



REMCID

Revista Multidisciplinaria
de Ciencia, Innovación y
Desarrollo

<http://remcid.utgz.edu.mx>



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Herramientas biotecnológicas en la producción de limoneno

Alejandro Durán-Mendoza¹, Ana Luisa Balderas-Ponce¹, José Ángel Granados-Arvizu¹, Carlos Regalado-González, Monserrat Escamilla-García¹

¹Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas S/N, Las Campanas, Santiago de Querétaro 76010.

Recepción 23 de febrero de 2023. Aceptación 16 de marzo de 2023

PALABRAS CLAVE

Limoneno, *Escherichia coli*, Vía MEP, Vía MVA, ingeniería metabólica.

Resumen

El limoneno es un monoterpeno producido principalmente por plantas, este se caracteriza por presentar propiedades terapéuticas tales como, actividad antioxidante y propiedades anticancerígenas, es por ello que es altamente utilizado en la industria. Una de las ventajas de la producción de limoneno son los bajos rendimientos y los altos costos de producción, es por ello que se han buscado alternativas para la producción de este terpeno. El objetivo del presente trabajo es presentar una revisión bibliográfica de las herramientas biotecnológicas actuales y las perspectivas a futuro enfocadas en *Escherichia coli* utilizadas para la producción de limoneno. La modificación de rutas metabólicas es una alternativa viable para la producción de limoneno, ya que se requiere menor cantidad de materia prima, los rendimientos son mayores en comparación a los obtenidos mediante técnicas tradicionales como son la hidrodestilación y la extrusión.

KEYWORDS

Limonene, *Escherichia coli*, MEP pathway, MVA pathway, metabolic engineering.

Abstract

Limonene is a monoterpene produced mainly by plants, it is characterized by having therapeutic properties such as antioxidant activity and anticancer properties, which is why it is highly used in the industry. One of the advantages of limonene production is the low yields and high production costs, which is why alternatives have been sought for the production of this terpene. The objective of this work is to present a bibliographic review of current biotechnological tools and future perspectives focused on *Escherichia coli* used for the limonene production. The modification of metabolic pathways is a viable alternative for the production of limonene, since a smaller amount of raw material is required, the yields are higher compared to those obtained by traditional techniques such as hydrodistillation and extrusion.

Introducción

Los terpenos son considerados como agentes antiinflamatorios, antivirales, anti bacteriológicos, además poseen actividad antiséptica. Los terpenos se caracterizan por poseer una unidad base de cinco carbonos (isopreno) y se pueden clasificar de acuerdo a las unidades de isopreno en tetraterpenos (C40), triterpenos (C30), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), y monoterpenos (C10). Los monoterpenos son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales (90%), y se forman combinando las dos unidades básicas de dos isoprenos (C10)¹.

El limoneno (C₁₀H₁₆) es un monoterpene cíclico, el cual se puede encontrar en la naturaleza en sus dos formas ópticamente activas R y S, se considera el componente principal del aceite extraído de las cáscaras de los cítricos (naranja y limón), y está presente en más de 300 plantas. El isómero (R)-limoneno es el que se encuentra en mayor proporción en los aceites cítricos y al que se le asocia el sabor y la fragancia de las naranjas².

El limoneno ha sido altamente utilizado como aditivo de sabor y fragancia en productos de limpieza y cosméticos, alimentos, bebidas y productos farmacéuticos. También ha aumentado su uso como solvente, siendo el sustituto de solventes a base petróleo en aplicaciones industriales y de pinturas³, así como, en el control de plagas como insecticida⁴. Debido a su capacidad de absorción gastrointestinal, biodisponibilidad y baja toxicidad, el limoneno ha sido estudiado para su aplicación terapéutica. Estudios han demostrado que el limoneno posee actividad antioxidante antiinflamatoria, actúa como agente gastroprotector, cardioprotector, entre otros⁵.

Algunos autores han reportado que algunos metabolitos del limoneno presentan actividades quimiopreventivas y antitumorales. Compuestos como el ácido perílico, ácido dihidroperílico, uroterpenol y limoneno 1,2-diol, inhiben el

crecimiento tumoral a través de la inhibición de la señalización dependiente de p21⁶.

