

00581
5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACION DE
LUTEINA**

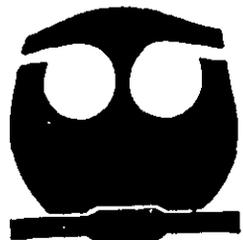
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

MA. DE LOS ANGELES SANCHEZ CONTRERAS



291530

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Dra. Rachel Mata Essayag	Presidente
Dr. Alfredo Ortega Hernández	Vocal
Dra. Maria Amanda Gálvez Mariscal	Vocal
Dr. Leobardo Serrano Carreón	Vocal
Dr. Eduardo Bárzana García	Secretario
Dr. Arturo Navarro Ocaña	Suplente
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Suplente

Este trabajo se realizo en el departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Agradezco al los integrantes de mi comité tutorial

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Dr. Alfredo Ortega Hernández
Dr. Manuel Jiménez Estrada

Por que gran parte de los logros de este trabajo se deben a sus atinados comentarios y porque son ellos los que han sido parte de mi formación.

Agradezco también a los integrantes del jurado por tomarse el tiempo para la revisión de este trabajo y por haberlo enriquecido con sus comentarios especialmente al Dr. Ortega.

Quiero Agradecer especialmente al Dr. Sánchez y al Dr. Jiménez porque además de compartirme sus conocimientos han sido excelentes amigos.

En general gracias a todos mis amigos y compañeros

Finalmente, quiero hacer extensivo este agradecimiento a todo el personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Para Simón y Miranda con todo mi amor

A mis padres, hermanos, cuñadas y sobrinos, gracias
por el amor y apoyo que siempre me han brindado

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de figuras	ii
Lista de tablas	iii
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Antecedentes	
• Generalidades de los carotenoides	6
• Los carotenoides como precursores de sabores y fragancias	11
• Métodos biotecnológicos utilizados en la producción de aromas a partir de carotenoides	16
A) Enzimas	16
B) Microorganismos	19
C) Tejidos vegetales o cultivos celulares	20
Justificación	22
Objetivos	23
Hipótesis	24
Resultados I	25
Artículo: Bioconversión of lutein to products with aroma	
Resultados II	
Degradación de luteína por un filtrado libre de células (Ruptura oxidativa)	27
Zimograma	31
Fermentación con diferentes concentraciones de luteína.	31
Degradación de Zeaxantina	34
Discusión	37
Conclusiones	41
Perspectivas	42
Referencias	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Principales carotenoides empleados como aditivos en alimentos y forrajes	6
2. Enlaces de los carotenoides susceptibles al ataque regioselectivo de dioxigenasas.	12
3. Gel SDS-poliacrilamida 10%	29
4. Gel SDS-poliacrilamida 12 %	30
5. Efecto de la concentración de luteína sobre su velocidad de degradación a las 24h de fermentación	32
6. Representación de Eadie-Hofstee, para calcular V_{max} y K_m	33
7. Cromatografía en capa fina de la degradación de luteína y zeaxantina en función del tiempo	35
8. Cinética de degradación de luteína y zeaxantina	36

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Ejemplos de compuestos con aroma derivados de constituyentes celulares	5
2. Carotenoides usados como aditivos en forma de extractos naturales	8
3. Productos de degradación de carotenoides comúnmente encontrados en plantas	14
4. Clasificación y ejemplos de sistemas enzimáticos usados industrialmente para mejorar la calidad del sabor y el aroma de los alimentos	18
5. Caracterización de dos enon-reductasas de <i>Nicotiana tabacum</i>	21

RESUMEN

La luteína es un hidroxí-carotenoide abundante en la flor de cempasúchitl. Su valor comercial es bajo y se emplea como un aditivo en alimento para aves de corral. En este trabajo, se aislaron 19 colonias capaces de degradar luteína en un medio químicamente definido, adicionando harina de flor de cempasúchitl como fuente de carbono. Dos de estas colonias generaron compuestos volátiles durante la fermentación, una de ellas se escogió para estudios posteriores por su capacidad de generar un fuerte aroma a tabaco. Mediante la aplicación de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) se identificaron cuatro componentes en este aroma: el 7,8-dihidro- β -ionol, la β -ionona, el 7,8-dihidro- β -ionona y la 3-hidroxi- β -ionona en una proporción porcentual de 84.2, 9.4, 3.5, y 2.9, respectivamente. La colonia seleccionada contenía dos microorganismos que se identificaron como *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp. El aroma se produce por la degradación de luteína o zeaxantina durante la fase de crecimiento de la mezcla de microorganismos. De manera adicional se logró la degradación de luteína por un filtrado enzimático, aislado de los medios de cultivo de ambos microorganismos. Este trabajo propone que la bioconversión de luteína a productos con aroma se realiza en varias etapas, a través de reacciones catalizadas por tres sistemas enzimáticos diferentes: I) deshidroxilación, II) ruptura oxidativa y III) dos reducciones sucesivas, de modo que la caracterización posterior de cada sistema enzimático resulta de interés.

SUMMARY

Lutein is a xanthophyll that is abundant in marigold flower. Its commercial value is low and it is used as an additive in poultry food. In this work, 19 colonies were isolated for their ability to degrade lutein in a chemically defined medium supplemented with marigold flower flour as carbon source. Among the colonies isolated, two of them generated volatile compounds during fermentation, one of these was chosen for further study because of its ability to produce a strong tobacco smell. Using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), four compounds were identified: 7,8-dihydro- β -ionol, β -ionone, 7,8-dihydro- β -ionone and 3-hydroxy- β -ionone in proportions of 84.2%, 9.4%, 3.5%, and 2.9%, respectively. This colony contained two microorganisms, identified as *Geotrichum* sp. and *Bacillus* sp. The aroma production is by lutein or zeaxanthine degradation during wrought of the microorganisms mixture. However, lutein degradation has also been achieved by a cell-free extract isolated from the culture medium of both microorganisms. This work suggests that bioconversion of lutein to products with aroma is carried out in three stages: I) dehydroxylation, II) oxidative cleavage and III) tow successive reductions, and that in each one of these stages the reactions are catalyzed by different enzymatic systems. Further studies of these enzymatic mechanisms will be needed to complete the characterization of this system.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides como precursores de vitamina A, son considerados como factores nutricionales importantes que además confieren sus colores distintivos a las flores, frutos y verduras. Estos compuestos son una subclase de terpenoides con colores amarillo brillante, naranja y rojo; se encuentran en plantas y vegetales tales como tomates, perejil, toronja rosada y espinaca, entre otros. Los carotenoides también dan colores brillantes a algunos animales, los flamings deben su color a los carotenoides, así como los mariscos y las yemas de los huevos (Winterhalter 1996).

A la fecha se han identificado 600 diferentes carotenoides aislados de fuentes naturales. Estudios recientes se han centrado en la investigación de sus beneficios para la salud humana. Solo alrededor de 40 de estos carotenoides son consumidos regularmente en la dieta, unos cuantos se adicionan a alimentos procesados, bebidas y forrajes principalmente en forma de extractos naturales y solo seis son producidos industrialmente por síntesis química (Britton et al., 1995). Los carotenoides producidos por síntesis química se emplean principalmente en la industria farmacéutica y de alimentos, su producción se limita a los pigmentos de mayor demanda como el β -caroteno, licopeno, astaxantina, β -apo-8-carotenal, cantaxantina y bixina (Paust, 1996). Se ha probado que, además de su capacidad pigmentante, los carotenos y algunas xantofilas contribuyen al sabor y aroma de algunos alimentos (Winterhalter, 1996). Sin embargo, actualmente existe una discusión sobre la verdadera función de los carotenoides en los diferentes sistemas vivos (Demming-Adams et al., 1996).

Poco es lo que se ha investigado acerca de la función que tienen estos carotenoides en los sistemas vegetales que los producen. Al respecto se ha probando que casi todos los constituyentes celulares pueden ser metabolizados y/o degradados a uno o más tipos de compuestos con aroma (Whitehead 1998) (Tabla 1). De una manera general los compuestos que confieren sabores y aromas agradables en diversos productos alimenticios pueden ser divididos en dos grupos. Se considera como aromas primarios a los compuestos orgánicamente activos que son sintetizados por rutas bioquímicas definidas, mientras que los aromas secundarios son formados por una ruptura química, o por la interacción entre varios componentes de los alimentos como grasas, aminoácidos, azúcares, carotenos, etc., durante los procesos de cocción y/o maduración (Whitehead 1998). Aunque no se descarta que un mismo compuesto pueda ser formado por ambas rutas.

Actualmente, a pesar de los esfuerzos en la comprensión de los mecanismos de formación de los compuestos con aroma derivados de carotenoides, todavía se sabe poco sobre los pasos iniciales de la biodegradación de carotenoides (Schwartz et al. 1997). Se sabe que cuando las plantas maduran o mueren, la clorofila disminuye rápidamente y virtualmente desaparece y que los pigmentos amarillo-naranja disminuyen gradualmente sin desaparecer del todo (Sanderson y Gonzalez, 1971). Es así que algunos cítricos, cuando maduran, cambian su color verde a amarillo-naranja y que algunas flores conservan sus colores brillantes aun cuando se han secado, pero ¿qué relación tiene este efecto con los aromas y sabores agradables que adquieren algunas flores y frutos durante su maduración?

