la proteína Coq1p.

4.3.2 Medida de la presencia de Coq1p en extractos mitocondriales

Se llevó a cabo la extracción y purificación de mitocondrias, como forma de evaluar la expresión de Coq1p en estos extractos. A continuación en la figura 23, se presentan los resultados obtenidos en fracciones mitocondriales.

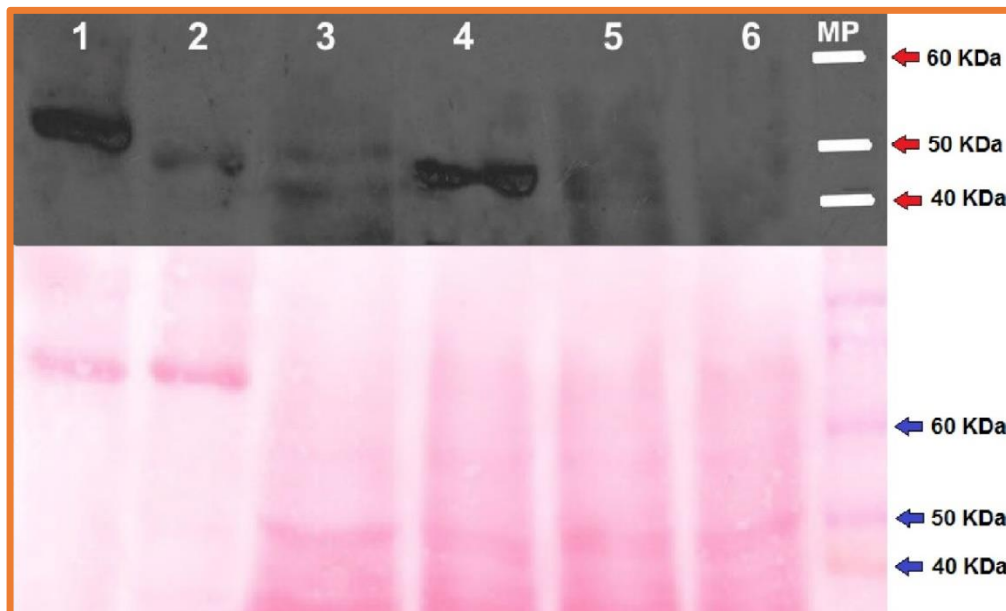


Figura 23. Detección inmunológica de Coq1p, en extracto mitocondrial. Arriba, lámina fotográfica del revelado inmunológico o Western Blot; Abajo tinción de proteínas en la membrana de transferencia con Rojo Ponceau. Carriles: 1) Extracto mitocondrial de BYpHA1-1, 2) Extracto mitocondrial de BY_GPD, 3) Lisado celular de BYpHA1-1, 4) Lisado celular de BY_GPD, 5) Lisado celular de BY4743, 6) Lisado celular de 33138 y a la derecha MP, marcador de peso molecular.

Se observa a partir de la figura 23, que hubo una buena transferencia de proteínas. Arriba en la lámina fotográfica de detección inmunológica, se tiene en los carriles 3, 4, 5 y 6 lisados celulares de BYpHA1-1, BY_GPD, BY4743 y 33138 respectivamente. Nuevamente se utilizaron 33138 como control negativo, BY4743 como control positivo, y BYpHA1-1 y BY_GPD a modo de poder comparar con los datos obtenidos de los extractos mitocondriales para las mismas cepas, observándose en estos carriles, los mismos patrones de expresión que en la figura 22. En los carriles 1 y 2 se tienen los extractos mitocondriales de BYpHA1-1 y BY_GPD respectivamente. Se obtuvo una alta expresión de Coq1p en el extracto mitocondrial de BYpHA1-1, tal como se esperaba dado lo reportado en (Gin & Clarke 2005). En cambio, la expresión de Coq1p en el extracto mitocondrial de BY_GPD, fue muy inferior al obtenido a partir del extracto proteico total obtenido del lisado celular. Esto, estaría indicando, que si bien mediante la modificación a nivel del cromosoma se logró obtener una sobreproducción de Coq1p, ésta no se estaría localizando en la mitocondria. Por lo tanto, Coq1p, no podría estar llevando a cabo su rol en la síntesis de isoprenoides, tal como fuera sugerido en Carrau et al. 2005. Esto podría explicar los bajos niveles de isoprenoides obtenidos en el ítem 4.2.

Una muy alta producción de la proteína Coq1p, tal como se observa en la figura 22, podría sobrepasar la capacidad celular de plegar y translocar correctamente la proteína

a la membrana mitocondrial interna, tal como se reporta en algunos trabajos en los que se sobreproducen altas concentraciones de proteínas asociadas a membranas (Griffith et al. 2003; Freigassner et al. 2009). Para minimizar este problema, se podrían utilizar estrategias tales como la utilización de promotores más débiles, inducir la producción proteica una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento celular, así como también sería posible generar condiciones que enlentezcan el metabolismo, como disminuir la temperatura y agitación del cultivo para favorecer el plegado de la proteína.

Considerando que con el reemplazo de promotor a nivel del cromosoma no se logró una correcta localización de Coq1p en la mitocondria, se decidió continuar trabajando con los plásmidos de alto número de copias.

4.4 Evaluación del crecimiento y producción de isoprenoides en *S. cerevisiae* en diferentes condiciones de cultivo.

Se llevaron a cabo estudios en diferentes medios de cultivo, con el propósito de optimizar las condiciones de crecimiento y producción de isoprenoides. También se quiso evaluar el rol de la composición del medio así como la presencia de un plásmido *per se* en la producción de isoprenoides.

Los medios de cultivo utilizados fueron el medio Símil Mosto con 206 mg/L de YAN, el medio mínimo YNB suplementado con las concentraciones de His, Ura y Leu utilizadas por Fischer et al. 2011 de 50 µg/mL cada uno y el mismo medio YNB, pero suplementado con altas concentraciones de estos tres requerimientos nutricionales (125, 150 y 500 µg/mL para His, Ura y Leu respectivamente), tal como lo describe Pronk, 2002. En el trabajo de Pronk, 2002, se analiza el efecto de plásmidos con diferentes marcadores de selección sobre la fisiología de *S. cerevisiae*. Se concluye que el marcador *LEU* es el que tiene mayor efecto de estrés celular. También en este trabajo se muestra que es preciso agregar mayor concentración de suplementos nutricionales al medio de cultivo de una cepa auxótrofa para poder equiparar las concentraciones que provee un plásmido de alto número de copias.

Se decidió trabajar con la cepa BY4743, y BY4743 transformada con el plásmido vacío de alto número de copias pADCL (BYpADCL), como forma de evaluar si la sola presencia del plásmido afecta la producción de isoprenoides.

Se cuantificaron los monoterpenos linalol y geraniol, y los sesquiterpenos nerolidol y farnesol, al igual que en los puntos anteriores. Además se cuantificó la producción de alcohol isoamílico, ya que la leucina es su precursor metabólico.

En la figura 24, se presentan los perfiles de crecimiento y de viabilidad celular de BY4743 y BYpADCL en los distintos medios de cultivo mencionados anteriormente.

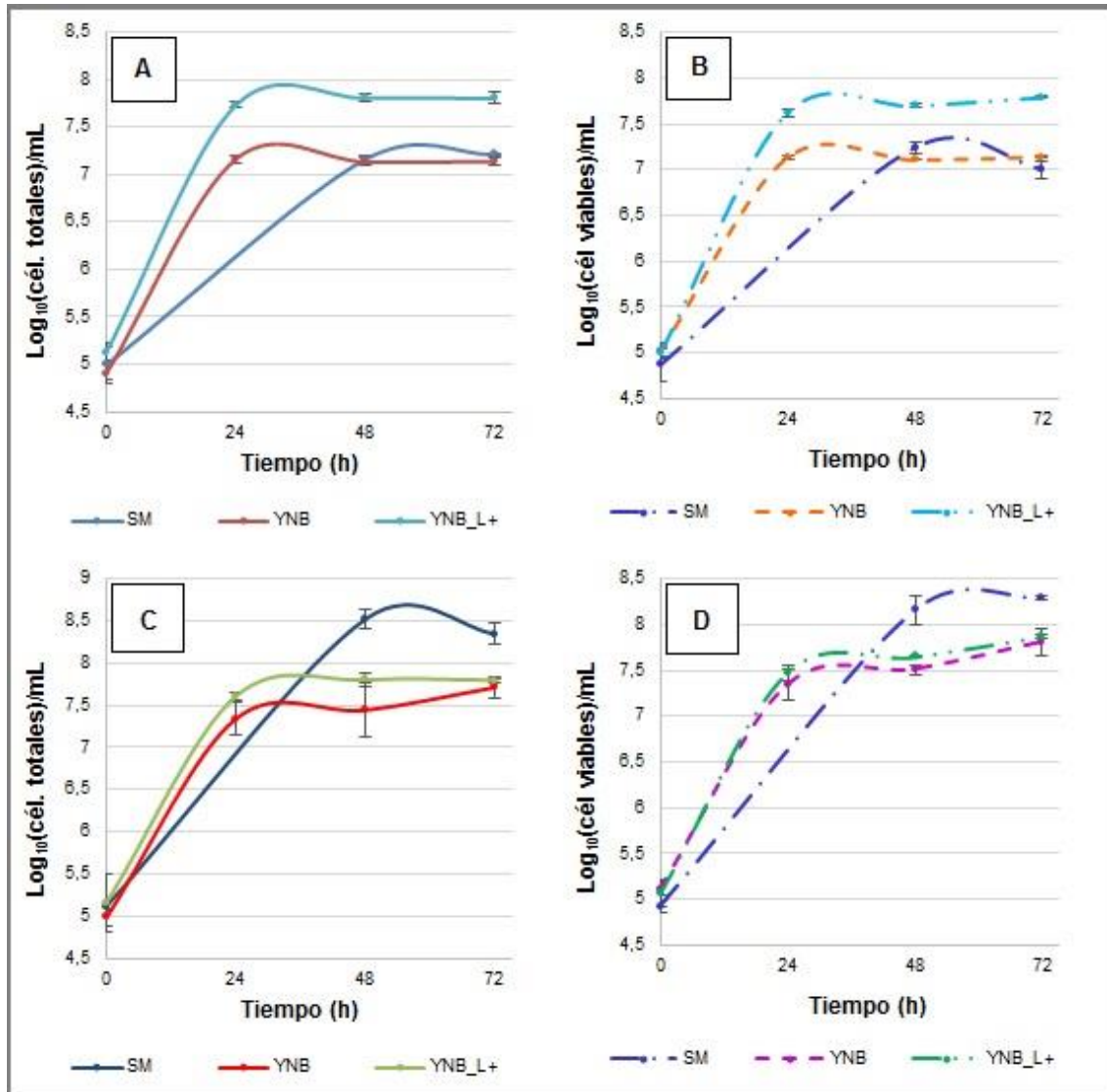


Figura 24. Perfil de crecimiento celular de la cepa BY4743 sin modificación y la misma cepa transformada con el plásmido de alto número de copias vacío, pADCL (BYpADCL), en distintos medios: Símil Mosto con 206 mg/L de YAN (SM), Medio mínimo YNB (YNB), medio mínimo YNB con mayor conc. de Ura, His y Leu (YNB_L+) : A, células totales por mL de la cepa BY4743 en los distintos medios de cultivo; B, células viables por mL de BY4743 para los mismos medios; C, células totales por mL de la cepa BYpADCL en los distintos medios de cultivo y D, células viables por mL de cultivo de la cepa BYpADCL en los mismos medios. Medidas realizadas por duplicado.

En lo que refiere al crecimiento celular, se alcanzaron niveles de 1.4×10^7 , 6.4×10^7 y 1.6×10^7 cél/mL en los medios YNB, YNB_L+ y Símil Mosto respectivamente para la cepa

BY4743. La viabilidad celular se mantuvo alta para todos los medios, variando de 97-99 % de las células totales. En lo que refiere a la cepa BYpADCL, se alcanzaron niveles de 5.3×10^7 , 6.3×10^7 y 2.3×10^7 células totales por mL de cultivo para los medios YNB, YNB_L+ y Símil Mosto respectivamente. Al igual que para la cepa BY4743, la cepa BYpADCL tuvo una muy alta viabilidad en los tres medios, variando entre 98-99 % con respecto al número total de células. Según lo que se observa en la figura 24, ninguno de los medios afecta negativamente la viabilidad celular o crecimiento de las cepas de estudio. Sin embargo, parecería que mayores concentraciones de His, Ura y Leu favorecerían el crecimiento, ya que en el medio YNB_L+ fue donde se alcanzó una mayor concentración celular.

En estos experimentos se prepararon los pre-inóculos con presión de selección para el mantenimiento del plásmido pero el ensayo se realizó en las mismas condiciones, o sea, sin presión de selección. Por lo tanto, se determinó cual había sido la pérdida de plásmido durante el cultivo. A lo largo de 72 horas las pérdidas de plásmido fueron de 6 %, 10 % y 12.5 % para los medios YNB, YNB_L+ y Símil Mosto respectivamente

En la tabla 11, se presentan los resultados obtenidos para la determinación de los compuestos de interés.

Tabla 11. Concentraciones máximas de monoterpenos ($\mu\text{g/L}$), sesquiterpenos ($\mu\text{g/mL}$) y alcohol isoamílico (mg/L) obtenidas en distintos medios por las cepas BY4743 y BYpADCL.