Actualmente la mayor obtención de aceite esencial de limoneno es resultado de los residuos de la industria de jugos cítricos, con una pureza de hasta el 99%. Una vez los cítricos son exprimidos, este aceite esencial es extraído de las cáscaras mediante tecnologías de extracción por solventes, destilación de vapor extracción súper crítica de CO₂⁷. Sin embargo, las cáscaras de naranjas contienen aproximadamente un 5% de limoneno, por lo que son requeridas grandes cantidades de materia vegetal. Asimismo, la producción de cítricos a nivel mundial se ve ampliamente afectada por condiciones climáticas y estacionales ocasionando una alta fluctuación e incremento en el valor del limoneno⁸. Debido a la alta demanda de materia vegetal necesaria, así como los laboriosos y costosos métodos convencionales para la extracción de limoneno, se han buscado alternativas para la obtención de este. Una de estas alternativas es mediante ingeniería metabólica para la modificación o regulación de rutas metabólicas de microorganismo⁹. El objetivo del presente trabajo es presentar los últimos avances relacionados a la producción de limoneno utilizando *Escherichia coli*.

Biosíntesis de limoneno

En la actualidad se han identificado dos rutas metabólicas para la síntesis de isoprenos, la vía del mevalonato (MVA) y la ruta 4-fosfato de metileritritol (MEP). El limoneno al ser un isopreno, su biosíntesis está basada en dichas rutas que forman dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP). La condensación de ambos metabolitos da como resultado geranyl-difosfato (GPP), siendo el precursor principal, y que por acción de la enzima limoneno sintasa se obtiene el limoneno¹⁰.

Ruta del 4-fosfato de metileritritol (MEP)

También conocida como la ruta 1-desoxi-D- xilulosa-5-fosfato (DXP), la ruta MEP es comúnmente realizada en plantas, algas, bacterias¹¹ y algunos parásitos. En las plantas, la vía metabólica es realizada dentro de los plástidos¹². Esta ruta está compuesta por una serie de 7 reacciones enzimáticas. Los precursores iniciales son piruvato (pyr) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P), que por acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS) se condensan formando DXP¹³. Posteriormente ésta es reducida a MEP gracias a la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR).

Una vez obtenida la síntesis de MEP, se lleva a cabo la formación de 4-(citidina 5-difosfo)-2-C metil-D-eritritol (CDP-ME), en una reacción dependiente de CTP, la cual es catalizada por la enzima 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa (MCT). Seguido, CDP-ME sufre una fosforilación por acción de la 4-(citidina 5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa (CMK), teniendo como resultado 2-fosfo-4-(citidina5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol(CDP-MEP), la cual es transformada a 2-C-metil-D eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP), por acción de la enzima 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS)¹⁴. MEcPP es reducido a 4-hidroxi-3-metilbut- 2-enildifosfato (HMBPP) catalizada por la enzima HMBPP sintasa (HDS). Finalmente, HMBPP es convertido en IPP y DMAPP por la enzima HMBPP reductasa (HDR).

Ruta del Mevalonato (MVA)

La vía del Mevalonato (MVA), es la encargada de la producción de isoprenos en células eucariotas, arqueas y algunas

bacterias GRAM positivas¹⁵. En animales esta vía está muy relacionada con la biosíntesis de la membrana, debido a que los principales isoprenoides producidos son: el colesterol, dolicoles y ubiquinona¹⁶.

En plantas, esta vía metabólica se realiza en el citosol. Esta ruta está compuesta por una serie de 6 reacciones enzimáticas, la cual comienza con la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA (Ac-CoA) formando Acetoacetil-CoA (AcAc-CoA) mediante la Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT). La enzima HMG-CoA sintasa (HMGS) realiza una segunda condensación entre un Acetil-CoA con el Acetoacetil-CoA previamente formando, dando como resultado 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR) cataliza la conversión de HMG-CoA en mevalonato (MVA)¹⁷.

Una vez obtenido el mevalonato, se llevan a cabo dos reacciones de fosforilación consecutivas, la primera siendo catalizada por la enzima mevalonato cinasa (MVK) dando como producto al mevalonato-5-fosfato (MVA-5-P). El mevalonato-5- fosfato se fosforila nuevamente en la posición 5-OH mediante la enzima fosfomevalonato cinasa (PMK), para producir mevalonato-5-pirofosfato (MVA-5-P). Por último, la enzima difosfomevalonato descarboxilasa (MDV), cataliza la conversión de MVPP a Pirofosfato de isopentenilo (IPP) mediante una reacción de descarboxilación dependiente de ATP¹⁶.