Tabla 1. Ejemplos de compuestos con aroma derivados de constituyentes celulares.

Precursor	Grupos químicos de compuestos con aroma formados	Ejemplos	Descripción general del olor
Ac. Mevalónico	Monoterpenos	(S)-(+)-Carvona	Espicias
Carotenoides	Iononas	β -Ionona β -Damascona	Cedro Semejante a madera
Carbohidratos	Furanonas	Furaneol	Frutal, caramelo
Ac. Grasos	Aldehídos	Hexanal	Grasa
	Alcoholes	(R)-(-)-1-Octen-3-ol	Hongos
	Lactonas	(R)-(+)- γ -Decalactona	Pistache
	Metil-cetonas	2-Undedacona	Queso
	Ciclopentanonas	(+)-cis-Metil jasmonato	Floral
Lignina	Fenoles	Vainillina	Vainilla
Proteínas	Acidos	Ac. Fenilacetico	Miel
Alcoholes + ácidos	Esteres	Etil heptanoato	Cofiac
Azúcares + aminoácidos	Aldehídos	Isovaleraldehido	Chocolate
	Pirazinas	2,3,5-Trimetilpirazina	Semejante al café
Acidos Nucleicos	Mononucleotidos	Guanosina-5-monofosfato'	ahumado

Whitehead I. 1998

En este trabajo se realizó una revisión general de los carotenoides naturales y se estudio la biodegradación del hidroxicarotenoide luteína, empleando un sistema microbiano para la producción de iononas.

GENERALIDADES DE LOS CAROTENOIDES

La familia de los carotenoides actualmente considera dos tipos de moléculas, los carotenos y las xantofilas. Los carotenos son clasificados químicamente como tetraterpenos, compuestos hidrocarbonados de 40 átomos de carbono, dentro de este grupo de carotenoides se clasifica al β -caroteno. Las xantofilas son los derivados oxigenados de los tetraterpenoides. Son moléculas con grupos ceto o hidroxilos entre los cuales se clasifica a la luteína y zeaxantina (Britton, 1991) Fig. 1

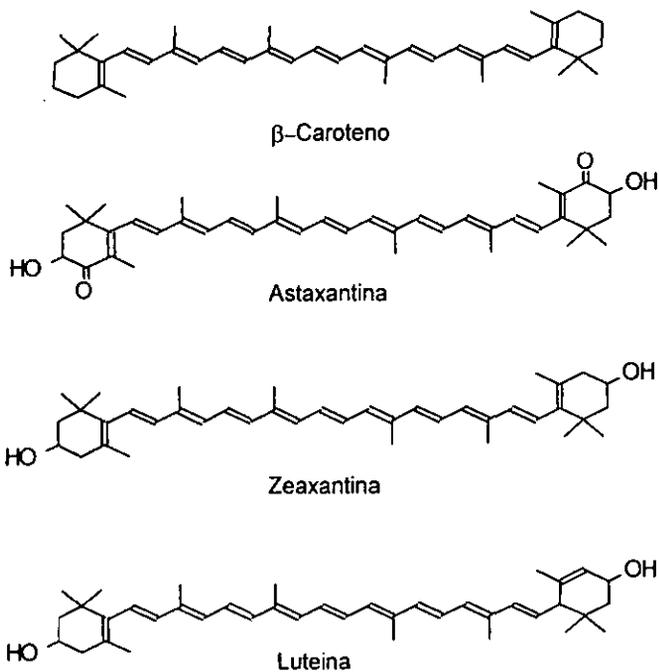


Figura 1. Principales carotenoides empleados como aditivos en alimentos y forrajes.

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunas flores y vegetales deben su color a estos compuestos, también son producidos por bacterias y cianobacterias fotosintéticas, por algunas especies de bacterias no fotosintéticas e incluso algunas algas y hongos también producen carotenoides (Armstrong 1997 y Armstrong & Hearst 1996). Durante mucho tiempo se han usado extractos de plantas como fuentes de carotenoides, los concentrados de maíz, alfalfa y flor de cempasúchitl (*Tagetes erecta*) se venden como pigmentos para usos diversos. La luteína se encuentra en una gran variedad de frutas y verduras, mango, papaya, naranjas, kiwi, duraznos, brócoli, col de bruselas, lechuga, calabazas, etc., pero comercialmente la fuente de obtención de la luteína son los pétalos de la flor del cempasúchitl ya que estos contienen de 70 a 80 % de luteína y hasta 5% de zeaxantina (Gomez et al., 1978 y Hadden et al. 1999). El cempasúchitl es una planta ornamental de temporada nativa de México y Sudamérica, produce flores grandes de color naranja o amarillo con pétalos dobles o sencillos. En México la producción de cempasúchitl es por temporada, pero algunas industrias nacionales que comercializan pigmentos naturales, tienen contratos con los productores agrícolas para producir flor de cempasúchitl en zonas de riego como Guanajuato y Monterrey. En 1995 esta producción fue del orden de 88,771 TM y se estima que se ha incrementado en un 15 % (Bioquimex). De los pétalos de la flor de cempasúchitl se extraen los pigmentos, estos se emplean de acuerdo a su pureza en la industria alimentaria o bien en forma de harinas en la elaboración de alimentos balanceados para aves de corral. Actualmente se comercializa en forma de extracto natural y como reactivo analítico, su precio como

reactivo analítico oscila entre \$1000 y \$1500 US Dlls por gramo (Britton et al., 1995). Los carotenoides más usados como aditivos en forma de extractos naturales se muestran en la tabla 2.

Tradicionalmente los carotenoides han sido llamados con nombres triviales, refiriéndose a la fuente de la cual se aislaron por primera vez. En la actualidad, aunque se ha establecido un esquema sistemático para denominarlos describiendo su estructura de acuerdo a las reglas de la IUPAC, muchos de los nombres triviales siguen prevaleciendo por su sencillez.

Tabla 2. Carotenoides usados como aditivos en forma de extractos naturales

Extractos naturales	Carotenoides
Annatto (<i>Bixa orellana</i>)	Bixina, norbixina
Aceite de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	α -caroteno, β -caroteno
Cáscara de naranja (<i>Citrus aurantium</i>)	Esteres de luteína
Aceite de palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	Carotenos y luteína
Paprika (<i>Capsicum annuum</i>)	Capsantina, β -caroteno, criptoxantina, capsorubina
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Licopeno, β -caroteno
Azafrán (<i>Crocus sativus</i>)	Crocina, β -caroteno, zeaxantina
Grano de maíz (<i>Zea mays</i>)	Luteína, zeaxantina, criptoxantina, y carotenos
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Luteína, zeaxantina, criptoxantina violaxantina y neoxantina
Flor de cempasúchitl (<i>Tagetes erecta</i>)	Esteres de luteína, β -caroteno y zeaxantina.

Johnson y Schroeder, 1995.

Los carotenoides son compuestos lipofílicos con poca o nula solubilidad en agua, por ello, su localización está restringida a áreas hidrofóbicas de la célula, excepto cuando están asociados con proteínas o tienen substituyentes con grupos polares fuertes, en cuyo caso pueden encontrarse en ambientes acuosos. En el caso específico de las xantofilas, es frecuente encontrarlas como una mezcla compleja de ésteres de ácidos grasos o como glucósidos (Britton, 1991).

Los carotenoides, por la presencia de dobles enlaces conjugados que forman un largo cromóforo, son capaces de absorber la luz en la región visible, este mismo sistema poliéneo hace que la molécula de los carotenoides sea extremadamente sensible a la degradación oxidativa y a la isomerización inducida por luz, calor y ácidos (Schiedt y Liaeen-Jensen 1995). Muchas de las funciones de los carotenoides son consecuencia de su capacidad para absorber la luz. En organismos fotosintéticos, se conoce su función como antioxidante y en aerobios no fotosintéticos los carotenoides participan desactivando los radicales libres que se producen durante el metabolismo celular. La cadena poliénica es altamente reactiva y rica en electrones, consecuentemente, en presencia de oxidantes fácilmente forman radicales libres de vida corta, evitando la peroxidación de lípidos y la inactivación de proteínas (Johnson y Schroeder, 1995) e incluso el daño a moléculas de DNA o RNA (Murata y Kawanishi, 2000). Inicialmente solo se reconocía la importancia de los carotenoides en la salud humana, como precursores de vitamina A y los estudios médicos se restringían a la asimilación de los carotenos como pro vitamínicos. Actualmente se sabe que el consumo de carotenoides puede ayudar a prevenir ciertos tipos de cáncer, así como enfermedades cardíacas (Block

et al. 1992). En años recientes la comunidad científica ha dedicado su atención y recursos al entendimiento de los radicales libres, moléculas altamente reactivas creadas en el metabolismo por acciones como fumar, alimentarse incorrectamente, no ejercitarse y exponerse al sol, estas moléculas bajan su reactividad dañando células normales. Esta perturbación es conocida como estrés oxidativo y puede conducir a condiciones serias como enfermedades cardiovasculares, artritis, cataratas o diferentes tipos de cáncer y a otras tan típicas como la pérdida de elasticidad de la piel y las arrugas prematuras. Investigaciones recientes soportan la idea de que las vitaminas C, E y el β -caroteno son efectivos en ciertas situaciones para disminuir el estrés oxidativo (Gaziano, 1994; Gey 1998). Las investigaciones continúan para comprender este efecto y ayudar a compensar la acción de oxidantes más potentes como el oxígeno singulete (O^1) (Murata y Kawanishi, 2000)

Los estudios más recientes sobre luteína tienen un enfoque médico, debido a que la luteína es uno de los dos pigmentos encontrados en la retina y se ha demostrado que filtra la luz ultravioleta ayudando a prevenir la degradación macular, pese a esto la luteína no está considerada dentro de los siete carotenos de mayor valor comercial.