	Símil Mosto (SM)		YNB		YNB_L+	
	BY4743	BYpADCL	BY4743	BYpADCL	BY4743	BYpADCL
Linalol ($\mu\text{g/L}$)	2.7 ± 0.2	22.2 ± 1.4	1.94 ± 0.08	3.17 ± 0.04	3.4 ± 0.2	3.11 ± 0.26
Geraniol ($\mu\text{g/L}$)	-	0.69 ± 0.03	-	-	-	-
Nerolidol ($\mu\text{g/L}$)	51.3 ± 1.3	316.8 ± 63.2	26.2 ± 3.7	33.5 ± 0.3	27.7 ± 0.8	32 ± 8
Farnesol ($\mu\text{g/L}$)	21 ± 1	196 ± 30	14 ± 3	12.8 ± 0.5	7.4 ± 0.2	7.62 ± 0.28
Alcohol isomílico (mg/L)	2.5 ± 0.2	23.5 ± 5.3	6.5 ± 0.5	10.0 ± 0.2	81 ± 19	72.1 ± 8.8

Se obtuvo una máxima producción de linalol a las 72 horas para la cepa BYpADCL en medio Símil Mosto. Las diferencias en la concentración de linalol entre BY4743 y BYpADCL, fueron estadísticamente significativas, excepto en el medio YNB_L+. En cuanto a la comparación entre los distintos medios, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre BYpADCL en Símil Mosto y los dos medios YNB, no habiendo diferencias entre estos dos últimos. No se detectó presencia de geraniol,

excepto para BYpADCL en medio Símil Mosto, siendo esta a su vez, muy baja. En lo que refiere a la producción de nerolidol, excepto en Símil Mosto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre BY4743 y BYpADCL. En la comparación de producción de nerolidol entre los diferentes medios, nuevamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el Símil Mosto y los dos medios YNB, no habiendo diferencias entre estos dos últimos. Para la producción de farnesol, las diferencias sólo fueron significativas para BY4743 y BYpADCL en medio Símil Mosto. Tal como se esperaba, la producción de alcohol isoamílico fue máxima en el medio YNB_L+. Sin embargo, en lo que refiere a la diferencia de producción entre BY4743 y BYpADCL, no hubo diferencias estadísticamente significativas en este medio, pero si las hubo en los medios Símil Mosto e YNB.

A partir de estos resultados, se puede ver que el aumento en la producción de isoprenoides en BYpADCL con respecto a BY4743 estaría asociado en la mayoría de los casos, al medio Símil Mosto, no detectándose diferencias significativas entre BY4743 y BYpADCL en los medios YNB o YNB_L+ para la mayoría de los casos. También se observó que la producción de isoprenoides es máxima en el medio Símil Mosto. La producción de alcohol isoamílico fue de hasta 32 veces superior en el medio YNB_L+ comparado a los otros medios, lo que concuerda a lo esperado, ya que este medio tiene altas concentraciones de Leucina, precursor metabólico del alcohol isoamílico.

Se ha visto que condiciones de estrés, como puede ser el cultivo en muy altas concentraciones de azúcar, como en el caso del medio Símil Mosto, así como también la presencia de un plásmido, generan grandes cambios fisiológicos en la levadura. En lo que refiere a la presencia de un plásmido, se ha visto que, desde un punto de vista de la fisiología de *S. cerevisiae*, el comportamiento frente al agregado del suplemento nutricional requerido por una auxotrofia con respecto a la complementación genética mediante un plásmido que contiene el gen biosintético en cuestión, pueden ser muy diferentes. Es por esta razón que Pronk, 2002, propone el agregado de concentraciones mayores de suplementos nutricionales para cepas auxótrofas. Con respecto a los medios de cultivo con altas concentraciones de azúcares, algunas investigaciones apuntan a que esto activa la expresión, no sólo de los genes que regulan el estrés osmótico, sino también la de los genes involucrados en la respiración celular entre otros (Jiménez Martí 2010; Kuranda 2006). También se ha visto, que la producción de algunos sesquiterpenos, como el caso del farnesol, aumentan en células de *Candida albicans*, bajo condiciones de estrés oxidativo (Deveau et al. 2010). Por lo tanto, dado los resultados obtenidos en la tabla 11, podría sugerirse que el aumento en la producción de isoprenoides en el medio de alto contenido de azúcares Símil Mosto, respecto a los

medios simples YNB e YNB_L+, se debe principalmente a una respuesta al estrés osmótico, así como también metabólico por la presencia del plásmido.

4.5 Producción de isoprenoides al sobreexpresar el gen COQ1 clonado en plásmidos en distintos contextos genéticos.

Se analizó la producción de isoprenoides bajo el efecto de la sobreexpresión del gen *COQ1*, en distintos contextos genéticos. Para este ensayo, se trabajó nuevamente con las cepas BY4743, BYpADCL y BYpHA1-1, incluyéndose esta vez a las cepas mutantes en *erg20*, K197K, K197E y K197G (Fischer et al. 2011). Tal como fue descrito previamente en la introducción, mutaciones puntuales sobre el gen *ERG20*, conllevan al cambio de una lisina (K), en la posición 197 en el sitio catalítico de la enzima FPPS, por un ácido glutámico (E) y una glicina (G) en las cepas K197E y K197G, respectivamente. La lisina 197 (K197), se encuentra rodeada de dos motivos ricos en ácido aspártico, y tiene un rol importante en la coordinación de los iones Mg^{2+} , involucrados en la reacción de condensación de IPP con sus sustratos alílicos. La sustitución de este aminoácido disminuye la afinidad de GPP por el sitio catalítico, permitiendo que este sea liberado al medio, como precursor de monoterpenos. Por lo tanto, se espera que estas cepas sean mejores productoras de monoterpenos.

Se llevó a cabo en una primera instancia, el cultivo de las cepas K197K, K197E y K197G, en el mismo medio (YNB) y condiciones propuestos por Fischer et al. 2011, a modo de evaluar el desarrollo de estas cepas en cultivo líquido en matraces y su producción de isoprenoides. Tal como se muestra en la figura 25, las tres cepas tuvieron un buen desarrollo celular, alcanzando niveles de 1.4×10^7 , 2.8×10^7 y 1.7×10^7 cél/mL para K197K, K197E y K197G respectivamente. En lo que refiere a la viabilidad celular, ésta varió entre 71 y 96 % de las células totales.

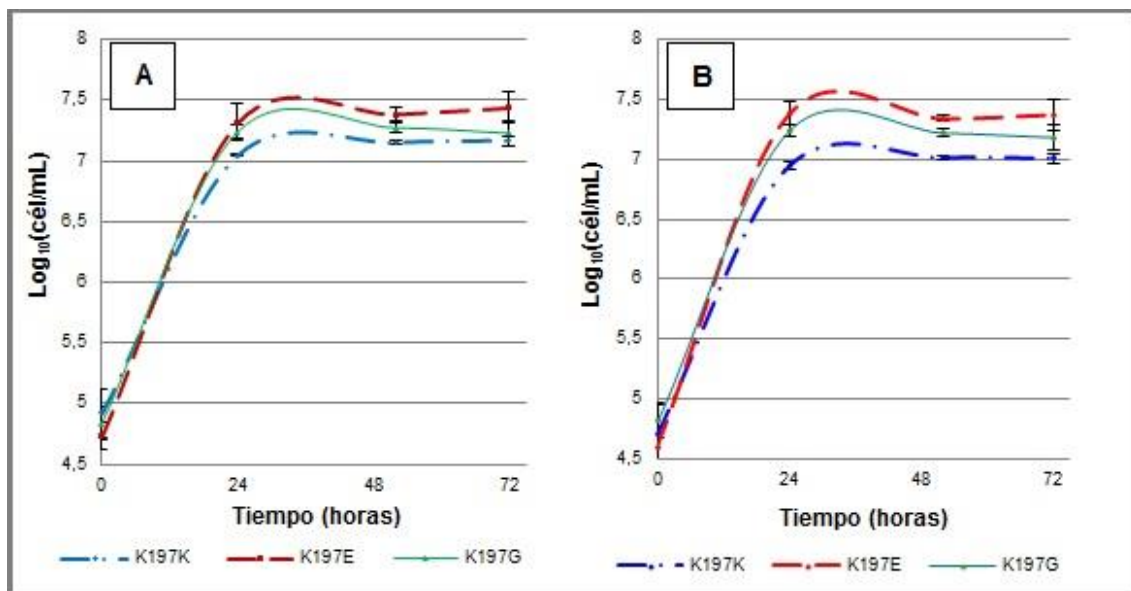


Figura 25. Perfil de crecimiento celular de cepas mutantes en *erg20*, en medio YNB: A, células totales por mL y B, células viables por mL de cultivo. Medidas realizadas por duplicado.

Las cepas mutantes en *erg20* no resultaron buenas productoras de sesquiterpenos, variando su producción de nerolidol entre 15.9 ± 1.4 y 25.8 ± 1.8 $\mu\text{g/mL}$ y la de farnesol entre 4.4 ± 0.5 y 6.0 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$. La máxima producción de linalol se obtuvo a las 72 horas de cultivo por la cepa K197G, siendo esta de 235.8 ± 4.7 $\mu\text{g/mL}$, lo que coincide con lo reportado por Fischer et al. 2011. En cuanto a la producción de geraniol, el comportamiento fue diferente a lo esperado, ya que resultó mejor productora la cepa K197E con 258.4 ± 8.2 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas, contra 176.4 ± 7.8 $\mu\text{g/mL}$ producidos por la cepa K197G. Los datos reportados por Fischer et al. 2011, para la producción de geraniol son de 121 ± 9 $\mu\text{g/mL}$ y 235 ± 22 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas K197E y K197G respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a que en este caso los cultivos no se extendieron más allá de las 72 horas, a diferencia del trabajo de referencia, en el cual los cultivos se extendieron por períodos de 7-10 días. En las experiencias obtenidas en este trabajo, se observó, que el contenido en isoprenoides tiende a disminuir pasadas las 72 horas de cultivo.

Dado que la cepa K197E, resultó mejor productora de geraniol se optó por realizar el estudio con la sobreexpresión de *COQ1* en las cepas K197E y la cepa control K197K. Visto que la máxima producción de isoprenoides se obtuvo en aquellas cepas transformadas con los plásmidos de alto número de copias, las cepas K197K y K197E fueron transformadas con los plásmidos pADCL y pHA1-1.

En la figura 26, se muestra el perfil del crecimiento celular para las cepas K197K (KK), K197KpADCL (KKpADCL), K197KpHA1-1 (KKpHA1-1), K197E (KE), K197EpADCL (KEpADCL) y K197EpHA1-1 (KEpHA1-1).

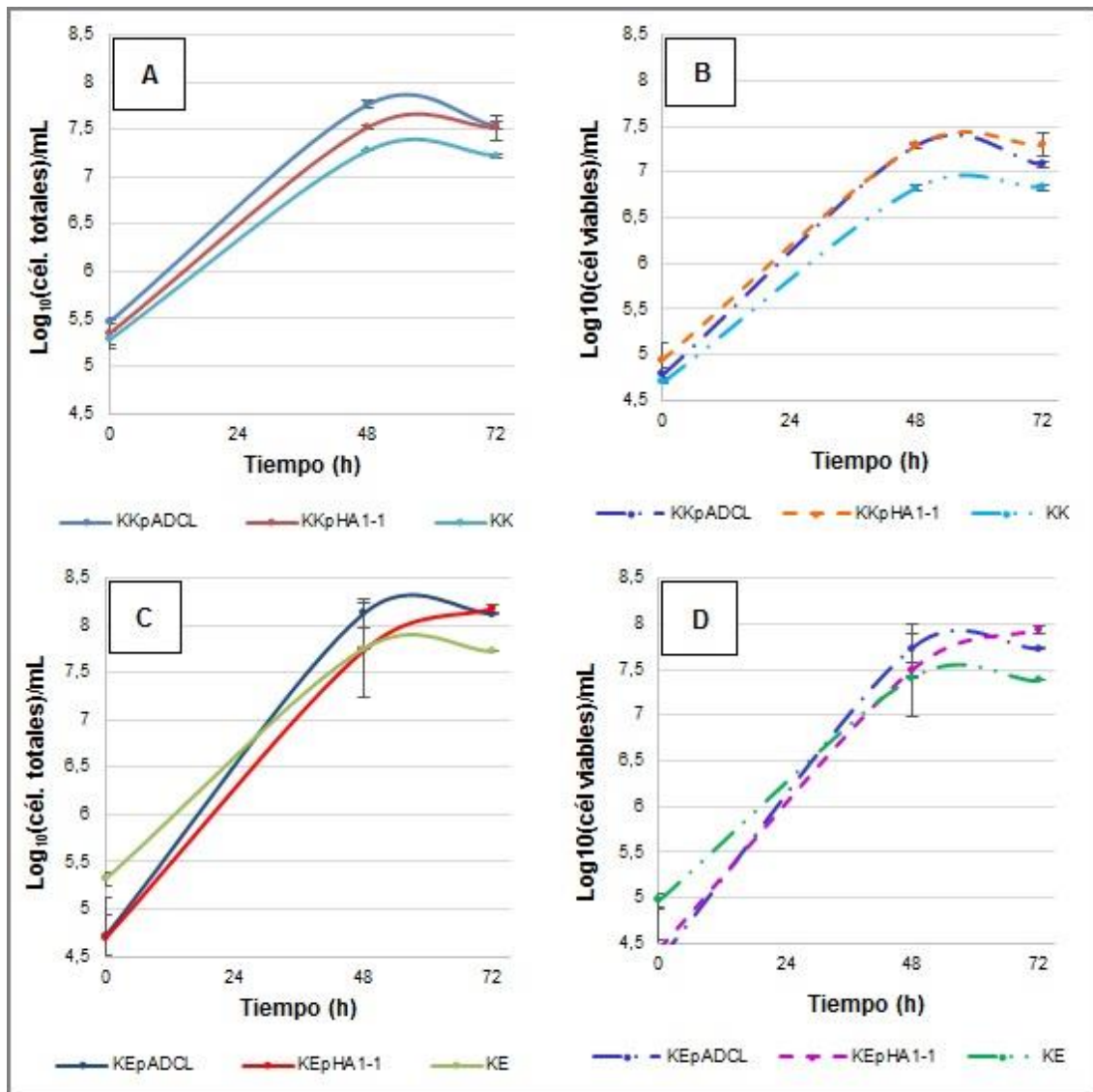


Figura 26. Perfil de crecimiento celular expresado de cepas mutantes en *erg20*, transformadas con plásmidos de alto número de copias, en medio Símil Mosto de 206 mg/L de YAN: A, células totales por mL de las cepas K197K con y sin plásmidos; B, células viables por mL de cultivo de las cepas K197K con y sin plásmidos; C, células totales por mL de las cepas K197E con y sin plásmidos y D, células viables por mL de cultivo de las cepas K197E con y sin plásmidos. Medidas realizadas por duplicado.