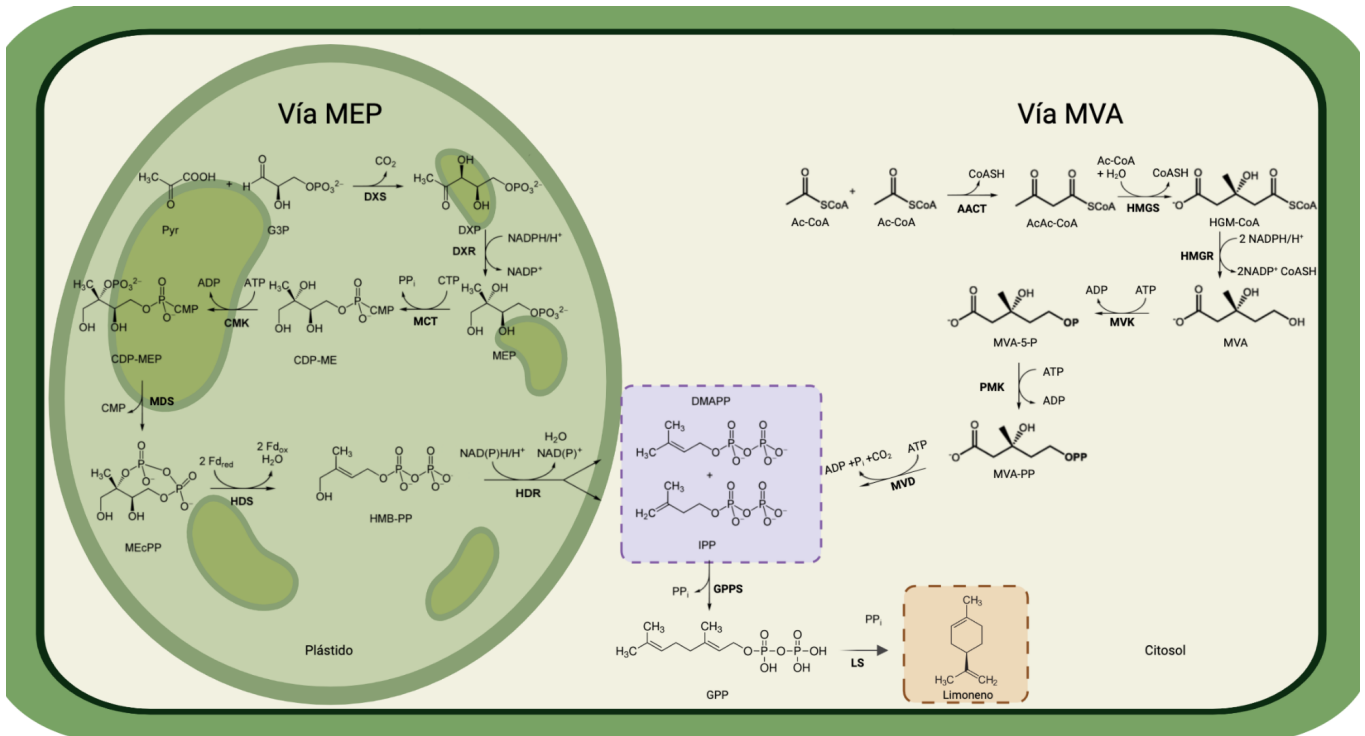


Figura 1. Ejemplificación de las rutas metabólicas empleadas en la biosíntesis de isoprenos: Ruta MEP y MVA, para la obtención del limoneno. Donde MEP 4-fosfato de metileritritol; piruvato (pyr) gliceraldehído-3-fosfato (G3P); 1-desoxi-D- xilulosa-5-fosfato (DXP); 1-desoxi-D- xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS); 1-desoxi-D- xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR); 4-(citidina 5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME); 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidiltransferasa (MCT) 4-(citidina 5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol cinasa (CMK); 2-fosfo-4-(citidina5-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol(CDP-MEP); 2-C-metil-D eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP); 2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintasa (MDS);4-hidroxi-3-metilbut- 2-enildifosfato (HMBPP); HMBPP sintasa (HDS); HMBPP reductasa (HDR); dimetilalil difosfato (DMAPP); isopentenil difosfato (IPP); Acetil-CoA (Ac-CoA) ; Acetoacetil-CoA (AcAc-CoA); Acetoacetil-CoA tiolasa (AACT); HMG-CoA sintasa (HMGS); 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA); HMG-CoA reductasa (HMGR); mevalonato (MVA); mevalonato cinasa (MVK); mevalonato-5-fosfato(MVA-5-P); fosfomevalonato cinasa (PMK); difosfomevalonato descarboxilasa (MDV);geranil difosfato (GPP); geranil difosfato sintasa (GPPS); Limoneno Sintasa (LS).

Síntesis y transformación del GPP

Una vez estas rutas son completadas, la Isopentenil difosfato isomerasa (IDI) realiza la isomerización de difosfato de isopentenilo (IPP) a difosfato de dimetilalilo (DMAPP), su isómero altamente electrofílico. Este es un paso crucial en la biosíntesis de isoprenoides, ya que ambas moléculas son necesarias en los pasos secuenciales de la biosíntesis de limoneno¹⁸.

La geranyl difosfato sintasa (GPPS), cataliza una reacción de condensación entre los isómeros IPP y DMAPP, formando el geranyl difosfato (GPP), el cual como se mencionó anteriormente es el precursor clave de la biosíntesis de limoneno y otros monoterpenos¹⁹. Por último la (-)-limoneno sintasa realiza una reacción de ciclación al geranyl difosfato, quedando como resultado de dicha reacción el S-limoneno²⁰.

Limoneno Sintasa (LS)