LOS CAROTENOIDES COMO PRECURSORES DE SABORES Y FRAGANCIAS

Se ha demostrado que los carotenoides son precursores de muchas sustancias responsables del sabor de los alimentos y la fragancia de las flores (Rodríguez-Amaya 1999 y Whitehead 1998). Los compuestos con aroma derivados de los carotenoides son bien cotizados en la industria de fragancias, ya que sus agradables aromas frutales son fácilmente perceptibles, incluso a muy bajas concentraciones además, aunque otros constituyentes con aroma como esteroides, terpenos y pirazinas estén presentes en algunas fragancias, los compuestos formados a partir de los carotenoides son determinantes en la calidad del aroma (Enzell, 1985, Winterhalter, 1996). En diferentes extractos de plantas, flores y frutos se han identificado más de 200 compuestos con aroma que tienen de 9 a 13 átomos de carbono, y que se producen por la ruptura de la cadena poliénica de los carotenoides a través de una oxidación enzimática o una foto-oxidación (Tabla 3), adicionalmente se ha demostrado que *in vivo*, esta ruptura oxidativa es catalizada por un sistema de dioxigenasas estereoespecíficas (Winterhalter, 1996). Aunque todos los dobles enlaces de los carotenoides pueden ser vulnerables al ataque enzimático, en tejidos de fruta los fragmentos formados después de esta ruptura oxidativa son característicos (Fig. 2) y las posiciones 9,10 y (9',10') son las preferidas (Enzell, 1985)

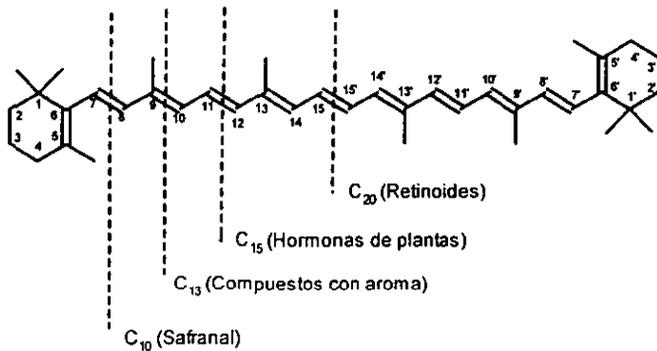


Fig. 2 Enlaces de los carotenoides susceptibles al ataque regioselectivo de dioxigenasas.

En plantas poco es lo que se sabe acerca del sistema de dioxigenasas que cataliza la ruptura oxidativa de los carotenoides. Pero en la cianobacteria *Microcystis* sp se ha caracterizado parcialmente un sistema semejante. (Enzell et al., 1977). En esta cianobacteria se identifico una dioxigenasa unida a membrana que corta específicamente en las posiciones 7,8 y (7'8') del β -caroteno. Esta dioxigenasa, requiere oxígeno para la ruptura del caroteno pero es altamente inestable en presencia de aire (Winterhalter, 1996), lo que dificulta su caracterización completa.

En tejidos de plantas se ha cuantificado la degradación de los carotenoides, demostrado que los compuestos con aroma del tipo terpenoide de 13 átomos de carbono, provienen de esta degradación. Durante los procesos de maduración del tabaco (Burton y Kasperbauer, 1985), te (Sanderson y Gonzalez, 1971) y uvas (Buteau et al., 2000) se ha encontrado una relación entre el aumento de estos terpenoides de 13 átomos de carbono y el decremento de la concentración de

carotenoides. Además, la estereoquímica de los terpenoides encontrados durante estos procesos de maduración coincide con la de los carotenoides presentes en estas plantas. (Enzell et al., 1977). Sin embargo, a la fecha no se conoce la vía de transformación completa.

Tabla 3. Productos de degradación de carotenoides comúnmente encontrados en plantas

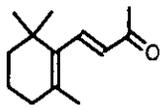
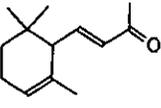
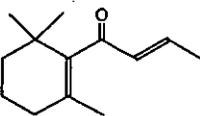
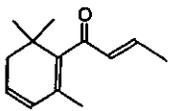
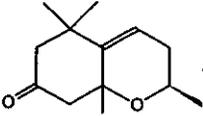
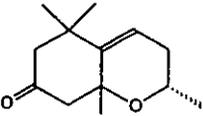
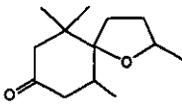
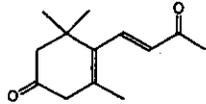
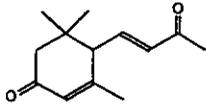
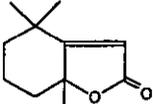
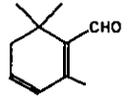
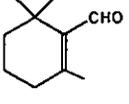
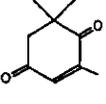
Tipo	Nombre	Estructura	Origen
C₁₃	β -Ionona		Osmanthus, rosa, té negro, tomate, fresas, zanahoria, tabaco, chabacano, mango y ciruela.
	α -Ionona		Osmanthus, té negro, tomate, fresas, zanahoria, tabaco, chabacano, maíz durazno y plátano.
	β - Damascona		Rosa, Osmanthus, té negro, papaya y tabaco.
	β -Damascenona		Chabacano, rosa, carambola, uva, Kiwi, mango, tomate y zarzamora.
	Oxo-edulan I		Fruta de la pasión, Osmanthus, tabaco Burley y tabaco Virginia.
	Oxo-edulan II		Fruta de la pasión, té negro, tabaco Burley y tabaco Virginia.

Tabla 3. (continuación)

	Nombre	Estructura	Ejemplos de ocurrencia
C ₁₃	Teaspirona		Fruta de la pasión, té negro y tabaco Burley.
	4-Oxo-β-ionona		Té negro, Osmanthus, bornia y tabaco Burley
	3-Oxo-α-ionona		Osmanthus y tabaco Virginia
C ₁₁	Dihidroactinodiolida		Osmanthus, té negro, tomate, cassia y tabaco
C ₁₀	Safranal		Azafrán, Osmaabthus, té negro, jugo de uva y páprika.
	β-Ciclocitral		Té, tomate, páprika, chabacano, brócoli, melón y chicharos.
C ₉	4-Oxoisoforona		Osmanthus, té negro y azafrán

MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE AROMAS A PARTIR DE CAROTENOIDES

En general son tres los métodos biotecnológicos usados en la producción de sabores y aromas naturales a partir de los carotenoides: se usan A) enzimas, B) microorganismos y C) tejidos vegetales o cultivos celulares, a continuación se describe de una manera general cada uno de estos métodos.

A) ENZIMAS

La principal ventaja de emplear enzimas para cualquier tipo de biotransformación es su alta especificidad. En la industria de alimentos los biocatalizadores utilizados principalmente en el área de aromas y sabores, son proteínas que tienen la capacidad de transferir electrones, átomos o grupos funcionales, entre una o varias moléculas. Cada una de estas enzimas es clasificada dentro de uno de los seis grupos principales (Tabla 4), de acuerdo al tipo de reacción de transferencia que cataliza o al grupo donador o aceptor involucrado (Whitehead 1998). En la industria de alimentos se emplean generalmente esterasas de hígado y lipasas pancreáticas de cerdo, o bien lipasas de *Candida cylindracea* (Crout and Christen, 1989). Particularmente, en la producción de aromas a partir de carotenoides, se han reportado recientemente dos métodos enzimáticos.

El primer método emplea hidrolasas y dioxigenasas para la formación de compuestos con aromas. Al hidrolizar algunos isoprenoides oxigenados u otros

metabolitos secundarios del tipo poliol que se encuentran frecuentemente glicosilados, se obtienen importantes precursores de compuestos con aroma. Posteriormente las dioxigenasas rompen a esto isoprenoides para obtener compuestos con aroma de trece átomos de carbono (Winterhalter, 1996).