El número total de células/mL alcanzadas por KK, KKpADCL y KKpHA1-1 fue de 1.7×10^7 , 3.5×10^7 y 3.4×10^7 cél/mL respectivamente. La viabilidad celular se mantuvo alta durante las 72 horas, variando desde el 94 al 97 % de las células totales. En el caso de la serie KE, los valores máximos de células/mL fueron de 5.7×10^7 , 1.4×10^8 y 1.5×10^8 cél/mL para las cepas KE, KEpADCL y KEpHA1-1 respectivamente, con una viabilidad celular que varió desde el 95 al 97 % de las células totales.

Como se trabajó con un medio sin presión de selección, se comprobó que la pérdida de plásmido a lo largo de 72 horas fue baja, ésta varió entre 10-20 % para las cepas de

la serie K197K, entre un 7-10 % para las cepas de la serie K197E y entre un 8.5-15 % para las cepas de la serie BY4743.

A continuación en la figura 27, se muestran las concentraciones de linalol y geraniol a las 48 y 72 horas, comparándose los resultados de la serie de cepas BY4743, K197K y K197E en presencia de plásmidos de alto número de copias, en un medio Símil Mosto 206 mg/L de YAN. Tal como se observa, la producción de linalol, es significativamente superior en la serie de cepas K197K y K197E con respecto a la serie de cepas BY4743. Este es un resultado esperable, ya que por la bibliografía se conoce que las cepas mutantes en *erg20*, son buenas productoras de monoterpenos. La presencia del plásmido, aumenta la producción de linalol entre un 70 y un 73 % para las cepas KEpHA1-1 y KKpHA1-1 respectivamente, comparado a sus respectivas cepas sin plásmido K197E y K197K. Si bien a simple vista podría pensarse que si existe una tendencia a aumentar la producción por las cepas sobreexpresantes de *COQ1* mediante el plásmido pHA1-1, no podemos afirmar esta observación, ya que las diferencias entre las cepas con el plásmido vacío y las cepas con pHA1-1 son significativas para ambas cepas únicamente a las 72 horas. La cepa KEpHA1-1 produjo 761 µg/L de linalol, estos niveles son aproximadamente 10 veces superior al valor reportado por Fischer et al. 2011, así como también a los reportados por Rico Molins 2015 y Herrero et al. 2008 en los cuales las levaduras fueron transformadas con una Linalol sintasa de plantas (*C. breweri*), ver tabla 12. En cuanto a la producción de geraniol, esta fue significativamente superior a la obtenida con la serie BY4743 (100 veces superior en el caso de KEpHA1-1). Sin embargo, los valores obtenidos fueron aproximadamente un 50 % menores a los reportados por Fischer et al. 2011 en un medio mínimo YNB. Ésto puede deberse a que el GPP, precursor tanto del geraniol como linalol, fuese mayormente desviado hacia la síntesis de linalol, o a algún proceso inhibitorio provocado por algún componente del medio Símil Mosto.

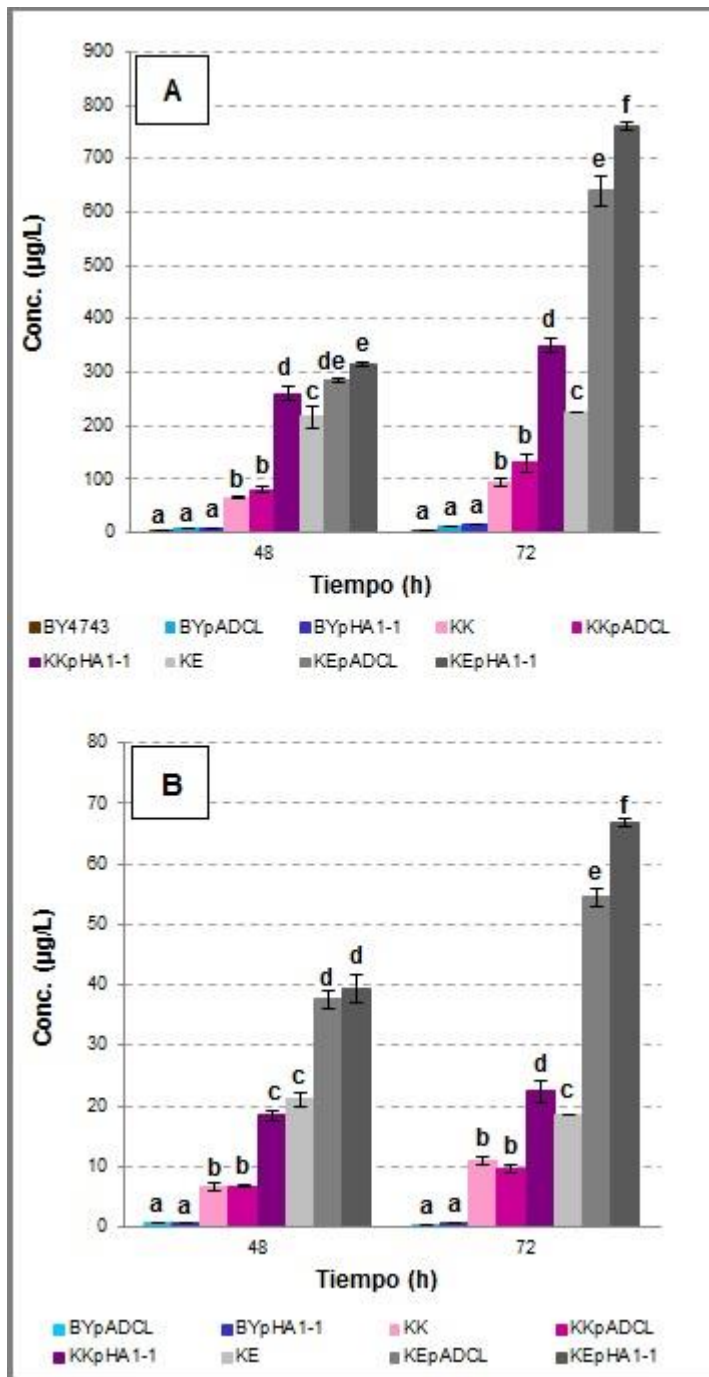
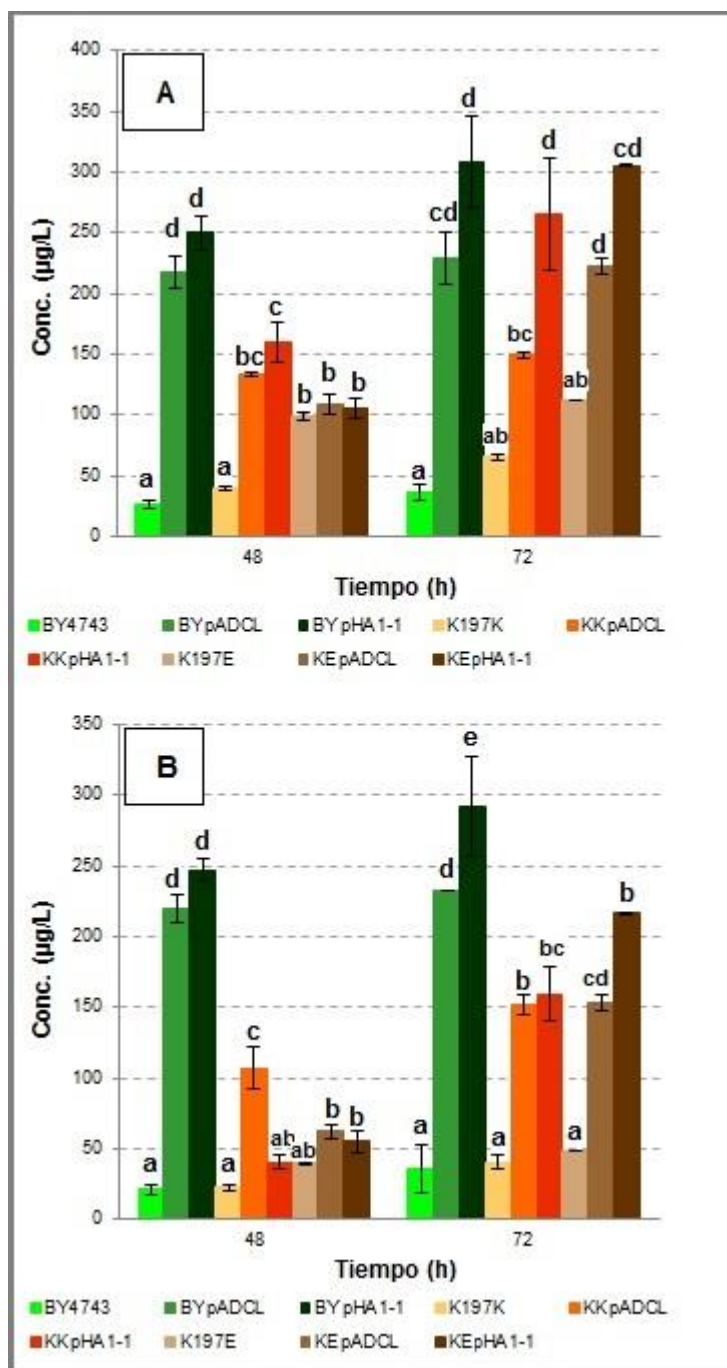


Figura 27. Concentraciones de Linalol (A) y Geraniol (B), obtenidos al sobreexpresar COQ1 con plásmidos de alto número de copias, en distintos contextos genéticos, en un medio Símil Mosto de YAN 206 mg/L. Sobre las barras se indican con las letras a, b, c, d, e y f la significancia estadística de los datos, letras diferentes, implica que las diferencias entre esos tratamientos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Fueron realizados replicas biológicas y técnicas para cada ensayo.

Se muestran en la figura 28, los valores obtenidos de nerolidol y farnesol expresados en µg/L, para la serie de cepas BY4743, K197K y K197E, en medio Símil Mosto, YAN 206 mg/L. En lo que refiere a la producción de nerolidol en la serie K197K, se observa que la incorporación de un plásmido que sobreexpresa COQ1 así como la de un plásmido vacío, aumentan la producción un 75 y un 56 % respectivamente, con respecto a la cepa sin transformar. Mientras que en la serie K197E, la presencia del plásmido vacío (pADCL) aumenta la producción en un 50 %, y la presencia de pHA1-1, la aumenta un 63 %, con respecto a K197E sin plásmido. La incorporación de un plásmido en las cepas mutantes en *erg20*, equipara la producción de nerolidol, a los valores de este

compuesto obtenidos con la serie BY4743, transformada con los mismos plásmidos y duplica a valores de bibliografía (Ohto et al. 2009), expuestos en tabla 12.



En lo que refiere a la producción de farnesol, si bien la incorporación de los plásmidos pADCL y pHA1-1 a las cepas K197K y K197E, aumentó su nivel significativamente comparado a las mismas cepas sin plásmido (hasta un 78 % en el caso de KEpHA1-1), estos fueron un tanto inferiores a los obtenidos por la serie BY4743 transformada con los mismos plásmidos y de 6 a 38 veces menores a datos de

bibliografía para levaduras mutantes en *erg9* (Chambon et al. 1990) y levaduras sobreexpresantes de *HMG-CoA* reductasa (Ohto et al. 2009), respectivamente.

En lo que refiere al efecto de la sobreexpresión de COQ1, se observa un efecto de incremento en la producción de ambos sesquiterpenos, aunque no en todos los casos estadísticamente significativos.

Tabla 12. Concentración de linalol, geraniol, nerolidol y farnesol expresado en µg/L, en medios sintéticos. Datos obtenidos de bibliografía y el presente trabajo.