LS cataliza el punto terminal en las vías de biosíntesis de limoneno. Por lo que utilizar la limoneno sintasa adecuada en la producción microbiana es de vital importancia para producción eficiente de limoneno. Se han identificado sintasas que convierten GPP en limoneno en 27 especies de nueve familias de plantas. De las cuales las LS de *Agastache rugose*, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshiu*, *Mentha spicata*, *Perilla frutescens*, *Schizonepeta tenuifolia* y *Solanum habrochaites*; ya han sido expresadas en microorganismos²¹.

Las sintasas a menudo producen un enantiómero predominante de limoneno, ya sea (-) o (+). Por lo que, para fines humanos, una sintasa que produzca únicamente el enantiómero (-) sería ideal en la síntesis microbiana.

Srividya et al. (2015) determinaron mediante cristalografía la divergencia de la secuencia de aminoácidos, que la limoneno sintasa de menta verde (*Mentha spicata*) genera >99% (-) limoneno sobre un 1% de (+)-limoneno. Convirtiendo a esta enzima en la alternativa más viable²⁰.

Producción de limoneno en *Escherichia coli*

En la actualidad, los estudios enfocados en la producción de limoneno mediante microorganismos son escasos, siendo un área atractiva de estudio. Debido a la abundante información metabólica, las herramientas de ingeniería genética y su alta tasa de crecimiento, el uso de *E. coli* en la producción de limoneno resulta una buena alternativa²².

Carter et al. (2003) produjeron limoneno mediante *E. coli*, para ello introdujeron dos genes, los cuales codifican los pasos secuenciales de la biosíntesis de limoneno a partir de IPP y DMAPP. El gen de geranyl difosfato sintasa (proveniente de *Abies grandis*) fue insertado dentro del vector de alta expresión pET37, mientras que el gen de limoneno sintasa (gen de *Mentha spicata*) fue insertado en el vector pBAD. De

esta manera células de *E. coli* BRL(DE3) Codon Plus-RIL fueron transformadas con ambas construcciones, obteniendo una producción de limoneno de 5 mg/L²³.

Uno de los principales problemas de la producción de limoneno con *E. coli* es que los sustratos IPP y DMAPP no se producen en cantidades suficientes dentro de la célula, lo que limita la velocidad de reacción de la geranyl difosfato sintasa (GPPS). Un enfoque de ingeniería metabólica, dirigido a aumentar la disponibilidad de GPP, sería necesario para una producción económicamente exitosa de limoneno²³.