El otro método enzimático para generar aromas a partir de los carotenoides es la co-oxidación, este método emplea lipo-oxigenasas u otros sistemas de oxidasas y aunque hay reportes al respecto ninguno es empleado comercialmente, debido a los bajos rendimientos que se obtienen. Por ejemplo, de acuerdo a la patente BFA Laboratories, (1994) la co-oxidación requiere una lipo-oxigenasa, ácidos grasos poliinsaturados y un compuesto polienico. Pero al usar un bioreactor para reproducir este sistema, utilizando una multifase que consiste en jugo de zanahoria como fuente de carotenoide (43%), harina de soya como fuente de lipo-oxigenasa (25%) y aceite vegetal como fuente de ácidos grasos poliinsaturado (32%); los máximos rendimientos obtenidos por Kg de la mezcla de reacción multifase son de 210 y 185 mg de β - y α - ionona respectivamente (Winterhalter, 1996).

La obtención de aromas por medio de la co-oxidación de carotenoides, también se ha logrado usando diferentes tipos de enzimas en solución acuosa, por ejemplo, fenoloxidasas (Sanderson et al., 1971), lactoperoxidasas (Ekstrand et al., 1986), y más recientemente xantina oxidasa (Bossert, 1995). Sin embargo, la mayoría de los estudios de co-oxidación se han realizado empleando β -caroteno y la lipooxigenasa: linoleato oxígeno reductasa EC 1.13.11.12. Los productos obtenidos principalmente

son β -ionona, 5,6-epoxi- β -ionona, y dihidroactinidiolida (Winterhalter, 1996). En general estos sistemas enzimáticos han resultado poco eficientes.

Tabla 4. Clasificación y ejemplos de sistemas enzimáticos usados industrialmente para mejorar la calidad del sabor y aroma de los alimentos.

Numero de grupo	Clase	Tipo de reacción catalizada	ejemplos
1	Oxido reductasas	Transferencia de electrones (H^+ o H). Puede requerir NAD(P)H como cofactor	Catalasa, glucosa oxidasa, Lipoxigeneasa.
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales como acil, glicosil y fosfato de un sustrato a otro.	Glucosa cinasa
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis. Sus sustratos incluyen amidas, esterres, epóxidos, glicosidos y péptidos	Amilasas, esterasas, hemicelulasas, glucanasas, glucosidasas, proteasas, sacarasas
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por remoción de grupos funcionales.	Hidroperoxido-liasas
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de una misma molécula, para producir formas isoméricas	Glucosa isomerasa
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O, o C-N por reacciones de condensación acopladas a rupturas de ATP	

(Whitehead 1998).

B) MICROORGANISMOS

Los procesos microbianos tradicionalmente han jugado un papel importante en el desarrollo de sabores y aromas, principalmente durante la producción de alimentos fermentados como vino, cerveza y queso. Los compuestos volátiles generados durante los procesos fermentativos son característicos, y entre ellos podemos encontrar algunos ésteres y alcoholes (Law y Mulholland, 1991).

Actualmente las técnicas microbiológicas han incrementado la eficiencia de muchos microorganismos como biocatalizadores para la producción específica de sabores y fragancias. Sin embargo, para asegurar su implementación comercial es necesario aprender mucho más sobre la bioquímica básica y la genética de estos nuevos biocatalizadores.

Algunos aditivos como el ácido cítrico, el jarabe fructosado de maíz y el ácido glutámico se producen anualmente en miles de toneladas usando procesos microbianos (Hagedorn y Kaphammer, 1994). En general los sistemas microbianos son utilizados frecuentemente para llevar a cabo reacciones de biotransformación que requieren la adición de grupos funcionales a un sustrato, por ejemplo, adicionar grupos hidroxilo, realizar una epoxidación u oxidación todas ellas controladas por diferentes tipos de enzimas. De este modo, la producción microbiana de aromas del tipo norisoprenoide (C_{13}), se considera más bien como una biotransformación de sustratos como α - y β -ionona. En la biotransformación de las α - y β -iononas se realizan hidroxilaciones, metilaciones o epoxidaciones con el fin de cambiar su perfil aromático, para ello, se ha empleado principalmente *Aspergillus niger* (Lutz-Wahl et

al., 1998, Yamazaki et al., 1988, Sode et al., 1989 y Larroche et al., 1995). Este tipo de bioconversiones ha sido ampliamente estudiada, ya que con estas transformaciones el perfil de aroma que se logra es muy similar al obtenido durante la maduración de las hojas del tabaco.

C) TEJIDOS VEGETALES O CULTIVOS CELULARES

Desde un punto de vista biotecnológico la capacidad de las células vegetales para metabolizar sustancias exógenas las hace útiles como biocatalizadores. Además, considerando que durante los procesos de maduración de algunas plantas se generan metabolitos con aromas muy apreciados, es importante conocer los diferentes sistemas enzimáticos involucrados. En el campo de la producción de aromas naturales, recientemente se han utilizado células inmovilizadas de *Nicotiana tabacum*, capaces de reducir eficientemente cetonas α, β insaturadas a sus correspondientes cetonas saturadas y alcoholes, confiriéndoles de este modo, un perfil de aroma más apreciado (Tang & Suga, 1994). Las reductasas aisladas de cultivos celulares de *N. tabacum*, catalizan la reducción específica de dobles enlaces endo- y exo-cíclico de cetonas α, β insaturadas (Tabla 5). Sin embargo los rendimientos obtenidos, al utilizar estas reductasas en la bioconversión de α y β iononas, son relativamente bajos y dependientes del pH del medio, tanto en sistemas de suspensión de células como en sistemas de células inmovilizadas.

Tabla 5. Caracterización de dos enon-reductasas de *Nicotiana tabacum*

Enon-reductasa	PH optimo	Temperatura optima	PM en gel de poliacrilamida (SDS)	Subunidades
I	7.7	30-35°	22000	4
II	6.5	30-35°	22000 y 45000	2 y 2

Tang y Suga, 1992.

Actualmente la demanda comercial de compuestos con aroma supera por mucho la producción que se lograría empleando diversos métodos biotecnológicos, por lo que el interés en desarrollar nuevos métodos de producción va en aumento.

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado la posibilidad de obtener aromas mediante la ruptura oxidativa de los carotenoides. Se han empleado diferentes métodos para realizar esta ruptura oxidativa, pero en la gran mayoría de los reportes se ha utilizado al β -caroteno como sustrato para la obtención de aromas del tipo isoprenoide de trece átomos de carbono. Y aunque las compañías productoras de aromas han patentado algunos procesos, actualmente ninguno de ellos se emplea con fines comerciales, debido a los bajos rendimientos obtenidos hasta el momento y al alto costo de los carotenos o sustratos empleados en esta bioconversión. Por ello, este trabajo propone utilizar un sustrato de bajo costo con un alto contenido del hidroxí-carotenoide luteína y emplear microorganismos capaces de degradar a este carotenoide para lograr dicha ruptura oxidativa. Sin duda conocer un nuevo sistema de degradación contribuirá al conocimiento general acerca de la producción de aromas derivados de los carotenoides.

OBJETIVO

El propósito de este trabajo fue aislar microorganismos capaces de degradar luteína y generar compuestos con aroma del tipo isoprenoide de trece átomos de carbono.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- i. Aislar y caracterizar a nivel de genero, a los microorganismos capaces de degradar luteína.
- ii. Identificar los compuestos obtenidos de la degradación microbiana de luteína, empleando técnicas analíticas como: cromatografía de gases acoplada a masas y RMN de ^1H y ^{13}C .
- iii. Evaluar los parámetros de fermentación para la obtención de compuestos con aroma.
- iv. Evaluar diferentes concentraciones de luteína y harina de flor de cempasúchitl como sustratos en la bioconversión a productos con aroma.

HIPÓTESIS

Un microorganismos capaz de crecer en luteína como única fuente de carbono, puede tener enzimas que causen la ruptura oxidativa del carotenoide específicamente en las posiciones 9-10 y/o 9'-10' para generar precursores de compuestos con aroma.

RESULTADOS I

Bioconversión of lutein to products with aroma. Sánchez-Contreras, A., Jiménez, M., Sánchez, S. (2000) : *Appl Microbiol Biotechnol* 54:528-534

En este trabajo se destaca la obtención de 4 compuestos de 13 átomos de carbono del tipo norisoprenoide con un perfil de aroma similar al del tabaco : 7,8-dihydro- β -ionol, β -ionona, 7,8-dihydro- β -ionona y 3-hidroxi- β -ionona. La mezcla de estos compuestos volátiles se generó por la acción de un cultivo mixto de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp que fue crecido en presencia de luteína e incubado a 29°C con una agitación de 60 rpm. Los cuatro compuestos obtenidos se encuentran dentro de los 700 que se han identificado como responsables del aroma de las hojas maduras del tabaco Virginia (Burton and Kasperbauer, 1985). Debido a que los productos se encuentran a diferentes tiempos de fermentación se presume que el primer paso de la degradación, es la acción de una oxidasa que escinde la molécula de luteína entre la posición 9-10 generando a la β -ionona y posteriormente a partir de esta se obtienen los compuestos reducidos y un derivado hidroxilado. Con los resultados reportados en este artículo se demuestra que el proceso de degradación microbiana de la luteína representa ventajas significativas en cuanto a tiempo y rendimiento, con respecto a otro tipo de degradaciones enzimáticas y térmicas que han sido reportadas anteriormente.