Referencia	Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Características	Medio de cultivo	Linalol (µg/L)	Geraniol (µg/L)	Nerolidol (µg/L)	Farnesol (µg/L)
(Carrau et al. 2005)	Montrachet 522	wt	Simil Mosto de uva	1,5	NR	0,65	2,0
(Ohto et al. 2009)	ATCC 200589	<i>Sobreexpresión: ERG20 HMG-CoA reduct.</i>	Galactosa 5%, YNB, aceite de soja 1%, adekanol 0,1%	NR	NR	-	80
	ATCC 90713 ATCC 90840	<i>HMG-CoA reduct. HMG-CoA reduct.</i>				150	8200
(Chambon et al. 1990)	FKerg9 VL134 VL135	Mut: <i>Erg9</i> <i>Erg7</i>	YPD	NR	- 450 ± 55 -	NR	1310 ± 380 220 ± 25 20 ± 4
	YR377 YR378	<i>Sobreexpresión: Gen GES de Ocimum basilicum</i>	YPD	9,65 ± 1,60 8,89 ± 1,49	7550 ± 1436 7697 ± 2342	NR	NR
(Rico Molins 2015)	T ₇₃ -4Lis	<i>Gen LIS de C. breweri</i>		60,94 ± 6,15	-		
(Herrero et al. 2008)	YR64	<i>Sobreexpresión: Gen LIS de C. breweri</i>	YPD	77	NR	NR	NR
(Fischer et al. 2011)	K197K K197E K197G	Mut: FPPS	YNB	2 ± 3 78 ± 57 232 ± 8	10 ± 3 121 ± 9 235 ± 22	NR	NR
<i>Este trabajo</i>	BY4743 BYpADCL BYpHA1-1 BYpRS BYpRSQ1-1	BY4743 transformada con plásmidos: pADCL, pHA1-1, pRS y pRSQ1-1	Simil Mosto	3,94 ± 0,06 13,9 ± 1,8 15,6 ± 3,8 6,0 ± 0,4 6,6 ± 0,1	- 1,3 ± 0,1 0,67 ± 0,01 0,63 ± 0,01 0,66 ± 0,06	36,5 ± 6,1 229 ± 22 307,5 ± 38 112 ± 11 125,4 ± 3,8	36 ± 17 232,8 ± 0,2 292,2 ± 35,2 121 ± 2 139,4 ± 3,5
	K197K KKpADCL KKpHA1-1	K197K transformada con plásmidos: pADCL y pHA1-1,	Simil Mosto	93,6 ± 6,3 350 ± 12 130,7 ± 16,6	11,0 ± 0,7 22,4 ± 1,8 9,6 ± 0,5	65,3 ± 2,7 149,3 ± 1,7 265 ± 46	40,4 ± 4,8 151,7 ± 6,8 159,5 ± 18,6
	K197E KEpADCL KEpHA1-1	K197E transformada con plásmidos: pADCL y pHA1-1,	Simil Mosto	226,31 ± 0,01 639,2 ± 29,8 761,3 ± 8,5	21,11 ± 1,25 54,5 ± 1,5 66,8 ± 0,6	111,68 ± 0,01 223,1 ± 6,6 305,6 ± 0,7	48,56 ± 0,01 153,0 ± 5,5 216,5 ± 0,8

4.6 Producción de alcoholes superiores en cepas que sobreexpresan Coq1p.

Se realizaron ensayos preliminares para analizar el efecto de la sobreexpresión de COQ1 en la producción de alcoholes superiores. Estos ensayos se llevaron a cabo sobre las cepas BY4743 y K197E transformadas con los plásmidos de alto número de copias pADCL (vacío) y pHA1-1 (con COQ1) en un medio Símil Mosto con un YAN de 75 mg/L, ya que se conoce mediante datos bibliográficos, que valores bajos de nitrógeno asimilable, favorecen la producción de alcoholes superiores (Carrau et al. 2008).

El seguimiento de las fermentaciones, se hizo calculando la pérdida de CO₂, producto de la respiración celular, mediante el pesado de los matraces. Las corridas se continuaron hasta fin de fermentación, es decir hasta que la producción de CO₂ es mínima. En el caso de la cepa K197E, se realizaron dos ensayos de fermentación paralelos, uno que se continuó hasta fin de fermentación (22 días), y otro que fue finalizado a la mitad de este período. La finalidad de estas dos pruebas, fue la de evaluar, si para la producción de alcoholes superiores, el continuar el ensayo hasta el fin de fermentación resultaba en un aumento significativo de los alcoholes, o si ya a los 11 días se alcanzaba una meseta en la producción. A continuación en la figura 29, se presentan los perfiles de producción de CO₂.

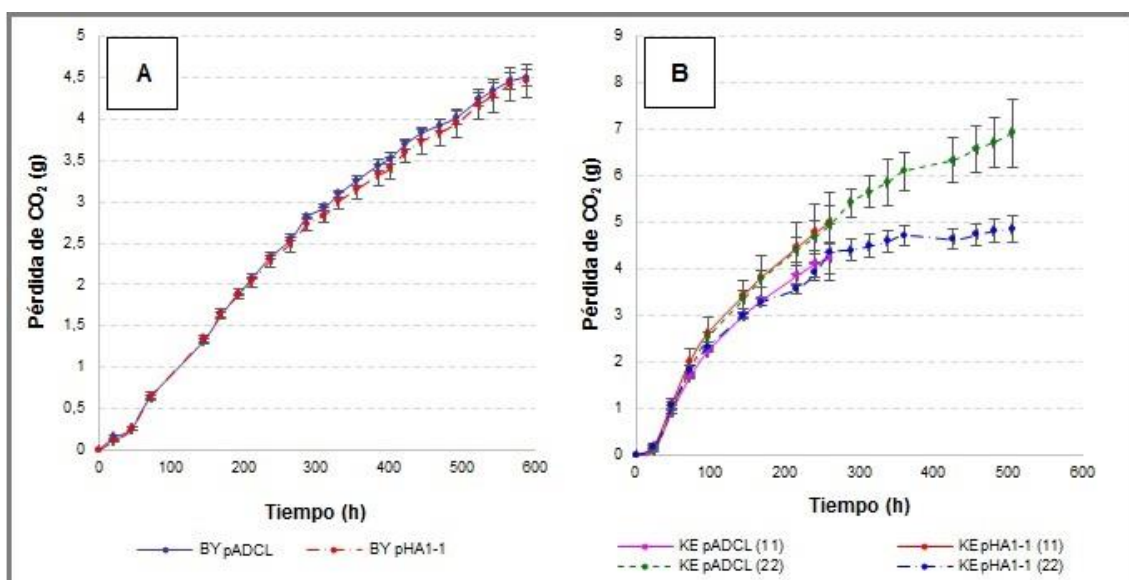


Figura 29. Perfil de producción de CO₂ para las cepas BYpADCL y BYpHA1-1 (A) y las cepas KEpADCL y KEpHA1-1 hasta los 11 y 22 días de fermentación (B), en medio Símil Mosto con 75 mg/L de YAN. Medidas realizadas al menos por duplicado.

Tal como se observa en la figura 29, la fermentación fue más rápida para la serie K197E comparado a la serie BY4743, alcanzando el estado estacionario aproximadamente a mitad de la corrida (300 horas). A su vez, se constató que la cepa KEpADCL alcanzó una producción de CO₂ de 6.9 g, comparados a 4.5 g producidos por

BYpADCL para un mismo período de tiempo. En lo que refiere a la pérdida de plásmido, esta fue baja, variando entre un 12 y 17 % para la serie BY4743 y entre un 8 y 12 % para la serie K197E.

En las figuras 30 y 31, se muestran las concentraciones de 1-propanol, 2-meil-1-propanol, (2+3)-metil-1-butanol y alcohol β -feniletílico en mg/L de cultivo, siendo estos los alcoholes más representativos en todas las corridas.

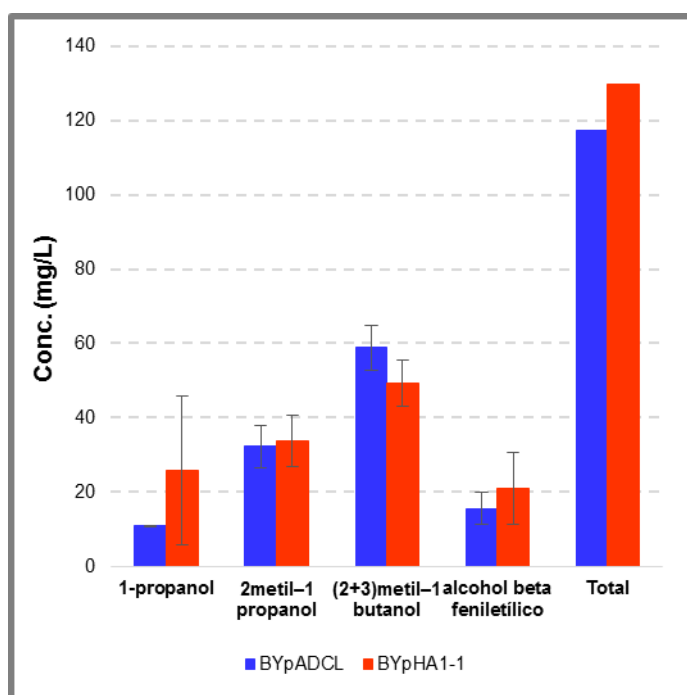


Figura 30. Concentraciones de los alcoholes superiores: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, (2+3)-metil-1-butanol y alcohol β -feniletílico, expresadas en mg/L, para las cepas BYpADCL y BYpHA1-1. A la derecha se muestra la suma de los alcoholes para ambas cepas. Resultados obtenidos a partir de duplicados biológicos y técnicos.

Los análisis estadísticos llevados a cabo sobre los datos de la figura 30, mostraron que no existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas para la cepa BYpADCL y BYpHA1-1 para ninguno de los alcoholes estudiados. Los valores obtenidos fueron menores a los reportados previamente (Carrau et al. 2008; Vilanova et al. 2007), en condiciones similares de fermentación.

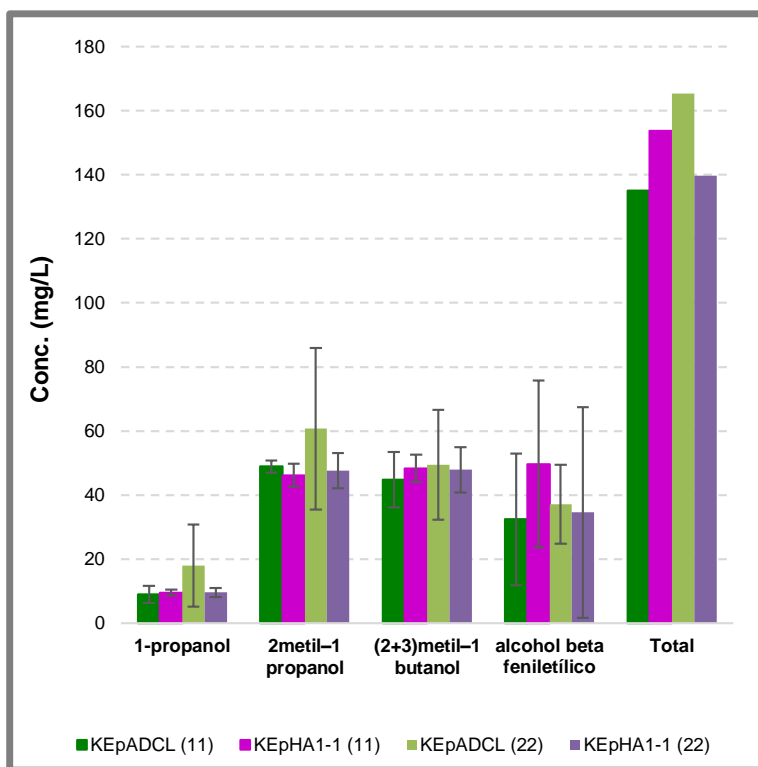


Figura 31. Concentraciones de los alcoholes superiores: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, (2+3)-metil-1-butanol y alcohol β -fenilético, expresadas en mg/L, para las cepas KEpADCL y KEpHA1-1. A la derecha se muestra la suma de los alcoholes para ambas cepas. Resultados obtenidos a partir de duplicados biológicos y técnicos.

En cuanto a los valores de alcoholes superiores obtenidos para la serie K197E, estos también fueron inferiores a los reportados en bibliografía, para fermentaciones en condiciones similares. Esto podría deberse a que las cepas de laboratorio, K197E y BY4743, son menos robustas que las cepas de la industria vinícola tales como M522 y KU1, y podrían estar sufriendo inhibición frente a esas concentraciones de alcoholes.

Por otra parte, los análisis estadísticos, no encontraron diferencias significativas entre KEpADCL y KEpHA1-1, por lo que la sobreexpresión de *COQ1* no influiría en la producción de alcoholes superiores. También se encontró que no existen diferencias significativas entre los resultados del día 11 y el día 22, lo que demuestra que se llega a una meseta en la producción, probablemente debido a inhibición de las levaduras. Por lo que, no sería necesario esperar a alcanzar el fin de fermentación para alcanzar los mismos niveles de alcoholes.

También se realizó un comparación estadística entre la producción entre las cepas BY4743 y K197E, no encontrándose diferencias significativas entre ellas.

4.7 Extracción con dodecano.

Con la finalidad de optimizar la producción de isoprenoides, facilitar la extracción y minimizar costos, se realizó un ensayo preliminar de extracción líquido-líquido con el

solvente orgánico dodecano. Esta técnica, previamente explicada en Materiales y Métodos, consiste en poner sobre el cultivo una fina capa del solvente. Ya que la mayoría de los isoprenoides tienen afinidad por la fase orgánica, estos tienden a pasar hacia la capa de dodecano. Se llevó a cabo la extracción con dodecano en medio Símil Mosto, 75 mg/L de YAN, para la cepa KEpHA1-1. En la figura 32, se comparan los resultados obtenidos para ensayos en paralelo con la cepa KEpHA1-1, donde por un lado se realizó la extracción clásica con columnas Isolute día 11, y por otro lado, la extracción simultánea en el cultivo con dodecano también al día 11 de cultivo.