Como se mencionó anteriormente, la vía de mevalonato es más eficiente energéticamente hablando que la vía MEP²⁴. Es por esta razón que se ha optado por introducir la vía del mevalonato de *Saccharomyces cerevisiae* en *E. coli*.

Alonso-Gutierrez et al. (2013) introdujeron la ruta MEP en *E. coli* utilizando el plásmido pJBEI-6410, el cual toma como base los plásmidos pMevT y pMBI. El plásmido pMevT, contiene los genes para codificar las enzimas de la primera mitad de la vía metabólica del mevalonato, este plásmido es previamente modificado, reemplazando el gen de la HMG-CoA sintasa (*erg13*) y el gen HMG-CoA reductasa (*thmGR1*) de *S. cerevisiae* por los de *S. aureus* (operón MTSA), manteniendo el gen de la acetoacetil-CoA tiolasa (*atoB*) de *E. coli*²⁵.

El plásmido pMBIS contiene el promotor P_{lac} y los genes de mevalonato cinasa (*erg12*), fosfomevalonato cinasa (*erg8*) y difosfomevalonato descarboxilasa (*erg19*) de *S. cerevisiae*, así como el gen de la isomerasa IPP/DMAPP de *E. coli* (*idi1*)²⁶. Otro de los plásmidos utilizados para la síntesis de limoneno es el pTrc-GPPS (co)-LS, el cual tiene el gen de geranyl difosfato sintasa (proveniente de *Abies grandis*) y el gen de limoneno sintasa (gen de *Mentha spicata*) con los codones optimizados para *E. coli*.

Estudios han demostrado que la cepa de *E. coli* DH1 transformada con el plásmido pJBEI-6410, en medios con una concentración mínima de glucosa 1%, junto con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor (25μM) permite una producción de limoneno cercana a 435 mg/L, en 72 h de fermentación.

Algunas opciones para la optimización de la producción de limoneno mediante microorganismos es controlar o disminuir la toxicidad que generan los monoterpenos para el huésped productor y mejorar la recuperación de productos *in situ*, para que estos sean económicamente factibles²⁵.

Willrodt et al. (2014), construyeron un plásmido integrando el plásmido pMevT (sin alguna modificación), dentro del plásmido pMBIS, generando lo que nombraron plásmido pMVAidi. De este proyecto aún se propone la optimización del flujo de metabolitos intracelulares hacia acetil-coA y las condiciones de cultivo y producción²⁷.

El plásmido pMVAidi se utilizó con la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para la obtención del (S)-limoneno en un sistema de

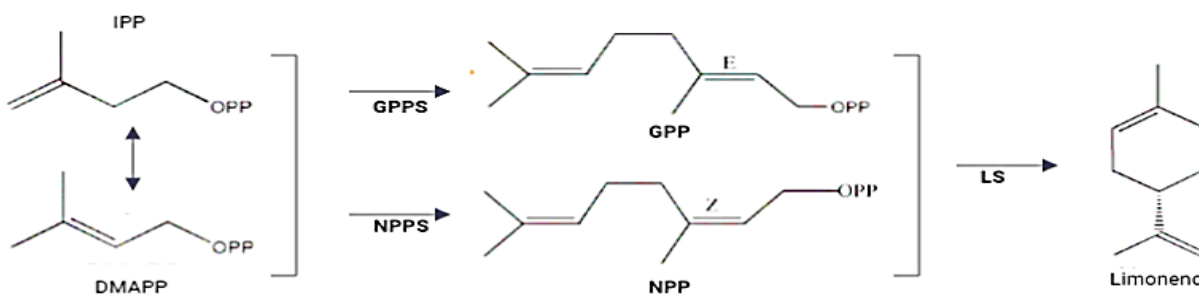


Figura 2. Ruta alterna para la formación de limoneno a partir de neril difosfato (NPPS) como precursor directo. La enzima NPP sintasa (NPPS) cataliza la condensación de la DMAPP e IPP.

lote alimentado de dos fases líquidas, DINP como disolvente portador orgánico y dos fuentes de carbono (glucosa y glicerol) (2:1).

El DINP se utilizó para evitar la inhibición del producto, los efectos de toxicidad del hidropéroxido de limoneno y la pérdida por evaporación de limoneno. De las fuentes de carbono utilizadas, el glicerol presentó la mayor producción de limoneno (2.77 g/L)²⁸.