Wintherhalter (1996), propone que la formación de los compuestos con aroma a partir de los carotenoides se realiza en tres pasos: i) Ruptura oxidativa, ii) Transformación enzimática de los productos primarios de degradación y iii) conversión final catalizada por ácidos. Adicionalmente, se ha considerado que las rutas naturales para la formación de estos compuestos con aroma involucran oxidaciones, deshidrogenaciones, reducciones o reacciones de eliminación, todas ellas catalizadas por sistemas enzimáticos específicos. En este sentido el cultivo mixto de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. realiza una serie de reacciones enzimáticas simultáneas que culminan con la obtención de los cuatro compuestos derivados de la degradación de luteína, por ello resulta interesante además de optimizar la producción de este proceso fermentativo, identificar los diferentes sistemas enzimáticos involucrados en esta transformación.

ORIGINAL PAPER

A. Sánchez-Contreras · M. Jiménez · S. Sanchez

Bioconversion of lutein to products with aroma

Received: 30 November 1999 / Received revision: 18 April 2000 / Accepted: 1 May 2000

Abstract A residual mud sample from the marigold flower dehydration process was screened and 19 putative colonies were isolated for their ability to degrade lutein in a chemically defined medium supplemented with marigold flower flour as a carbon source. Among the colonies isolated, two generated volatile compounds in fermentation and one was chosen for further study for its ability to produce a strong tobacco smell. This colony contained two microorganisms, identified as *Geotrichum* sp. and *Bacillus* sp. The aroma production requires the presence of both microorganisms and lutein. Using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), four compounds were identified: 7,8-dihydro- β -ionol, β -ionone, 7,8-dihydro- β -ionone, and 3-hydroxy- β -ionone, in proportions of 84.2%, 9.4%, 3.5%, and 2.9%, respectively.

Introduction

Carotenoids are the pigments responsible for the color of many plants, fruits, and flowers, and are considered the precursors of many important chemicals responsible for the flavor of some foods and the fragrance of some flowers (Winterhalter 1996). Different natural products with aromatic properties, such as β -ionone, α -ionone, dihydroactinidiolide, geraniol, damascenol, and eugenol, among others, have been extracted from plants and fruits. In vivo, the rapture of the carotenoid polyene chain is catalyzed by a dioxygenase system which attacks regioselectively (Enzell 1985), generating volatile com-

pounds comprising 9–13 carbon atoms. Some of them are considered to be products of the oxidative rupture of carotenes resulting from plant metabolism (Enzell 1985; Sanderson and Gonzalez 1971; Winterhalter 1996). The most commonly isolated compounds in this process include β -ionone, α -ionone, dihydroactinidiolide, and citral. Today, processes for the chemical synthesis of these compounds have been established with the purpose of reducing their production costs (Demole and Enggist 1976; Yao et al. 1998). More recently, new alternatives have arisen for the production of aromas and flavors. For example, aroma production by filamentous fungi and yeasts has been reported (Yang et al. 1994), as well as the conversion of terpenes by microbial degradation for preparation of fruit aromas (Enzell 1985). The rupture of β -carotene by xanthine oxidase to generate the aroma dihydroactinidiolide has been also reported (Bossier et al. 1995). To further explore microbiological means of producing aromas from carotenoids, the xanthophyll lutein [β -*e*-caroten-3-3-diol] was used as substrate. This xanthophyll is inexpensive and is produced abundantly in the marigold flower (*Tagetes erecta*). To carry out this conversion, we isolated and characterized microorganisms capable of forming aroma compounds from a concentrate of marigold flower flour with 89% lutein. We established the fermentation conditions for the generation and recovery of these metabolites and identified the volatile products generated.

Materials and methods**Isolation of lutein-degrading microorganisms**

One-gram samples of residual mud, gathered during the desiccation of the marigold flower, were dissolved in 100 ml saline solution (0.85%). One-milliliter aliquots were further diluted 1:100 and 100 μ l were used to inoculate Petri dishes containing a modified chemically defined medium (Fink 1970) without pyridoxine, inositol, or glucose and supplemented with marigold flower flour (mff) as the only carbon source. The mff was added to the culture medium at a final concentration of 45 mg/l from a stock solution (16.6 mg/ml) in Tween 80, made the same day and filter sterilized

A. Sánchez-Contreras · S. Sanchez (✉)
Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,
Box 70228, México DF 04510, México
e-mail: sersan@servidor.unam.mx
Fax: +52-5-6223855

M. Jiménez
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
Box 70228, México DF 04510, México

(Millipore 0.45 μm). Under these conditions, 19 colonies were selected which generated halos of fading pigment. The colonies were maintained in 40% glycerol at -20°C for later characterization.

Selection of aroma-producing microorganisms

The colonies which degraded lutein were grown in Petri dishes with yeast-tryptone-sodium (YTN) medium (Dasek et al. 1973). This medium was inoculated with 0.1 ml of the glycerol stock and incubated at 29°C for 24 h. The cells were recovered and transferred to saline solution (0.85%) adjusting the OD_{540} to 0.3 (basal suspension). One milliliter of basal suspension was inoculated into 250-ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml YTN medium without glucose. The mff was used as carbon source and the flasks were incubated at 29°C without agitation. The mff was added to the culture medium at a concentration of 22.4 mg/l from a stock solution (22.4 mg/ml) prepared in 70% ethanol, sterilized by filtration (Millipore 0.45 μm) and added immediately before inoculation.

After 96 h incubation, the cells were separated by centrifugation. With the purpose of identifying the degradation products, the culture medium was extracted by stirring with three 5-ml portions of CH_2Cl_2 , the extract was concentrated with a soft flow of N_2 and dissolved in 1 ml absolute methanol. For the analysis of intracellular products we used the method reported by Britton (1985). To determine the lutein degradation products, the extracts from cells and culture medium were analyzed by spectrophotometer at wavelengths of 200–600 nm. These extracts were also analyzed by thin layer chromatography (TLC). For this purpose, TLC-ALUGRAMSILG-UV254 plates of 0.54 mm thickness were used and 10 μl of the methanol solution was applied and run in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (80/20). The plate was developed with a 10% solution of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 2N H_2SO_4 . One colony was selected which generated tobacco aroma and diminished the quantity of lutein by 60% compared to a control without inoculum. The selected colony was identified as a mixed culture of *Bacillus* sp. and *Geotrichum* sp. according to Dolan and Roberts (1974). Both microorganisms are conserved in the Microbial Culture Collection of the Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Aut6noma de Mexico, Mexico DF, with the codes BM-B-340 and BM-H-105, respectively.

Lutein degradation

Bacillus sp. and *Geotrichum* sp. were cultured separately and in mixed culture in order to evaluate their capacity to degrade lutein and mff independently. Seed cultures were grown by inoculating 1 ml of the basal suspension into 250-ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml YTN. The cultures were incubated at 29°C on a rotary shaker (180 rpm) for 24 h. Liquid fermentation was carried out by inoculating 17 ml of the seed cultures into 500-ml bottles with thread cover containing 350 ml YTN supplemented with glucose (0.02%) and mff (22.4 mg/l) or purified lutein (0.04 mM) as additional carbon source. The cultures were incubated at 29°C without agitation for 120 h. The positive control for degradation was the mixed culture prepared in the same way as each of the separate microorganisms. The original conservation medium was used which contained *Bacillus* sp. and *Geotrichum* sp. in a proportion of 3×10^8 and 1×10^6 CFU/ml, respectively. The negative control was YTN medium with mff or lutein, but without inoculum. Lutein degradation and the generation of volatile products were quantified by taking a 2-ml sample of culture every 24 h and centrifuging at 7,000 rpm for 15 min. The supernatant was extracted by stirring with 0.5 ml acetone and 1.5 ml of a mixture of diethyl ether/petroleum ether [1:1]. The organic extract was separated from the aqueous phase by centrifugation and the solvent was eliminated with a soft flow of N_2 . The concentrate was dissolved in 50 μl CH_2Cl_2 and 5 μl was applied onto two TLC-ALUGRAMSILG-UV254 plates of 0.54 mm thickness. The plates were developed separately, the first in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (80/20) and the second in a mixture of hexane/ $\text{AcOEt}/\text{AcOOH}$ (90/5/5). The chromatograms were analyzed by densitometry, using a

CAMAG II densitometer at wavelengths (λ) of 270 nm to determine volatile products and 450 nm to determine residual lutein. As standards we used the recrystallized lutein (Khachik and Beltsville 1995), obtaining a yield of 50% and a purity of 98%, and the mixture of aroma products, purified by column chromatography using silica gel 60 Merck (ASTM 35–70 mesh) and eluted with a mixture of hexane/ AcOEt 80/20.