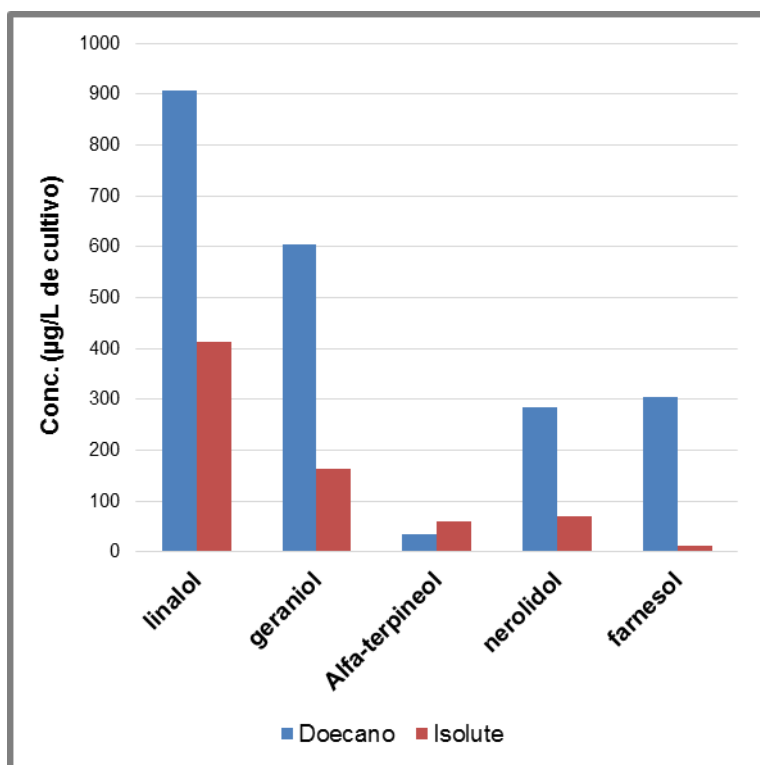


Figura 32. Concentraciones de los principales monoterpenos y sesquiterpenos medidos en µg/L de cultivo obtenidos en la fermentación con la cepa KEpHA1-1 en medio Símil Mosto con 75 mg/L de YAN. Se comparan los valores obtenidos con la extracción con dodecano (azul) y la extracción realizada con las columnas isolute (rojo).

Con la extracción con dodecano se alcanzaron niveles de linalol de 906 µg/L y 605 µg/L de geraniol, muy superiores a los obtenidos mediante la extracción realizada con las columnas Isolute. Esto probablemente pueda explicarse, considerando que al llevar a cabo una extracción simultánea a medida que se van produciendo los isoprenoides, se minimizan las posibilidades de que haya inhibición por producto, permitiendo así que las enzimas continúen sintetizando más producto. Si bien los resultados fueron prometedores, son necesarios más estudios sobre este método de extracción.

Capítulo 5

Conclusiones



Se demostró que *S. cerevisiae* produce monoterpenos *de novo* y que es posible modular sus niveles en ausencia de genes o precursores vegetales.

La sobreexpresión de *COQ1* a partir de un plásmido de alto número de copias, en un medio sintético que simula un mosto de uva, aumentó significativamente los niveles de isoprenoides. Sin embargo, con la sobreexpresión de *COQ1* a partir del cromosoma no se obtuvieron resultados importantes en la producción de isoprenoides. Esta discrepancia quizás se deba a que cuando se sobreexpresó Coq1p a partir del cromosoma, la proteína no se localizó correctamente en la mitocondria, tal como sucede con la proteína nativa y también con Coq1p sobreexpresada a partir de plásmidos. Quizás se podría lograr una correcta localización de Coq1p sobreexpresada a partir del cromosoma utilizando alguna de las siguientes estrategias: promotores más moderados o el promotor inducible *CUP1-1* a muy bajas concentraciones de cobre; condiciones de cultivo suaves, tales como bajas temperaturas y agitación de manera de favorecer el correcto plegado y localización de la proteína. Un ensayo clave para determinar el rol de *COQ1*, sería la realización de ensayos de actividad con la proteína purificada para determinar su especificidad de sustrato.

El aumento en la producción de isoprenoides en las cepas con plásmidos vacíos cultivadas en el medio Símil Mosto, podría deberse a cambios fisiológicos de la levadura, frente a un estrés metabólico (presencia del plásmido) y un estrés osmótico (las concentraciones en el medio símil mosto son de 120 g/L de azúcares totales). Sería interesante dilucidar qué otras situaciones de estrés afectan la producción de isoprenoides en *S. cerevisiae*. Sin embargo, no se puede descartar la posible participación de *COQ1* en la síntesis de isoprenoides, ya que el aumento en la producción de isoprenoides es aún mayor en los plásmidos que sobreexpresan *COQ1* que en los plásmidos vacíos y por otro lado, estudios recientes aportan más evidencias a una posible vinculación de *COQ1* con la biosíntesis de los mismos (Huang et al. 2013).

Las cepas mutantes en *erg20*, resultaron muy buenas productoras de monoterpenos, tal como era de esperar. La presencia del plásmido de alto número de copias que sobreexpresa *COQ1*, aumentó aún más los niveles de producción de linalol, alcanzando los 760 µg/L. Este valor es superior a los valores reportados hasta el momento para la producción de linalol en *S.cerevisiae*, superando en un orden de magnitud los niveles de linalol alcanzados expresando linalol sintetas de plantas en *S. cerevisiae*. Se logró una concentración total de isoprenoides volátiles mayor a 1.3 mg/L, en ausencia de genes o precursores vegetales. Como perspectiva futura para el desarrollo de biocombustibles isoprenoides se podría plantear la incorporación de una

farneseno sintasa de *Vitis vinifera* cv Tannat en *S. cerevisiae*, ya que en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE se está analizando el genoma y transcriptoma de nuestra variedad emblemática de vid.

En cuanto a la producción de alcoholes superiores, no se lograron alcanzar los niveles reportados en Carrau et al., 2008, probablemente debido a que solamente se trabajó con cepas de laboratorio. En un futuro se podrían modificar cepas industriales utilizando la poderosa técnica de edición génica CRISPR-Cas recientemente desarrollada (DiCarlo et al., 2013).

Incorporando varias modificaciones genéticas que aumentan los niveles de isoprenoides (*erg20*, *erg9*, sobreexpresión de HMG-CoA reductase y Coq1p, etc) en una cepa industrial, incorporando por ej una farnesano sintasa de vid, dilucidando qué condiciones de estrés resultan en altos niveles de isoprenoides y aplicando el sistema de extracción líquido-líquido con dodecano, seguramente se podría llegar a obtener niveles muy superiores de isoprenoides.

Bibliografía



- Abdelmoez, W. & Mustafa, A., 2014. Oleochemical Industry Future through Biotechnology. *Journal of Oleo Science*, 554(6): 545–554.
- Abdin, M.Z. & Alam, P., 2015. Genetic engineering of artemisinin biosynthesis: prospects to improve its production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2): 33.
- Adams, C.C. & Gross, D.S., 1991. The Yeast Heat Shock Response Is Induced by Conversion of Cells to Spheroplasts and by Potent Transcriptional Inhibitors. *Journal of bacteriology*, 173(23): 7429–7435.
- Aransiola, E.F. Ojumu, T.V., Oyekola, .O.O., Madzimbamuto, T.F. & Ikhu-Omoregbe, D.I.U., 2014. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy*, 61: 276–297.
- Ashby, M.N. & Edwards, P.A., 1990. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(22): 13157–13164.
- Azwar, M.Y., Hussain, M.A. & Abdul-Wahab, A.K., 2014. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31: 158–173.
- Barquet, M., 2012. *Ingeniería metabólica en Saccharomyces cerevisiae y estudio de levaduras nativas productoras de aromas isoprenoides*. Universidad de la República.
- Bergthorson, J.M. & Thomson, M.J., 2015. A review of the combustion and emissions properties of advanced transportation biofuels and their impact on existing and future engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42: 1393–1417.
- Blanchard, L. & Karst, F., 1993. Characterization of a lysine-to-glutamic acid mutation in a conservative sequence of farnesyl diphosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 125(2): 185–189.
- Buglass, A.J., 2011. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*,
- Carrau, F., Medina, K. & Fariña, L., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8(7): 1196–1207.
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gaggero, C. & Dellacassa, E., 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1): 107–115.
- Chambon, C., Ladeveze, V., Oulmouden, A., Servouse, M. & Karst, F., 1990. Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase. *Current Genetics*, 18(1): 41–46.

- Chang, W., Song, H., Liu, H. & Liu, P., 2013. Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(4): 571–579.
- Closa Calvo, M., 2008. *Estudi de l'especialització funcional dels isoenzims citosòlics de la farnesildifosfat sintasa d'Arabidopsis thaliana*. Universitat de Barcelona.
- Cordente, A.G., Curtin, C. D., Varela, C., & Pretorius, I.S., 2012. Flavour-active wine yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3): 601–18.
- Davies, F.K., Work, V.H., Beliaev, A.S. & Posewitz, M.C., 2014. Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2.
- Deveau, A., Piispanen, A.E., Jackson, A.A. & Hogan, D.A., 2010. Farnesol Induces Hydrogen Peroxide Resistance in *Candida albicans* Yeast by Inhibiting the Ras-Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukaryotic Cell*, 9(4): 569–577.
- DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. & Church, G.M., 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7): 4336-4343.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C.W., 2015. *InfoStat*.
- Dutta, K., Daverey, A. & Lin, J.-G., 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69: 114–122.
- Erb, T.J., Evans, B.S., Cho, K., Warlick, B.P., Sriram, J., Wood, B., Imker, H.J., Sweedler, J.V. & Tabita, F Robert, 2012. A RubisCO-like protein links SAM metabolism with isoprenoid biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 8: 926–932.
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F.M., & Dellacassa, E., 2015. Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *Food Research International*, 69: 244–255.
- Fischer, M.J.C., Meyer, S., Claudel, P. & Bergdoll, M., 2011. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8): 1883–92.
- Freigassner, M., Pichler, H. & Glieder, A., 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, 8(1): 69.
- Freitas, S.V.D., Oliveira, M.B. & Lima, A.S., 2012. Measurement and Prediction of Biodiesel Volatility. *Energy & Fuels*, 26(5): 3048–3053.
- Ghim, C.-M. Kim, T., Mitchell, R.J. & Lee, S.K., 2010. Synthetic biology for biofuels: Building designer microbes from the scratch. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1): 11–21.
- Gin, P. & Clarke, C.F., 2005. Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 2676–2681.

- Gokul Raj, K., Manikandan, R., Arulvasu, C. & Pandi, M., 2015. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 138: 667–74.
- Gregg, C., Kyryakov, P. & Titorenko, V.I., 2009. Purification of Mitochondria from Yeast Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (30).
- Griffith, D.A., Delipala, C., Leadsham, J., Jarvis, S.M., & Oesterhelt, D., 2003. A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Letters*, 553(1-2): 45–50.
- Grochowski, L.L., Xu, H. & White, R.H., 2006. Methanocaldococcus jannaschii uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate. *Journal of Bacteriology*, 188(9): 3192–8.
- Guan, X. Diez, T., Prasad, T.K., Nikolau, B.J., & Wurtele, E.S., 1999. Geranyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362: 12–21.
- Guo, M., Song, W. & Buhain, J., 2015. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42: 712–725.
- Gupta, V.G., Tuohy, M.G., Kubicek, C.P., Saddler, J. & Xu, F., 2014. Bioenergy research: Advances and applications. *Elsevier Inc.*
- Herrero, O., Ramón, D. & Orejas, M., 2008. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine. *Metabolic engineering*, 10(2): 78–86.
- Ho, D.P., Ngo, H.H. & Guo, W., 2014. A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource Technology*, 169: 742–749.
- Huang, B., Guo, J., Sun, L. & Chen, W., 2013. ERG9 and COQ1 disruption reveals isoprenoids biosynthesis is closely related to mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Integrative Biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 5: 1282–96.
- Huang, H.-J., Ramaswamy, S. & Liu, Y., 2014. Separation and purification of biobutanol during bioconversion of biomass. *Separation and Purification Technology*, 132: 513–540.
- Ignea, C., Cvetkovic, I., Loupassaki, S., Kefalas, P., Johnson, C.B., Kampranis, S. C. & Makris, A.M., 2011. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids. *Microbial Cell Factories*, 10: 4.
- Janke, C. Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. & Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11): 947–962.

- Jiménez Martí, E., 2010. Análisis de la respuesta de las levaduras a las condiciones de estrés osmótico y ausencia de nitrógeno durante la vinificación. *Universitat de València, Servei de Publicacions*, 1–338.
- Jones, J.A., Toparlak, Ö.D. & Koffas, M.A., 2015. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 52–59.
- Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K. & Misawa, N., 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J.*, 324(2): 421–426.
- Keasling, J.D., 2010. Microbial Production of Isoprenoids. In K. N. Timmis, ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 2951–2966.
- Klass, D., 2004. *Encyclopedia of Energy*, Elsevier.
- Kuranda, K., 2006. Functional Networks involved in cell wall biosynthesis and the isoprenoid pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science*, 1–164.
- Lee, S.Y., Kim, H.M. & Cheon, S., 2015. Metabolic engineering for the production of hydrocarbon fuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 15–22.
- Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J.P. & Turlings, T.C.J., 2014. Plant volatiles and the environment. *Plant, Cell & Environment*, 37(8): 1905–1908.
- Maury, J., Asadollahi, M.A. & Møller, K., 2005. *Biotechnology for the Future*. Springer Berlin Heidelberg.
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Gaggero, C. & Carrau, F. M., 2008. Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. *Enología*, 4(6): 1–6.
- Misawa, N., 2011. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5): 627–33.
- Moise, A.R., Al-Babili, S. & Wurtzel, E.T., 2014. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical Reviews*, 114(1): 164–193.
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K. & Dalai, A.K., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 578–597.
- Nevoigt, E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 72(3): 379–412.
- Newman, J.D., Marshall, J., Chang, M., Nowroozi, F., Paradise, E., Pitera, D., Newman, K.L. & Keasling, J.D., 2006. High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(4): 684–691.