Rolf et al. (2020) emplearon la cepa de *E. coli Lac1^a* para poder llevar una expresión controlada.

Se utilizó el plásmido pJBEI-6410 con codones optimizados y con una modificación en el casete de resistencia con ampicilina. La síntesis de limoneno se llevó a cabo con 0.1 mM isopropil B- D -1- tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor, obteniendo rendimientos de biomasa superior a 22mg/g)²⁹.

Modificaciones en rutas metabólicas es otra opción en la producción de limoneno. Wu et al. (2019) realizaron modificaciones en la ruta metabólica de *E. coli*, empleando GPP como precursor en sustitución a Neril Difosfato (NPP)³⁰. El Neril Difosfato, siendo el isómero cis de GPP (Figura 2), ha demostrado su utilidad para la biosíntesis de monoterpenos como precursor, además de que se ha reportado que dicho suceso ocurre en algunas plantas^{31,32}.

Wu et al. (2019) desarrollaron múltiples plásmidos y cepas, creando una ruta MVA heteróloga con enzimas provenientes de distintos organismos, entre estos *Enterococcus faecalis*, *S. cerevisiae*, *A. Anthonomus grandis*, *M. spicata*, *Methanosarcina mazei* y *Solanum lycopersicum* obtuvieron logrando una producción de limoneno de 1.29 g/L³⁰.

E. coli ELIM78 es una de las cepas que han mostrado mayores rendimientos, para esta cepa emplearon 3 plásmidos, pMAP6, pISP6 y pNLSt1. El plásmido pMAP6 contiene los genes que codifican las enzimas necesarias para la conversión de Ac-CoA a MVA; MvaE y MvaSA110G (mutación en la enzima MvaS que permite una catálisis mayor de AcAc-CoA a HMG-CoA). Dichas enzimas son pertenecientes a *Enterococcus faecalis* y brindan mayor eficiencia, además de modificaciones de que contienen para sitios de unión del Ribosoma (RBS) lo que incrementa la síntesis de MVA.

Mientras tanto el plásmido pISP6 codifica los genes de MVK (*Methanosarcina mazei*), PMK MDV e IDI, los últimos tres provenientes de *S. cerevisiae*.

Finalmente, el plásmido pNLSt1, contiene el gen que codifica la enzima Neril difosfato sintasa (NPPS) de *Solanum lycopersicum*, así como la enzima LS de *M. spicata*³⁰.

Por otra parte, el uso de residuos industriales como fuente de carbono orgánica para la producción de metabolitos de valor añadido en un organismo, es una alternativa que ha tomado importancia en estos últimos años. Este enfoque tiene la finalidad de abaratar los costos de producción y volver económicamente viable la biosíntesis de un producto.

Zebec et al. (2022) utilizaron como fuente de carbono los residuos generados de las industrias textiles y de la producción de cartón. En total usaron 6 tipos distintos de desechos o sustratos (H1 a H6), los cuales iban desde residuos post industriales textiles, conformados de 100% algodón y sin colorantes, pasando por residuos textiles postconsumo, conformados únicamente por ropa desechada, hasta llegar a cartón puro de la industria de procesamiento de papel³³.

Para la síntesis de limoneno en base a estos sustratos, utilizaron la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pJBEI-6410, previamente reportado por Alonso-Gutierrez et al. (2013)²⁵. Esta cepa fue cultivada en medio M9 complementado con los distintos sustratos como fuente de carbono, hasta generar una concentración de glucosa final de 0.4%. La producción de limoneno se indujo mediante la adición de IPTG 25 µM. Si bien, se observó la producción de limoneno con todos los sustratos. Fue el H1 (residuo médico 100 % algodón de color blanco puro) el que presentó el mayor rendimiento, obteniendo una concentración de 650 mg/litro.

Si bien estos resultados representan una alternativa real a los medios de cultivo tradicionales, es necesario seguir optimizando el pretratamiento y medio de cultivo de estos sustratos, ya que los mismos autores reportan que la producción de limoneno con glucosa pura en medio M9 genera una concentración máxima de 1300 mg/L. Además de que se debe analizar a profundidad los efectos adversos que generan colorantes y aditivos encontrados en los sustratos al crecimiento y metabolismo de *E. coli*³³.