Cellular growth, residual glucose, and pH were monitored every 24 h. Cell growth was measured by protein determination using the method of Lowry (Legler et al. 1985). Residual glucose was measured using an enzymatic method (Lott and Turner 1975). The mff, with 89% free lutein, was kindly donated by Industrial Org6nica S.A. de C.V., Monterrey NL, Mexico.

Recovery of volatile compounds

Volatile compounds were recovered from the culture medium using a closed system as described by Crouzet and Kanasawud (1992). A stream of N_2 was used to take samples at different fermentation times; the samples were recovered with 100 μl CH_2Cl_2 and analyzed in a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890 series II) equipped with a capillary column of 30 m Carbowax 20 M, at 50°C for 5 min, utilizing a temperature program of 4°C min for 25 min. The analysis of masses was carried out in a coupled apparatus (Hewlett Packard model 5945A) using the electronic impact technique (EI^+). Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis was carried out in the Varian apparatus Gemini-200 and VXR-300s, at 200 MHz, choosing tetramethylsilane as internal reference and CDCl_3 as solvent.

Results

Microorganism selection and identification

During the primary selection we isolated 19 colonies capable of degrading mff. Of these, two colonies generated volatile compounds by submerged fermentation, and one was selected for its capacity to better degrade mff and to generate a strong tobacco scent. The spectrophotometric analysis of an organic extract from the culture medium allowed us to observe a decrease in the characteristic profile of lutein absorption (430, 445, 460 nm) as a function of fermentation time, and a simultaneous increase in the maximum absorption signal at 270 nm (Fig. 1). Using TLC we observed that a single spot, with a R_f of 0.56 in hexane/ $\text{AcOEt}/\text{AcOOH}$ (90/5/5) and 0.79 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (80/20), contained the tobacco aroma. In the organic extract from cells, no volatile compounds were detected and only the presence of residual lutein was observed.

During purification of the colony, two microorganisms, a bacterium and a yeast, were isolated in a proportion of 3×10^8 and 1×10^6 CFU/ml, respectively. These microorganisms were identified as *Bacillus* sp. and *Geotrichum* sp. Currently, we are carrying out the molecular characterization of the microorganisms.

Lutein degradation kinetics

Bacillus sp. and *Geotrichum* sp. were assayed separately and in mixed culture to evaluate their capacity as lutein

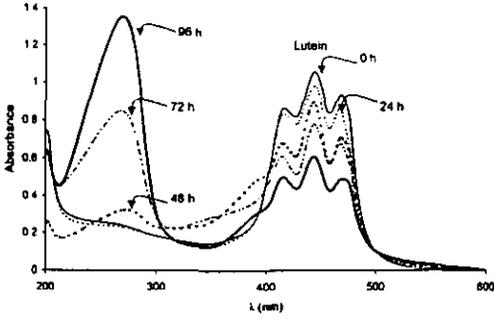


Fig. 1 Absorption spectra of organic extracts from the culture medium of lutein fermentations as a function of the fermentation time. 0 h —, 24 h ·····, 48 h - - - - , 72 h - · - · - , 96 h - - - - -

degraders. Figure 2 shows that neither microorganism was able to grow optimally and degrade lutein significantly when grown independently. The mixed culture (*Bacillus* sp. 3×10^8 CFU/ml and *Geotrichum* sp.

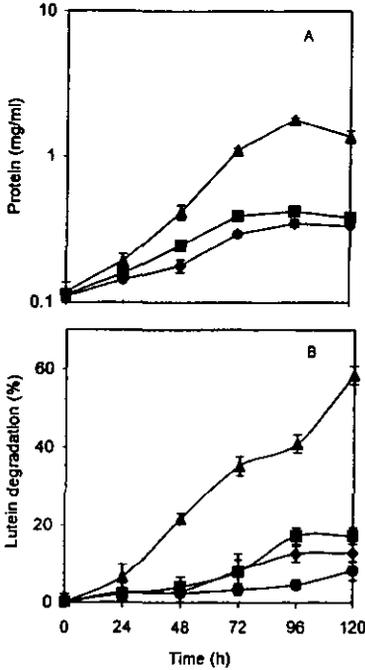


Fig. 2 A Growth and B lutein degradation kinetics by both microorganisms ▲, *Geotrichum* sp. ■, and *Bacillus* sp. ●. Control without inoculum ●. Fermentations were performed for 120 h at 29 °C without agitation in 500-ml bottles with thread cover containing 350 ml of modified yeast-tryptone-sodium (YTN) medium without glucose and with 22.4 mg/l marigold flower flour

1×10^6 CFU/ml) was able to use lutein as sole carbon source for growth (Fig. 2A), degrading up to 60% of the added lutein (Fig. 2B).

In order to learn more about the characteristics of this process, a fermentation was carried out using both microorganisms and changing the conditions of agitation from 0 to 60 and 100 rpm. It is notable that lutein was degraded up to 75% with shaking at 100 rpm, while without agitation it was degraded 60% (Fig. 3A). However, this degradation was not reflected in a proportional increase in formation of volatile compounds (Fig. 3B). This result may be due to two factors: a decrease in microbial growth and/or a loss of volatile compounds because of excessive agitation. Using a mixed culture with an intermediate agitation (60 rpm) resulted in greater formation of volatile compounds (10 mg/l) and better lutein degradation (95%) (Fig. 3A). With agitation at 60 rpm we observed that as lutein was degraded (Fig. 4A), a volatile product with a tobacco aroma was generated (Fig. 4C), while a control without inoculum showed moderate pigment degradation and did not generate this aroma. This suggests that the volatile compound came from the microbial degradation of

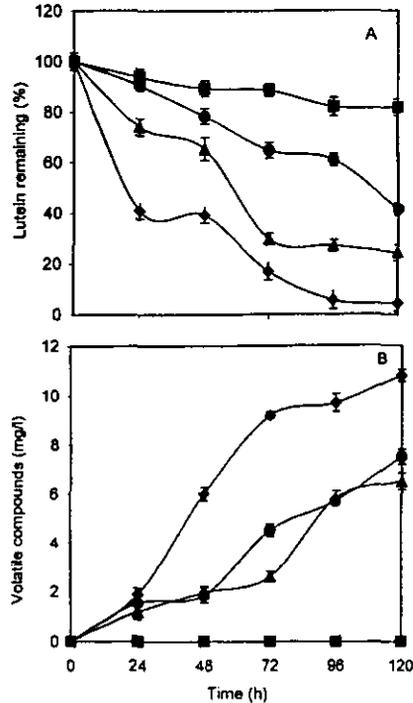


Fig. 3 Influence of agitation on lutein degradation (A) and volatile compounds formation (B) at 0 ●, 60 ◆, and 100 rpm ▲. Control without microorganisms at 60 rpm ■. Fermentations were performed with both microorganisms as described in Fig. 2

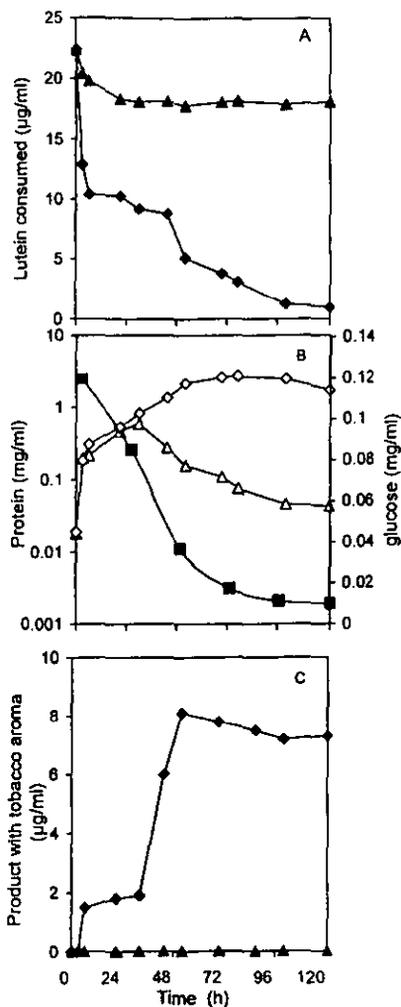


Fig. 4A-C Culture mixture of microorganisms at 29 °C and 60 rpm in YTN medium with lutein 0.04 mM and glucose 0.02%. A Lutein consumed in the presence ◆, and absence ▲ of both microorganisms. B Growth kinetics with glucose Δ, lutein plus glucose ◇, and residual glucose for both conditions ■. C Kinetics of aroma compounds formation on glucose ▲ and lutein plus glucose ◆

lutein. Under these same conditions, a control culture with glucose (0.02%) and without lutein (Fig. 4B) showed diminished growth after 36 h, the same time at which the glucose diminished drastically. However, when this culture medium was supplemented with lutein (0.04 mM) there was continuous growth, probably due to fragments of lutein degradation being used as carbon source. When instead of lutein we used zeaxanthin (3,3'-dihydroxy- β -carotene), the mixed culture generated

similar transformation products (not shown). This suggests that this degradation system can function with other xanthophylls of similar structure.