- Odundo, J.O., Oyoo, D.O. & Nawiri, M.P., 2013. The artemisin potential of flowers from *Artemisia annua* L. grown in Western Kenya. *Industrial Crops and Products*, 49: 233–236.
- Ohto, C., Muramatsu, M. & Obata, S., 2009. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5): 837–845.
- Peralta-Yahya, P.P., Ouellet, M., Chan, R., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D. & Lee, T.S., 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nature Communications*, 2(May): 483.
- Peralta-Yahya, P.P., Zhang, F., del Cardayre, S.B. & Keasling, J.D., 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 488(7411): 320–8.
- Pérez-Gil, J. & Rodríguez-Concepción, M., 2013. Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *The Biochemical Journal*, 452: 19–25.
- Pronk, J.T., 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2095–2100.
- Rico, J., Pardo, E. & 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19): 6449–54.
- Rico Molins, J., 2015. Producción heteróloga de monoterpenos en *Saccharomyces cerevisiae*: selección y mejora de cepas mediante técnicas de ingeniería metabólica. Valencia (Spain): *Universitat Politècnica de València*.
- Rodríguez, J.M., Ruíz-Sala, P., Ugarte, M. & Peñalva, M., 2004. Fungal metabolic model for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6): 4578–87.
- Rodríguez Villalón, A., 2010. Biosíntesis de carotenoides en *Escherichia coli* y tejidos no fotosintéticos de *Arabiopsis thaliana*. *Universitat de Barcelona*.
- Ruffing, A., 2013. Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques. *InTech*.
- Sikorski, R.S. & Hieter, P., 1989. A System of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*, 122(1): 19–27.
- Singh, L. & Wahid, Z.A., 2015. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21: 70–80.
- Spain, B.H., Koo, D., Ramakrishnan, M., Dzudzor, B. & Colicelli, J., 1995. Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein α subunit deficiency by interacting with the β subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43): 25435–25444.

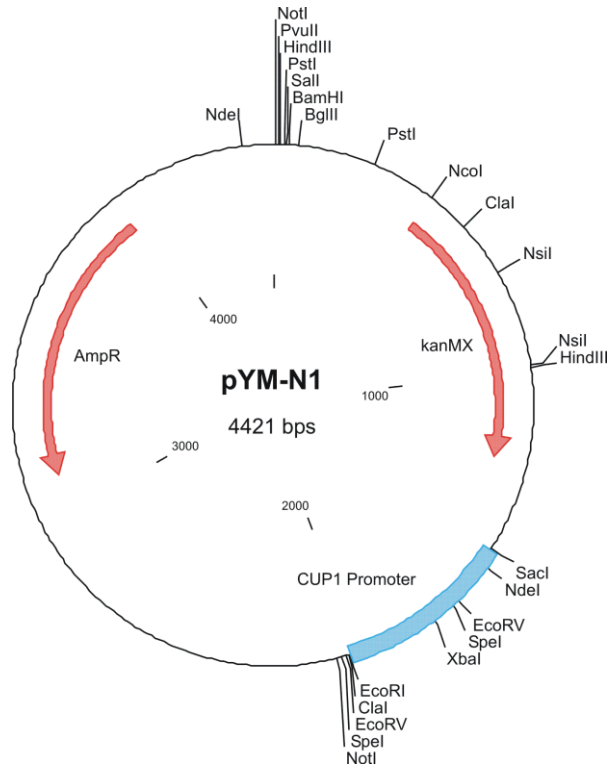
- Tippmann, S., Chen, Y., Siewers, V. & Nielsen, J., 2013. From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*, 8(12): 1435–44.
- Vannice, J.C., 2014. Discovery of enzymes responsible for an alternate mevalonate pathway in *Haloferax volcanii*. *University of Missouri - Kansas City*.
- Vilanova, M., Ugliano, M. & Varela, C., 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1): 145–157.
- Xue, Chuang, Zhao, Jing Bo, Chen, Li Jie, Bai, Feng Wu, Yang, Shang Tian, Sun, Jian Xin, Yang, Shang Tian, & Sun, Jian Xin, 2014. Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8): 3463–3474.
- Zhao, Yaru, Yang, Jianming, Qin, Bo, Li, Yonghao, Sun, Yuanzhang, Su, Sizheng, & Xian, Mo, 2011. Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6): 1915–1922.

Anexo I

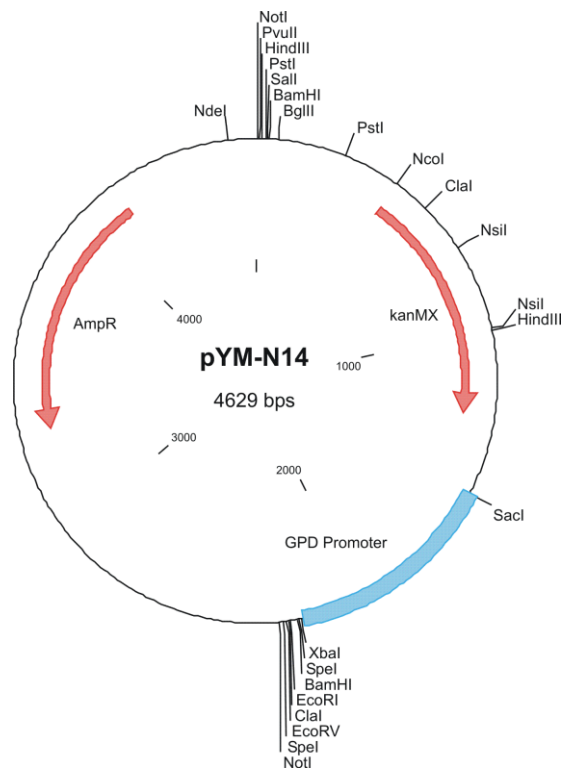


Plásmidos de Euroscarf utilizados en el protocolo de Toolbox kit, para los cambios de promotor en el cromosoma.

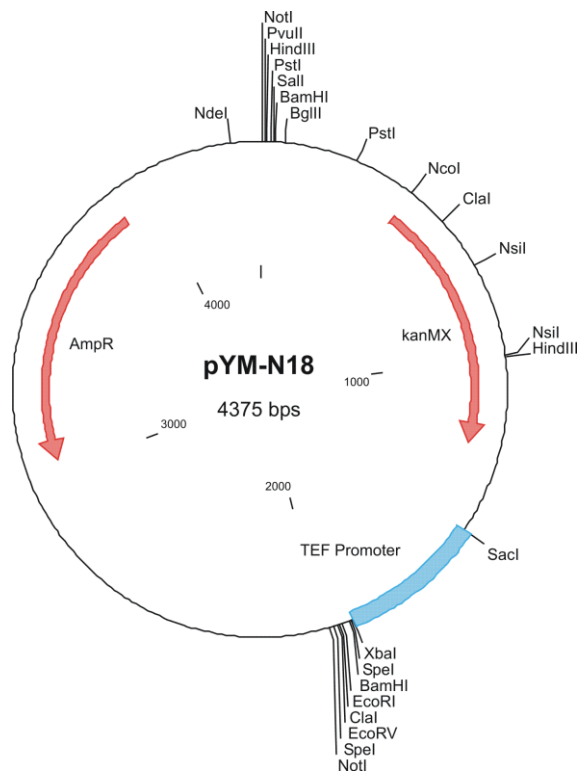
Plásmido pYM-N1:



Plásmido pYM-N14:



Plásmido pYM-N18:



Anexo II



Análisis estadístico

Análisis de resultados de varianza para la concentración de linalol en µg/L para la cepa BY4743 transformada con los distintos plásmidos: pADCL, pHA1-1, pRS316 y pRSQ1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 48	8	1,00	1,00	1,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		50,15	3	16,72	2939,41 <0,0001
Cepas	50,15	3	16,72	2939,41	<0,0001
Error	0,02	4	0,01		
Total	50,18	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,30701

Error: 0,0057 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.	
BYpRS	3,79	2	0,05 A
BYpRSQ1-1	6,59	2	0,05 B
BYpADCL	9,66	2	0,05 C
BYpHA1-1	9,92	2	0,05 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 72	8	0,99	0,99	5,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		151,92	3	50,64	236,10 0,0001
Cepas	151,92	3	50,64	236,10	0,0001
Error	0,86	4	0,21		
Total	152,78	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,88533

Error: 0,2145 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.	
BYpRS	4,66	2	0,33 A
BYpRSQ1-1	4,96	2	0,33 A
BYpADCL	11,99	2	0,33 B
BYpHA1-1	14,65	2	0,33 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 96

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 96	8	0,90	0,83	20,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	162,93	3	54,31	12,30	0,0173
Cepas	162,93	3	54,31	12,30	0,0173
Error	17,66	4	4,42		
Total	180,59	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,55440

Error: 4,4158 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.
BYpRSQ1-1	5,63	2 1,49 A
BYpRS	5,99	2 1,49 A
BYpADCL	13,94	2 1,49 A B
BYpHA1-1	15,58	2 1,49 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de geraniol en µg/L para la cepa BY4743 transformada con los distintos plásmidos: pADCL, pHA1-1, pRS316 y pRSQ1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 48	8	0,99	0,98	3,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,14	3	0,05	92,33	0,0004
Cepas	0,14	3	0,05	92,33	0,0004
Error	1,9E-03	4	4,9E-04		
Total	0,14	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08988

Error: 0,0005 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.
BYpRS	0,41	2 0,02 A
BYpRSQ1-1	0,45	2 0,02 A
BYpHA1-1	0,68	2 0,02 B
BYpADCL	0,70	2 0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 72	8	0,85	0,73	3,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,01	3	2,5E-037,35	0,0419
Cepas	0,01	3	2,5E-037,35		0,0419
Error	1,4E-03	4	3,4E-04		
Total	0,01	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07479

Error: 0,0003 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.		
BYpRS	0,54	2	0,01	A	
BYpADCL	0,55	2	0,01	A	B
BYpRSQ1-1	0,56	2	0,01	A	B
BYpHA1-1	0,62	2	0,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 96

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 96	8	0,97	0,95	10,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,79	3	0,26	42,52 0,0017
Cepas	0,79	3	0,26	42,52	0,0017
Error	0,02	4	0,01		
Total	0,81	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32022

Error: 0,0062 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.		
BYpHA1-1	0,50	2	0,06	A	
BYpRS	0,63	2	0,06	A	
BYpRSQ1-1	0,66	2	0,06	A	
BYpADCL	1,31	2	0,06		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de nerolidol en µg/L para la cepa BY4743 transformada con los distintos plásmidos: pADCL, pHA1-1, pRS316 y pRSQ1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 48	8	0,99	0,99	6,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		52001,86	3	17333,95	185,38 0,0001
Cepas	52001,86	3	17333,95	185,38	0,0001
Error	374,02	4	93,50		

Total 52375,88 7

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=39,36430

Error: 93,5048 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.	
BYpRS	71,69	2	6,84	A
BYpRSQ1-1	76,42	2	6,84	A
BYpADCL	217,58	2	6,84	B
BYpHA1-1	249,73	2	6,84	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 72	8	0,97	0,95	11,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.	62332,65			3	20777,55	42,96	0,0017
Cepas	62332,65		3	20777,55		42,96	0,0017
Error	1934,65		4	483,66			
Total	64267,31		7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=89,52767

Error: 483,6634 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.	
BYpRS	96,30	2	15,55	A
BYpRSQ1-1	105,27	2	15,55	A
BYpADCL	229,00	2	15,55	B
BYpHA1-1	307,50	2	15,55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 96

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 96	8	0,79	0,63	22,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.	19122,81			3	6374,27	4,99	0,0771
Cepas	19122,81		3	6374,27		4,99	0,0771
Error	5104,58		4	1276,15			
Total	24227,39		7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=145,42386

Error: 1276,1450 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.	
BYpRS	112,19	2	25,26	A
BYpRSQ1-1	125,41	2	25,26	A
BYpADCL	175,44	2	25,26	A
BYpHA1-1	236,57	2	25,26	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de farnesol en µg/L para la cepa BY4743 transformada con los distintos plásmidos: pADCL, pHA1-1, pRS316 y pRSQ1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 48	8	0,98	0,97	6,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.	28915,48			3	9638,49	66,18	0,0007
Cepas	28915,48			3	9638,49	66,18	0,0007
Error	582,53			4	145,63		
Total	29498,01			7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=49,12633

Error: 145,6322 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.		
BYpRS	110,54	2	8,53	A
BYpRSQ1-1	120,11	2	8,53	A
BYpADCL	220,35	2	8,53	B
BYpHA1-1	247,35	2	8,53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 72	8	0,97	0,94	9,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.	42169,18			3	14056,39	39,82	0,0019
Cepas	42169,18			3	14056,39	39,82	0,0019
Error	1411,97			4	352,99		
Total	43581,15			7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=76,48370

Error: 352,9934 gl: 4

Cepas	Medias n	E.E.		
BYpRS	110,62	2	13,29	A
BYpRSQ1-1	139,42	2	13,29	A
BYpADCL	232,84	2	13,29	B
BYpHA1-1	292,21	2	13,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 96

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t 96	8	0,43	0,01	32,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.		7422,19		3	2474,06	1,02	0,4722
Cepas	7422,19		3	2474,06		1,02	0,4722
Error	9703,98		4	2425,99			
Total	17126,17		7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=200,50745

Error: 2425,9941 gl: 4

Cepas	Medias	n	E.E.	
BYpRS	121,55	2	34,83	A
BYpRSQ1-1	126,77	2	34,83	A
BYpADCL	160,17	2	34,83	A
BYpHA1-1	197,62	2	34,83	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de linalol en $\mu\text{g/L}$ para la cepa BY4743 y las cepas modificadas en el cromosoma BY_GPD y BY_CUP1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T48	8	0,29	0,00	11,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.		0,15		3	0,05	0,54	0,6814
cepas	0,15		3	0,05	0,54		0,6814
Error	0,37		4	0,09			
Total	0,51		7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,23232

Error: 0,0916 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.	
BY_CUP1-1(100)	2,43	2	0,21	A
BY_GPD	2,53	2	0,21	A
BY_CUP1-1(0)	2,73	2	0,21	A
BY4743	2,76	2	0,21	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T72	8	0,85	0,73	6,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.		0,84		3	0,28	7,45	0,0409
cepas	0,84		3	0,28	7,45		0,0409
Error	0,15		4	0,04			
Total	0,99		7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,78858