Perspectivas a Futuro

A lo largo de los años, la síntesis de terpenos, entre estos el limoneno, ha evolucionado. El uso de microorganismos para su obtención ha sido sujeto de evaluación por años recientes obteniendo resultados de hasta 7.3 g/L.

Sin embargo, Sun et al. (2020) realizaron un análisis técnico-económico, el cual permitió identificar la poca viabilidad económica que tiene en la actualidad, debido a sus bajos rendimientos³⁴. Y es que, para que sea factible la producción de limoneno a grado industrial, se requiere de rendimientos igual o superiores a 1 kg/m³h y en la actualidad se ha logrado rendimientos de hasta 0.03 kg/m³h²⁹, debido a la extracción y purificación del soluto de interés.

Es fundamental aumentar los rendimientos de obtención de limoneno, así como la conversión de fuente de azúcar a limoneno para lograr precios competitivos y que la obtención biotecnológica del monoterpeno sea redituable.

Así mismo, es indispensable continuar con la experimentación en diseños de vías metabólicas ortogonales o artificiales en *E. coli*, esto con el fin de evitar la rigidez metabólica y lograr una distribución adecuada del flujo de carbono.

Saccharomyces cerevisiae ha sido el microorganismo que más atención ha recibido con respecto al diseño y construcción de la vía ortogonal de limoneno (NPP), por lo que se podrían considerar los resultados y estrategias reportadas con este microorganismo, para futuras aplicaciones y estudios utilizando a *E. coli* como modelo.

Además de esta vía, Clomburg et al. (2019) diseñaron el prototipo de una ruta no natural para la biosíntesis de isoprenoides, denominada ruta del alcohol isoprenoide (IPA). Esta vía se centra en la síntesis del IPA a partir de glicerol, para su posterior fosforilación a IPP³⁵.

Contribución de los autores

A.D.M, Búsqueda de información y escritura

A.L.B.P, Elaboración de gráficos y redacción

J.A.G.A, Escritura de artículo

C.R.G, Revisión de información, redacción de artículo

M.E.G, Revisión y edición de artículo

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Presentaciones previas

Ninguna.