Recovery and identification of volatile compounds from the culture medium

The volatile compounds recovered by a stream of N_2 at different fermentation times, were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectroscopy (GC/MS). Initially, we identified β -ionone by its fragmentation spectra. This compound appears in greater proportion at 36 h (Fig. 5A). The 1H and ^{13}C NMR spectra of these samples (Table 1) were compared to those reported by Sadtler (Sadtler Research Laboratories 1976) for pure β -ionone, confirming identification of this compound. After 48 h fermentation we began to perceive the tobacco aroma from the culture medium. Samples recovered at 96 h fermentation were also analyzed by GC/MS, resulting in four main components (Fig. 5B) that were identified by their fragmentation spectra and compared with authentic standards contained in the data base of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (1992). The first compound constituted 84.2% of the sample, ran at 10.13 min with a molecular ion $196[M^+]$, and was identified as 7,8-dihydro- β -ionol

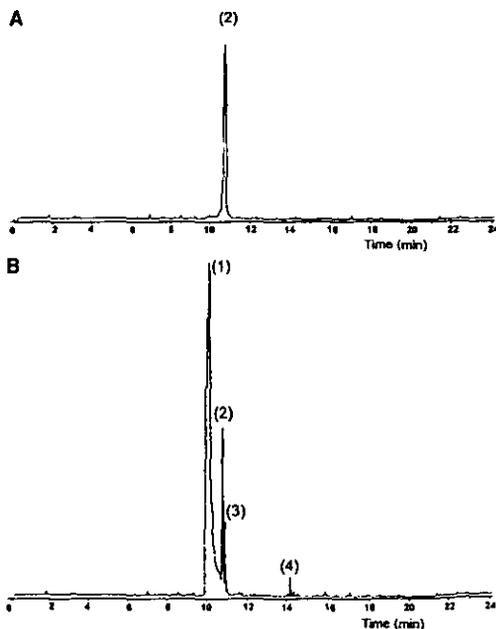


Fig. 5A, B Gas chromatograph of volatiles recovered from the fermentation at A 36 h and B 96 h of fermentation. (1) 7,8-Dihydro- β -ionol, (2) β -ionone, (3) 7,8-dihydro- β -ionone, and (4) 3-hydroxy- β -ionone

Table 1 ^1H , ^{13}C NMR spectral data (200 MHz, CDCl_3) of compound (2) (s single, d double, t triple, m multiple)

	^1H δ^a	^{13}C δ^a
C1		33.50
C2	1.45–1.60 m 4H	33.49
C3	1.45–1.60 m 4H	18.82
C4	2.07 t 2H	39.66
C5		136.10
C6		135.30
C7	7.33 d 1H(16) ^b	143.12
C8	6.12 d 1H(16) ^b	131.52
C9		197.40
C10	2.28 s Me	27.10
C11	1.76 s Me	21.68
C12	1.07 s Me	28.74
C13	1.07 s Me	28.74

^a Displacement (δ in ppm) relative to tetramethylsilane^b Joining constant (J in Hz) in parentheses

(1). The second compound, comprising 9.4% at 10.81 min with $192[\text{M}^+]$, was identified as β -ionone (2). The third compound, comprising 3.5% at 10.91 min with $194[\text{M}^+]$, was identified as 7,8-dihydro- β -ionone (3). The fourth compound, at 14.15 min and $208[\text{M}^+]$, represents 2.9% of the total mixture and was identified as 3-hydroxy- β -ionone (4). The sum of the four compounds was $37.7 \mu\text{M}$, equivalent to the amount of lutein degraded, on a molar basis (1:1). Table 2 summarizes the concentration of each compound determined at 0, 36 and 96 h of fermentation, as well as the degradation of lutein at those fermentation times. As shown in this table, the production of $10 \mu\text{M}$ of compound (2) as a single product was observed at 36 h fermentation. At this fermentation time $22 \mu\text{M}$ of lutein had been degraded. However, at 96 h fermentation we found $31.8 \mu\text{M}$ of compound (1), when $38 \mu\text{M}$ of lutein had been consumed.

Spectrometric results

Compound (1): 7,8-dihydro- β -ionol: EM: m/z; 196 $31.4 [\text{M}]^+$, 181/7.8 $[\text{M-Me}]^+$, 178/12.4 $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$, 163/55, 136/24, 123/100, 108/8, 107/20, 93/28, 55/20, 43/25, 41 18

Table 2 Concentration (μM) of volatile compounds at different fermentation times^a

	Fermentation time (h)		
	0	36	96
β -Ionone (2)	0	10	3.60
7,8-Dihydro- β -ionol (1)	0	0	31.80
7,8-Dihydro- β -ionone (3)	0	0	1.34
3-Hydroxy- β -ionone (4)	0	0	1.03
Lutein	40	18	2.00

^a Cells were grown at 29 °C and 60 rpm in yeast-tryptone-sodium medium containing $40 \mu\text{M}$ lutein and 0.02% glucose. The quantitative analysis was obtained by gas chromatography

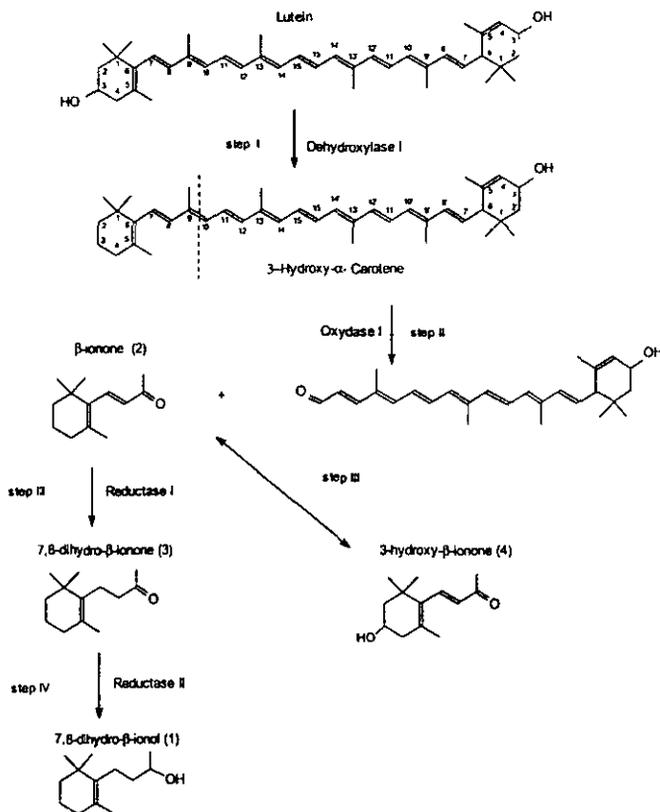
Compound (2): β -ionone: EM: m/z; 192 $[\text{M}]^+$, 177/100 $[\text{M-Me}]$, 149/8, 135/12, 93/7, 91/6.4, 43/26, 41 6
 Compound (3): 7,8-dihydro- β -ionone: EM: m/z; 194/15 $[\text{M}]^+$, 161/45, 136/13, 121/100, 107/7, 93/30, 79/29, 41/28
 Compound (4): 3-hydroxy- β -ionone: EM: m/z; 208/6 $[\text{M}]^+$, 193/20 $[\text{M-Me}]^+$, 165/100, 137/26, 109/25, 107/24, 91/20, 43/40

Discussion

The ionones (C_{13}) and their derivatives are broadly distributed in nature. They are important constituents of many essential oils of vegetable origin, which contribute especially to aroma profiles and to the flavor of some flowers and fruits (Lutz and Winterhalter 1992; Yang and Min 1993). Among the ionones, compound (2) has been reported as a product of the oxidative rupture of β -carotene (Crouzet and Kanasawud 1992). Compounds (1) and (3) have been reported as products of the biotransformation of β -ionone by immobilized cells of *Nicotiana tabacum* (Tang and Suga 1994), and compound (4) has been reported as a product of the microbial conversion of β -ionone (Yamazaki et al. 1988). Although no detailed information is available on the true mechanism of synthesis of the hydroxy derivatives, it has been suggested that these compounds are directly generated from β -ionone, and probably result from the action of a hydrolase system (Larroche 1995). Furthermore, microbial hydroxylases generally appear to be mixed-function oxidases utilizing molecular oxygen and requiring an electron-transport system linked to NADPH-dependent dehydrogenases (Smith 1984). Therefore, not finding 3-hydroxy- β -ionone but detecting only β -ionone as the main product in the first hours of fermentation suggests that the first step of this transformation is due to a lutein dehydroxylation, followed by a rupture in the 9–10 position of the lutein molecule (Fig. 6). Furthermore, at 96 h a predominance of compound (1) was obtained, suggesting the presence of two reductases, one for the double exocyclic bond of β -ionone to form compound (3) and one for the carbonyl group, giving as end product compound (1) (Fig. 6). These types of successive reductions have been reported before by Tang and Suga (1994), who obtained tobacco aroma by conversion of β -ionone to 7,8-dihydro- β -ionone and 7,8-dihydro- β -ionol by the action of isolated reductases of *Nicotiana tabacum*. These compounds are considered important components of the aroma of tobacco leaves (Burton and Kasperbauer 1985) and of some flowers, such as *Osmanthus fragans* (Kaiser and Lamparsky 1978; Yang and Min 1993), which are appreciated for their pleasant scent.