Error: 0,0375 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.		
BY_CUP1-1(0)	2,84	2	0,14	A	
BY_CUP1-1(100)	2,89	2	0,14	A	B
BY_GPD	3,25	2	0,14	A	B
BY4743	3,64	2	0,14		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de nerolidol en $\mu\text{g/L}$ para la cepa BY4743 y las cepas modificadas en el cromosoma BY_GPD y BY_CUP1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T48	8	0,05	0,00	22,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		6,82	3	2,27	0,07	0,9740
cepas	6,82	3	2,27	0,07	0,9740	
Error	133,49	4	33,37			
Total	140,31	7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=23,51654

Error: 33,3715 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.		
BY_GPD	24,35	2	4,08	A	
BY_CUP1-1(0)	25,80	2	4,08	A	
BY_CUP1-1(100)	26,57	2	4,08	A	
BY4743	26,65	2	4,08	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T72	8	0,73	0,53	14,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		173,26	3	57,75	3,63	0,1224
cepas	173,26	3	57,75	3,63	0,1224	
Error	63,61	4	15,90			
Total	236,86	7				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=16,23318

Error: 15,9014 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.		
BY_GPD	25,47	2	2,82	A	

BY_CUP1-1(0)	25,53	2	2,82	A
BY_CUP1-1(100)	26,36	2	2,82	A
BY4743	36,50	2	2,82	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de farnesol en $\mu\text{g/L}$ para la cepa BY4743 y las cepas modificadas en el cromosoma BY_GPD y BY_CUP1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T48	8	0,03	0,00	29,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,16	3	2,05	0,05	0,9846
cepas	6,16	3	2,05	0,05	0,9846
Error	174,92	4	43,73		
Total	181,09	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,92029

Error: 43,7309 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.	
BY4743	20,91	2	4,68	A
BY_GPD	21,67	2	4,68	A
BY_CUP1-1(100)	22,86	2	4,68	A
BY_CUP1-1(0)	23,05	2	4,68	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T72	8	0,52	0,16	36,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	355,50	3	118,50	1,46	0,3520
cepas	355,50	3	118,50	1,46	0,3520
Error	325,04	4	81,26		
Total	680,54	7			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=36,69667

Error: 81,2610 gl: 4

cepas	Medias	n	E.E.	
BY_GPD	18,16	2	6,37	A
BY_CUP1-1(0)	21,58	2	6,37	A
BYC_UP1-1(100)	24,20	2	6,37	A
BY4743	35,89	2	6,37	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para la concentración de linalol en µg/L para las cepas BY4743 y BY_pADCL, en función de los distintos medios de cultivo.

Símil Mosto (SM)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	4	1,00	0,99	7,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		378,30	1	378,30	414,58	0,0024
cepas	378,30	1	378,30	414,58	0,0024	
Error	1,82	2	0,91			
Total	380,13	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,10657

Error: 0,9125 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY	2,70	2	0,68	A
BY_pADCL	22,15	2	0,68	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB	4	0,99	0,99	2,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		1,53	1	1,53	388,59	0,0026
cepas	1,53	1	1,53	388,59	0,0026	
Error	0,01	2	3,9E-03			
Total	1,53	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26933

Error: 0,0039 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY	1,94	2	0,04	A
BY_pADCL	3,17	2	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB_L+

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB_L+	4	0,45	0,17	6,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0,08	1	0,08	1,60	0,3328
cepas	0,08	1	0,08	1,60	0,3328	
Error	0,10	2	0,05			
Total	0,18	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,96726

Error: 0,0506 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BY_pADCL	3,11	2	0,16	A
BY	3,40	2	0,16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la de varianza para la concentración de linalol en $\mu\text{g/L}$ en los medios Símil Mosto, YNB y YNB_L+, en función de las distintas cepas BY y BYpADCL.

BY

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
BY	6	0,97	0,95	5,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	2,13	2	1,07	51,20	0,0048
Medios	2,13	2	1,07	51,20	0,0048
Error	0,06	3	0,02		
Total	2,20	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60315

Error: 0,0208 gl: 3

<u>Medios</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
YNB	1,94	2	0,10	A
SM	2,70	2	0,10	B
YNB L+	3,40	2	0,10	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

BYpADCL

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
BY_pADCL	6	1,00	0,99	8,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	481,84	2	240,92	386,18	0,0002
Medios	481,84	2	240,92	386,18	0,0002
Error	1,87	3	0,62		
Total	483,72	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,30061

Error: 0,6239 gl: 3

<u>Medios</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
YNB_L+	3,11	2	0,56	A
YNB	3,17	2	0,56	A
SM	22,15	2	0,56	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para la concentración de nerolidol en $\mu\text{g/L}$ para las cepas BY4743 y BY_pADCL, en función de los distintos medios de cultivo.

SM

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	4	0,95	0,92	24,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	70466,36	1	70466,36	35,25	0,0272
cepas	70466,36	1	70466,36	35,25	0,0272
Error	3997,89	2	1998,95		
Total	74464,25	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=192,20433

Error: 1998,9456 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY	51,35	2	31,61	A
BY_pADCL	316,80	2	31,61	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB	4	0,80	0,70	8,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	53,44	1	53,44	7,92	0,1064
cepas	53,44	1	53,44	7,92	0,1064
Error	13,49	2	6,74		
Total	66,92	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,16421

Error: 6,7442 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY	26,20	2	1,84	A
BY_pADCL	33,51	2	1,84	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB_L+

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB_L+	4	0,26	0,00	18,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,56	1	22,56	0,70	0,4911
cepas	22,56	1	22,56	0,70	0,4911
Error	64,57	2	32,28		
Total	87,13	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=24,42566

Error: 32,2825 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BY	27,70	2	4,02	A
BY_pADCL	32,45	2	4,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la de varianza para la concentración de nerolidol en $\mu\text{g/L}$ en los medios Símil Mosto, YNB y YNB_L+, en función de las distintas cepas BY y BYpADCL.

BY

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
BY	6	0,98	0,97	6,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	795,74	2	397,87	75,32	0,0027
Medios	795,74	2	397,87	75,32	0,0027
Error	15,85	3	5,28		
Total	811,59	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=9,60432

Error: 5,2825 gl: 3

<u>Medios</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
YNB	26,20	2	1,63	A
YNB_L+	27,70	2	1,63	A
SM	51,35	2	1,63	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

BYpADCL

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
BY_pADCL	6	0,96	0,94	28,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	107406,18	2	53703,09	39,68	0,0070
Medios	107406,18	2	53703,09	39,68	0,0070
Error	4060,10	3	1353,37		
Total	111466,28	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=153,72883

Error: 1353,3657 gl: 3

<u>Medios</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
YNB_L+	32,45	2	26,01	A
YNB	33,51	2	26,01	A
SM	316,80	2	26,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para la concentración de farnesol en µg/L para las cepas BY4743 y BY_pADCL, en función de los distintos medios de cultivo.

SM

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SM	4	0,97	0,96	19,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30598,76	1	30598,76	69,68	0,0141
cepas	30598,76	1	30598,76	69,68	0,0141
Error	878,31	2	439,16		
Total	31477,07	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=90,08901

Error: 439,1554 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY	21,06	2	14,82	A
BY_pADCL	195,99	2	14,82	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

YNB

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB	4	0,07	0,00	15,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,71	1	0,71	0,16	0,7266
cepas	0,71	1	0,71	0,16	0,7266
Error	8,73	2	4,37		
Total	9,44	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,98275

Error: 4,3661 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BY_pADCL	12,78	2	1,48	A
BY	13,62	2	1,48	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

YNB_L+

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB_L+	4	0,27	0,00	3,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	1	0,05	0,76	0,4761
cepas	0,05	1	0,05	0,76	0,4761
Error	0,13	2	0,07		
Total	0,18	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,11213

Error: 0,0669 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BY	7,40	2	0,18	A
BY_pADCL	7,63	2	0,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para la concentración de alcohol isoamílico en $\mu\text{g/L}$ para las cepas BY4743 y BY_pADCL, en función de los distintos medios de cultivo.

SM

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
SM	4	0,94	0,91	28,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	443,94	1	443,94	32,03	0,0298
cepas	443,94	1	443,94	32,03	0,0298
Error	27,72	2	13,86		
Total	471,67	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=16,00510

Error: 13,8609 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BY	2,48	2	2,63	A
BY_pADCL	23,55	2	2,63	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
YNB	4	0,98	0,96	4,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	12,39	1	12,39	81,89	0,0120
cepas	12,39	1	12,39	81,89	0,0120
Error	0,30	2	0,15		
Total	12,69	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,67218

Error: 0,1513 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BY	6,50	2	0,28	A
BY_pADCL	10,02	2	0,28	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

YNB_L+

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
YNB L+	4	0,30	0,00	13,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	85,56	1	85,56	0,84	0,4554
cepas	85,56	1	85,56	0,84	0,4554
Error	202,95	2	101,47		
Total	288,51	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=43,30488

Error: 101,4725 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.
BY_pADCL	72,15	2	7,12
BY	81,40	2	7,12

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la de varianza para la concentración de alcohol isoamílico en µg/L en los medios Símil Mosto, YNB y YNB_L+, en función de las distintas cepas BY y BYpADCL.

BY

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BY	6	0,98	0,97	21,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7903,02	2	3951,51	94,73	0,0019
Medios	7903,02	2	3951,51	94,73	0,0019
Error	125,14	3	41,71		
Total	8028,16	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,98877

Error: 41,7129 gl: 3

Medios	Medias	n	E.E.
SM	2,48	2	4,57
YNB	6,50	2	4,57
YNB L+	81,40	2	4,57

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

BY_pADCL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BY_pADCL	6	0,98	0,96	16,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo.	4270,11	2	2135,05	60,52	0,0038
Medios	4270,11	2	2135,05	60,52	0,0038
Error	105,83	3	35,28		
Total	4375,94	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=24,81948

Error: 35,2769 gl: 3

Medios	Medias	n	E.E.	
YNB	10,02	2	4,20	A
SM	23,55	2	4,20	A
YNB L+	72,15	2	4,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de linalol en $\mu\text{g/L}$ para distintas cepas (BY4743, K197K y K197E) transformadas con los plásmidos de alto número de copias, pADCL y pHA1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 48	18	1,00	1,00	6,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	267970,31	8	33496,29	439,36	<0,0001
cepas	267970,31	8	33496,29	439,36	<0,0001
Error	686,14	9	76,24		
Total	268656,45	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=34,54210

Error: 76,2381 gl: 9

cepas	Medias	n	E.E.				
BY	2,76	2	6,17	A			
BYpADCL	9,66	2	6,17	A			
BYpHA1-1	9,91	2	6,17	A			
KK	65,81	2	6,17		B		
KKpADCL	80,72	2	6,17		B		
KE	216,18	2	6,17			C	
KKpHA1-1	259,81	2	6,17				D
KEpADCL	285,32	2	6,17				D
KEpHA1-1	315,97	2	6,17				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 72	18	1,00	1,00	5,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo.	1269692,55	8	158711,57	1003,56	<0,0001
cepas	1269692,55	8	158711,57	1003,56	<0,0001
Error	1423,33	9	158,15		
Total	1271115,88	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=49,75022

Error: 158,1483 gl: 9

cepas	Medias	n	E.E.					
BY	3,64	2	8,89	A				
BYpADCL	11,99	2	8,89	A				
BYpHA1-1	14,65	2	8,89	A				
KK	93,64	2	8,89		B			
KKpADCL	130,73	2	8,89		B			
KE	226,31	2	8,89			C		
KKpHA1-1	349,94	2	8,89				D	
KEpADCL	639,23	2	8,89					E
KEpHA1-1	761,30	2	8,89					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de geraniol en $\mu\text{g/L}$ para distintas cepas (BY4743, K197K y K197E) transformadas con los plásmidos de alto número de copias, pADCL y pHA1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 48	16	1,00	0,99	6,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3378,94			7	482,71 382,83 <0,0001
cepas	3378,94			7	482,71 382,83 <0,0001
Error	10,09	8	1,26		
Total	3389,03			15	

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,44337

Error: 1,2609 gl: 8

cepas	Medias	n	E.E.					
BYpHA1-1	0,68	2	0,79	A				
BYpADCL	0,70	2	0,79	A				
KK	6,65	2	0,79		B			
KKpADCL	6,80	2	0,79		B			
KKpHA1-1	18,47	2	0,79			C		
KE	21,12	2	0,79			C		
KEpADCL	37,68	2	0,79				D	
KEpHA1-1	39,40	2	0,79				D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
----------	---	----------------	-------------------	----

T 72 16 1,00 1,00 3,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.		8513,77		7	1216,25	1450,62	<0,0001
cepas	8513,77		7	1216,25		1450,62	<0,0001
Error	6,71	8	0,84				
Total	8520,48		15				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,62336

Error: 0,8384 gl: 8

cepas	Medias	n	E.E.					
BYpADCL	0,55	2	0,65	A				
BYpHA1-1	0,62	2	0,65	A				
KKpADCL	9,64	2	0,65		B			
KK	11,04	2	0,65		B			
KE	18,70	2	0,65			C		
KKpHA1-1	22,43	2	0,65				D	
KEpADCL	54,52	2	0,65					E
KEpHA1-1	66,80	2	0,65					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de nerolidol en $\mu\text{g/L}$ para distintas cepas (BY4743, K197K y K197E) transformadas con los plásmidos de alto número de copias, pADCL y pHA1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 48	18	0,99	0,98	7,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor		
Modelo.		87269,71		8	10908,71	119,85	<0,0001
cepas	87269,71		8	10908,71		119,85	<0,0001
Error	819,16	9	91,02				
Total	88088,87		17				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=37,74211

Error: 91,0179 gl: 9

cepas	Medias	n	E.E.					
BY	26,65	2	6,75	A				
KK	39,56	2	6,75	A				
KE	99,72	2	6,75		B			
KEpADCL	105,61	2	6,75		B			
KEpHA1-1	108,69	2	6,75		B			
KKpADCL	133,73	2	6,75		B	C		
KKpHA1-1	159,69	2	6,75			C		
BYpADCL	217,58	2	6,75				D	
BYpHA1-1	249,73	2	6,75				D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 72	18	0,98	0,95	11,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	164457,97	8	20557,25	44,90	<0,0001
cepas	164457,97	8	20557,25	44,90	<0,0001
Error	4120,89	9	457,88		
Total	168578,86	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=84,65199

Error: 457,8770 gl: 9

cepas	Medias n	E.E.
BY	36,50	2 15,13 A
KK	65,31	2 15,13 A B
KE	111,68	2 15,13 A B
KKpADCL	149,28	2 15,13 B C
KEpHA1-1	223,07	2 15,13 C D
BYpADCL	229,00	2 15,13 C D
KKpHA1-1	264,70	2 15,13 D
KEpADCL	305,59	2 15,13 D
BYpHA1-1	307,50	2 15,13 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para la concentración de farnesol en $\mu\text{g/L}$ para distintas cepas (BY4743, K197K y K197E) transformadas con los plásmidos de alto número de copias, pADCL y pHA1-1, a distintos tiempos de extracción.