Referencias

- Bhavanirama, S., Vishunupriya, S., Saleh Al-Aboody, M., Vijayakumar, R., Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications. *Grain and Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- American Chemical Society (2021). Molecule of the Week Archive, Limonene. Recuperado el 14 Febrero, 2023 de <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/l/limonene.html>.
- Nikfar, S., & Behboudi, A. F. (2014). Limonene. En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 78-82). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00628-X>
- Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez-Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: A versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 50(97), 15288-15296. <https://doi.org/10.1039/c4cc06147k>
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., & Vanitha, M. K. (2021). D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1), e13566. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13566>
- Mukhtar, Y. M., Adu-Frimpong, M., Xu, X., & Yu, J. (2018). Biochemical significance of limonene and its metabolites: Future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Bioscience Reports*, 38(6), BSR20181253. <https://doi.org/10.1042/BSR20181253>
- Siddiqui, S. A., Pahmeyer, M. J., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2022). Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. *Industrial Crops and Products*, 177, 114484. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114484>
- Ren, Y., Liu, S., Jin, G., Yang, X., & Zhou, Y. J. (2020). Microbial production of limonene and its derivatives: Achievements and perspectives. *Biotechnology Advances*, 44, 107628. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107628>
- Liu, Y., Ma, X., Liang, H., Stephanopoulos, G., & Zhou, K. (2021). Monoterpenoid biosynthesis by engineered microbes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 48(9-10), kuab065. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab065>
- Vickers, C. E., Bongers, M., Liu, Q., Delatte, T., & Bouwmeester, H. (2014). Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant, Cell & Environment*, 37(8), 1753-1775. <https://doi.org/10.1111/pce.12316>
- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 665-700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Bergman, M. E., Davis, B., & Phillips, M. A. (2019). Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*, 24(21), Art. 21. <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>
- Banerjee, A., & Sharkey, T. D. (2014). Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Natural Product Reports*, 31(8), 1043-1055. <https://doi.org/10.1039/c3np70124g>
- Guo, J., Cao, Y., Xian, M., & Liu, H. (2016). [Advances in metabolic engineering of *Escherichia coli* for isoprene biosynthesis]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 32(8), 1026-1037. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.150516>
- Chandran, S. S., Kealey, J. T., & Reeves, C. D. (2011). Microbial production of isoprenoids. *Process Biochemistry*, 46(9), 1703-1710. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.012>
- Liao, P., Hemmerlin, A., Bach, T. J., & Chye, M.-L. (2016). The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances*, 34(5), 697-713. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.03.005>
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(2), 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>
- Wu, Z., Wouters, J., & Poulter, C. D. (2005). Isopentenyl Diphosphate Isomerase. Mechanism-Based Inhibition by Diene Analogues of Isopentenyl Diphosphate and Dimethylallyl Diphosphate. *Journal of the American Chemical Society*, 127(49), 17433-17438. <https://doi.org/10.1021/ja056187h>
- Zhou, J., Wang, C., Yang, L., Choi, E.-S., & Kim, S.-W. (2015). Geranyl diphosphate synthase: An important regulation point in balancing a recombinant monoterpene pathway in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 68, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.10.005>
- Srividya, N., Davis, E. M., Croteau, R. B., & Lange, B. M. (2015). Functional analysis of (4S)-limonene synthase mutants reveals determinants of catalytic outcome in a model monoterpene synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3332-3337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501203112>
- Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H., & Beekwilder, J. (2016). Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2927-2938. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7337-7>
- Wang, C., Zada, B., Wei, G., & Kim, S.-W. (2017). Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 241, 430-438. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.168>
- Carter, O. A., Peters, R. J., & Croteau, R. (2003). Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry*, 64(2), 425-433. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00204-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00204-8)
- Navale, G. R., Dharne, M. S., & Shinde, S. S. (2021). Metabolic engineering and synthetic biology for isoprenoid production in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 457-475. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11040-w>
- Alonso-Gutierrez, J., Chan, R., Bath, T. S., Adams, P. D., Keasling, J. D., Petzold, C. J., & Lee, T. S. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic Engineering*, 19, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.mben.2013.05.004>
- Martin, V. J. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., & Keasling, J. D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 21(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/nbt833>
- Willrodt, C., David, C., Cornelissen, S., Bühler, B., Julsing, M. K., & Schmid, A. (2014). Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1000-1012. <https://doi.org/10.1002/biot.201400023>
- Chubukov, V., Mingardon, F., Schackwitz, W., Baidoo, E. E. K., Alonso-Gutierrez, J., Hu, Q., Lee, T. S., Keasling, J. D., & Mukhopadhyay, A. (2015). Acute Limonene Toxicity in *Escherichia coli* Is Caused by Limonene Hydroperoxide and Alleviated by a Point Mutation in Alkyl Hydroperoxidase AhpC. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4690-4696. <https://doi.org/10.1128/AEM.01102-15>
- Rolf, J., Julsing, M. K., Rosenthal, K., & Lütz, S. (2020). A Gram-Scale Limonene Production Process with Engineered *Escherichia coli*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), 1881. <https://doi.org/10.3390/molecules25081881>
- Wu, J., Cheng, S., Cao, J., Qiao, J., & Zhao, G.-R. (2019). Systematic Optimization of Limonene Production in Engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(25), 7087-7097. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01427>
- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I., Larson, M., Xu, R., Charbonneau, A. L., Schmidt, A., Wilkerson, C., Last, R. L., &

- Pichersky, E. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), 10865-10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904113106>
32. Zhang, M., Liu, J., Li, K., & Yu, D. (2013). Identification and Characterization of a Novel Monoterpene Synthase from Soybean Restricted to Neryl Diphosphate Precursor. *PLoS ONE*, 8(10), e75972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075972>
33. Zebec, Ž., Poberžnik, M., & Lobnik, A. (2022). Enzymatic Hydrolysis of Textile and Cardboard Waste as a Glucose Source for the Production of Limonene in *Escherichia coli*. *Life*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/life12091423>
34. Sun, C., Theodoropoulos, C., & Scrutton, N. S. (2020). Techno-economic assessment of microbial limonene production. *Bioresource Technology*, 300, 122666. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122666>
35. Clomburg, J. M., Qian, S., Tan, Z., Cheong, S., & Gonzalez, R. (2019). The isoprenoid alcohol pathway, a synthetic route for isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(26), 12810-12815. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821004116>