Tiempo 48 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 48	18	1,00	0,99	8,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	116749,49	8	14593,69	250,34	<0,0001
cepas	116749,49	8	14593,69	250,34	<0,0001
Error	524,67	9	58,30		
Total	117274,15	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=30,20538

Error: 58,2966 gl: 9

cepas	Medias n	E.E.
BY	20,91	2 5,40 A
KK	22,63	2 5,40 A
KE	39,33	2 5,40 A B
KKpHA1-1	40,45	2 5,40 A B
KEpADCL	55,12	2 5,40 B
KEpHA1-1	62,04	2 5,40 B
KKpADCL	107,18	2 5,40 C

BYpADCL	220,35	2	5,40	D
BYpHA1-1	247,35	2	5,40	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tiempo 72 horas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T 72	18	0,99	0,97	10,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	133772,59	8	16721,57	76,17	<0,0001
cepas	133772,59	8	16721,57	76,17	<0,0001
Error	1975,73	9	219,53		
Total	135748,33	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=58,61454

Error: 219,5256 gl: 9

cepas	Medias n	E.E.				
BY	35,89	2	10,48	A		
KK	40,45	2	10,48	A		
KE	48,56	2	10,48	A		
KKpADCL	151,75	2	10,48		B	
KEpHA1-1	153,01	2	10,48		B	
KKpHA1-1	159,51	2	10,48		B	C
KEpADCL	216,54	2	10,48			C
BYpADCL	232,84	2	10,48			D
BYpHA1-1	292,21	2	10,48			D
						E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L para las cepas BYpADCL y BYpHA1-1.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	0,36	0,04	77,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	225,30	1	225,30	1,13	0,3983
cepas	225,30	1	225,30	1,13	0,3983
Error	397,10	2	198,55		
Total	622,40	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=60,57524

Error: 198,5477 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.	
BYpADCL	10,77	2	9,96 A
BYpHA1-1	25,78	2	9,96 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,03	0,00	19,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,27	1	2,27	0,06	0,8339
cepas	2,27	1	2,27	0,06	0,8339
Error	79,84	2	39,92		
Total	82,10	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=27,16092

Error: 39,9175 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
BYpADCL	32,23 2	4,47 A
BYpHA1-1	33,73 2	4,47 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
(2+3)metil-1-butanol	4	0,54	0,31	11,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	88,64	1	88,64	2,34	0,2654
cepas	88,64	1	88,64	2,34	0,2654
Error	75,61	2	37,81		
Total	164,25	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,43280

Error: 37,8060 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
BYpHA1-1	49,42 2	4,35 A
BYpADCL	58,83 2	4,35 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
alc. beta-feniletílico	4	0,21	0,00	40,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,11	1	29,11	0,53	0,5440
cepas	29,11	1	29,11	0,53	0,5440
Error	110,87	2	55,44		
Total	139,98	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=32,00839

Error: 55,4373 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>	
BYpADCL	15,53	2	5,26 A
BYpHA1-1	20,93	2	5,26 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L para las cepas KEpADCL y KEpHA1-1 al día 11 de fermentación.

1-Propanol

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
1-propanol	4	0,04	0,00	21,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	0,30	1	0,30	0,08	0,8099
cepas	0,30	1	0,30	0,08	0,8099
Error	8,06	2	4,03		
Total	8,37	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,63250

Error: 4,0323 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>	
KEpADCL	8,99	2	1,42 A
KEpHA1-1	9,54	2	1,42 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
2-metil-1-propanol	4	0,30	0,00	6,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	7,37	1	7,37	0,87	0,4490
cepas	7,37	1	7,37	0,87	0,4490
Error	16,91	2	8,45		
Total	24,28	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,49889

Error: 8,4531 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>	
KEpHA1-1	46,20	2	2,06 A
KEpADCL	48,91	2	2,06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
-----------------	----------	----------------------	-------------------------	-----------

(2+3)metil-1-butanol 4 0,12 0,00 14,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,25	1	12,25	0,26	0,6583
cepas	12,25	1	12,25	0,26	0,6583
Error	92,66	2	46,33		
Total	104,91	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=29,26198

Error: 46,3321 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpADCL	44,83 2	4,81 A
KEpHA1-1	48,33 2	4,81 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
alc. beta-feniletílico	4	0,21	0,00	57,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	297,74	1	297,74	0,54	0,5389
cepas	297,74	1	297,74	0,54	0,5389
Error	1102,68	2	551,34		
Total	1400,41	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=100,94202

Error: 551,3389 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpADCL	32,38 2	16,60 A
KEpHA1-1	49,64 2	16,60 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de resultados de varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L para las cepas KEpADCL y KEpHA1-1 al día 22 de fermentación.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	0,30	0,00	66,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	70,64	1	70,64	0,85	0,4535
cepas	70,64	1	70,64	0,85	0,4535
Error	165,91	2	82,95		
Total	236,55	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=39,15426

Error: 82,9531 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpHA1-1	9,60 2	6,44 A
KEpADCL	18,00 2	6,44 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,20	0,00	33,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	171,22	1	171,22	0,51	0,5483
cepas	171,22	1	171,22	0,51	0,5483
Error	668,12	2	334,06		
Total	839,33	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=78,57303

Error: 334,0578 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpHA1-1	47,65 2	12,92 A
KEpADCL	60,74 2	12,92 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
(2+3)metil-1-butanol	4	0,01	0,00	26,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,54	1	2,54	0,01	0,9143
cepas	2,54	1	2,54	0,01	0,9143
Error	343,60	2	171,80		
Total	346,15	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=56,34783

Error: 171,8023 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpHA1-1	47,89 2	9,27 A
KEpADCL	49,48 2	9,27 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
alc. beta-feniletílico	4	0,01	0,00	69,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,50	1	6,50	0,01	0,9277

cepas	6,50	1	6,50	0,01	0,9277
Error	1236,63		2	618,32	
Total	1243,14		3		

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=106,89767

Error: 618,3169 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
KEpHA1-1	34,57	2	17,58	A
KEpADCL	37,12	2	17,58	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L para la cepa KEpADCL en función del tiempo de fermentación, 11 o 22 días.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	0,32	0,00	68,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81,27	1	81,27	0,95	0,4325
días	81,27	1	81,27	0,95	0,4325
Error	171,06	2	85,53		
Total	252,33	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=39,75812

Error: 85,5315 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 11	8,99	2	6,54	A
Día 22	18,00	2	6,54	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,18	0,00	32,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	139,83	1	139,83	0,44	0,5771
días	139,83	1	139,83	0,44	0,5771
Error	641,96	2	320,98		
Total	781,79	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=77,01976

Error: 320,9807 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 11	48,91	2	12,67	A
Día 22	60,74	2	12,67	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
(2+3)metil-1-butanol	4	0,06	0,00	28,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,62	1	21,62	0,12	0,7644
días	21,62	1	21,62	0,12	0,7644
Error	367,97	2	183,98		
Total	389,59	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=58,31133

Error: 183,9842 gl: 2

días	Medias n	E.E.
Día 11	44,83	2 9,59 A
Día 22	49,48	2 9,59 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
alc. betafeniletílico	4	0,04	0,00	48,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,42	1	22,42	0,08	0,8062
días	22,42	1	22,42	0,08	0,8062
Error	574,49	2	287,25		
Total	596,91	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=72,86015

Error: 287,2465 gl: 2

días	Medias n	E.E.
Día 11	32,38	2 11,98 A
Día 22	37,12	2 11,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L para la cepa KEpHA1-1 en función del tiempo de fermentación, 11 o 22 días.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	1,2E-03	0,00	12,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,6E-03	1	3,6E-03	2,5E-03	0,9648
días	3,6E-03	1	3,6E-03	2,5E-03	0,9648
Error	2,91	2	1,45		
Total	2,91	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,18349

Error: 1,4538 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 11	9,54	2	0,85	A
Día 22	9,60	2	0,85	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,05	0,00	9,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		2,12	1	2,12	0,10	0,7835
días	2,12	1	2,12	0,10	0,7835	
Error	43,06	2	21,53			
Total	45,18	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=19,94743

Error: 21,5302 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 11	46,20	2	3,28	A
Día 22	47,65	2	3,28	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
(2+3)metil-1-butanol	4	2,9E-03	0,00	12,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0,20	1	0,20	0,01	0,9462
días	0,20	1	0,20	0,01	0,9462	
Error	68,30	2	34,15			
Total	68,50	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=25,12230

Error: 34,1502 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 22	47,89	2	4,13	A
Día 11	48,33	2	4,13	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
alc. betafeniletílico	4	0,11	0,00	70,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		227,10	1	227,10	0,26	0,6623
días	227,10	1	227,10	0,26	0,6623	
Error	1764,82	2	882,41			
Total	1991,92	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=127,70200

Error: 882,4092 gl: 2

días	Medias	n	E.E.	
Día 22	34,57	2	21,00	A
Día 11	49,64	2	21,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L a fin de fermentación, en función las distintas cepas BYpADCL o KEpADCL.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	0,24	0,00	62,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		52,27	1	52,27	0,64	0,5082
cepas	52,27	1	52,27	0,64	0,5082	
Error	163,84	2	81,92			
Total	216,12	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=38,91018

Error: 81,9221 gl: 2

cepas	Medias	n	E.E.	
BYpADCL	10,77	2	6,40	A
KEpADCL	18,00	2	6,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,55	0,32	39,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		812,82	1	812,82	2,42	0,2598
cepas	812,82	1	812,82	2,42	0,2598	
Error	670,72	2	335,36			
Total	1483,54	3				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=78,72589

Error: 335,3588 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>		
BYpADCL	32,23	2	12,95	A
KEpADCL	60,74	2	12,95	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
(2+3)metil-1-butanol	4	0,21	0,00	23,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	87,42	1	87,42	0,53	0,5425
cepas	87,42	1	87,42	0,53	0,5425
Error	330,28	2	165,14		
Total	417,71	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=55,24482

Error: 165,1421 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>		
KEpADCL	49,48	2	9,09	A
BYpADCL	58,83	2	9,09	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
alc. betafeniletílico	4	0,73	0,60	35,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	465,91	1	465,91	5,43	0,1451
cepas	465,91	1	465,91	5,43	0,1451
Error	171,60	2	85,80		
Total	637,51	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=39,81994

Error: 85,7977 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias n</u>	<u>E.E.</u>		
BYpADCL	15,53	2	6,55	A
KEpADCL	37,12	2	6,55	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza para los distintos alcoholes superiores en mg/L a fin de fermentación, en función las distintas cepas BYpHA1-1 o KEpHA1-1.

1-Propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1-propanol	4	0,40	0,09	79,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	261,95	1	261,95	1,31	0,3705
cepas	261,95	1	261,95	1,31	0,3705
Error	399,16	2	199,58		
Total	661,11	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=60,73231

Error: 199,5787 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
KEpHA1-1	9,60	2 9,99 A
BYpHA1-1	25,78	2 9,99 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2-Metil-1-propanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2-metil-1-propanol	4	0,72	0,57	15,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	193,77	1	193,77	5,02	0,1544
cepas	193,77	1	193,77	5,02	0,1544
Error	77,23	2	38,62		
Total	271,00	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=26,71463

Error: 38,6165 gl: 2

cepas	Medias n	E.E.
BYpHA1-1	33,73	2 4,39 A
KEpHA1-1	47,65	2 4,39 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

(2+3)Metil-1-butanol

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
(2+3)metil-1-butanol	4	0,03	0,00	13,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,34	1	2,34	0,05	0,8399
cepas	2,34	1	2,34	0,05	0,8399
Error	88,93	2	44,47		
Total	91,27	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=28,66672

Error: 44,4662 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
KEpHA1-1	47,89	2	4,72	A
BYpHA1-1	49,42	2	4,72	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alcohol β -feniletílico

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
alc. betafeniletílico	4	0,14	0,00	87,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	186,05	1	186,05	0,32	0,6304
cepas	186,05	1	186,05	0,32	0,6304
Error	1175,91	2	587,96		
Total	1361,96	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=104,24021

Error: 587,9564 gl: 2

<u>cepas</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
BYpHA1-1	20,93	2	17,15	A
KEpHA1-1	34,57	2	17,15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)