On the other hand, volatile compound formation by thermal degradation of β -carotene in aqueous solution has been the subject of much discussion. Crouzet and Kanasawud (1992) reported that, at a temperature of 30 °C, only β -ionone and dihydroactinidiolide were

Fig. 6 Proposed pathway for the formation of the lutein-derived products



formed, and most of the volatile products were generated at 50 °C, reaching minimum yields of 0.0032%. We suggest that the process of microbial degradation from lutein represents a significant advantage in time and yields over thermal degradation. In this work, lutein degradation of 90% and formation of volatile compounds with a yield of 49.6% was achieved with a 96 h fermentation. A mixture of volatile compounds was generated with a mixed culture of *Bacillus* sp. and *Geotrichum* sp. when they were grown in the presence of lutein and incubated at 29 °C with agitation at 60 rpm. The compounds obtained, (1), (2), (3), and (4), are important constituents of the aroma of tobacco plants (Burton and Kasperbauer 1985).

On a molar basis, the products generated from lutein were 1:1, therefore we believe that the rupture of the molecule occurs only at the 9–10 position of the molecule. However, when zeaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β -carotene) was used instead of lutein, the quantity of products generated was doubled (with a molar relationship of 1:2), showing a clear specificity of the system for cyclo- β -bonds.

Undoubtedly, mixtures of microorganisms are responsible for many biotransformations occurring in nature. These interactions may not always be present, but can appear under certain environmental conditions. In our example, these microorganisms seem to complement each other in order to carry out the biotransformation of lutein to products with aroma. For this model, it will be interesting to identify the role of each microbial species in the lutein degradation. Better knowledge of the enzymatic processes involved should improve the production of volatile compounds. Currently, we are carrying out studies to answer some of these questions. In addition, we are investigating the specificity of this system using other hydroxyl derivatives.

Acknowledgements We are indebted to A. Bautista and B. Ruiz for technical assistance in part of this work. This project was supported partly by the contribution of DGAPA-PADEP30087, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico, DF). A. Sánchez-Contreras was granted a scholarship by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, during the development of this work. We thank E. Langley for critical review of this manuscript. We thank M. A. Ortiz for his help in the identification of microorganisms.

References

- Bosser A, Paplorey E, Beling JM (1995) A simple way to (\pm)-dihydroactinidiolide from β -ionone related to the enzymatic co-oxidation of β -carotene in aqueous solution. *Biotechnol Prog* 11: 689-692
- Britton G (1985) General carotenoids methods. *Methods Enzymol* 111: 113-149
- Burton HR, Kasperbauer MJ (1985) Changes in chemical composition of tobacco lamina during senescence and curing. 1. Plastid pigments. *J Agric Food Chem* 33: 879-883
- Crouzet JC, Kanasawud P (1992) Formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids. *Methods Enzymol* 213: 54-62
- Dasek J, Sheperd D, Traelnes RK (1973) Procède de fabrication de zeaxanthine. Belgium Patent 790289
- Demole E, Enggist P (1976) Isolation and synthesis of 2 bicyclic- α -amascenones. *Helv Chim Acta* 59: 1938-1948
- Dolan CT, Roberts GD (1974) Identification procedures. In: Washington JA (ed) *Laboratory procedures in clinical microbiology*. Little Brown, Boston, pp 153-164
- Enzell C (1985) Biodegradation of carotenoids an important route to aroma compounds. *Pure Appl Chem* 57: 693-700
- Fink GR (1970) The biochemical genetics of yeast. *Methods Enzymol* 17A: 59-78
- Kaiser R, Lamparsky D (1978) Inhaltsstoffe des *Osmanthus* absolutes. Mitteilung: Derivate der Theaspirane. *Helv Chim Acta* 61: 387-400
- Khachik F, Beltsville MD (1995) Process for isolation, purification and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof. US Patent 5382714
- Larroche C, Creuly C, Gros J-B (1995) Fed-batch biotransformation of beta-ionone by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 222-227
- Legler G, Müller-Platz CM, Mentges-Hettkamp M, Pflieger G, Jülich E (1985) On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal Biochem* 150: 278-287
- Lott JA, Turner K (1975) Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem* 21: 1754-1760
- Lutz A, Winterhalter P (1992) Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J Agric Food Chem* 40: 1116-1120
- NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (1992) Standard reference data program. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, USA
- Sadtler Research Laboratories (1976) $^1\text{H-NMR}$ (19839), $^{13}\text{C-NMR}$ (943 C). Handbook of nuclear magnetic resonance spectra (database), BIORAD Laboratories Sadtler Division USA Headquarters, Philadelphia, Pa
- Sanderson GW, Gonzalez G (1971) Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenoids in black tea aroma formation. *J Food Sci* 36: 231-235
- Smith LL (1984) Steroids. In: Kieslich K (ed) *Biotechnology*, vol 6a. Verlag Chemie, Weinheim, pp 31-78
- Tang Y-X, Suga T (1994) Biotransformation of alpha- and beta-ionones by immobilized cell of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 37: 737-740
- Winterhalter P (1996) Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects. In: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors*. (ACS Symposium Series 637) American Chemical Society, Washington, DC, pp 295-308
- Yamazaki Y, Hayashi Y, Arita M, Hieda T, Mikami Y (1988) Microbial conversion of α -ionone, α -methylionone, and α -isomethylionone. *Appl Environ Microbiol* 2354-2360
- Yang TS, Min DB (1993) Food flavors, ingredients and composition. In: Charalambous G (ed) *Proceedings of the VII International Flavor Conference*. Elsevier, Amsterdam, pp 150-157
- Yang T-C, Pastore GM, Sato H, Park-Min YK (1994) Production of fruit aroma by newly isolated yeast. *Biotechnol Lett* 16: 389-392
- Yao-SL, Johannsen M, Hazell RG, Jorgensen KA (1998) Total synthesis of (*R*)-dihydroactinidiolide using asymmetric catalytic hetero-Diels-Alder methodology. *J Organ Chem* 63: 118-121

RESULTADOS II

Degradación de luteína por un filtrado libre de células: (Ruptura oxidativa)

En vista de que la ruptura oxidativa de luteína se realiza en las primeras horas de fermentación y con el fin de localizar el origen del sistema enzimático responsable de esta ruptura, se realizaron fermentaciones con *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. por separado con y sin luteína tomando como control positivo una fermentación de la mezcla de microorganismos con luteína, en las mismas condiciones reportadas en Sánchez-Contreras et al., (2000). A las 36 h de fermentación se separaron las células del medio de cultivo por centrifugación. Las células se lavaron varias veces con agua bidestilada, se rompieron por sonicación y el extracto se resuspendió en buffer de fosfato de potasio (0.1 M), pH 7.0. Del medio de cultivo se obtuvo proteína enriquecida por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, se dializo y resuspendió en buffer de fosfato de potasio (0.1 M), pH 7.0, siguiendo la metodología de Rosenberg (1996). Ambos extractos proteicos se cuantificaron por el método de Lowry et al., 1951 y se agregaron proporcionalmente en discos de papel filtro colocados en una caja petri preparada con agarosa 0.3% p/v, luteína (0.04 mM) y buffer de fosfato de potasio (0.1 M, pH 0.7). Después de 24 h de incubación a 29°C, se observó un halo de degradación de la luteína alrededor del disco que contenía la fracción del precipitado al 60% proveniente del medio de cultivo de la mezcla de *Bacillus* sp y *Geotrichum* sp. Por este resultado se dedujo que las proteínas responsables de la degradación de luteína se excretan al medio

de cultivo y que la generación de este sistema enzimático proviene de ambos microorganismos.

Para corroborar esta suposición y observar posibles diferencias en el perfil proteico de cada condición ensayada, todos los extractos proteicos obtenidos de los medios de cultivo se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante, preparado y teñido siguiendo la metodología descrita por Maniatis et al., 1989. El gel presenta diferencias en cada condición (Fig. 3), sin embargo resalta la presencia de una proteína de 88.56 kDa que se observa cuando *Geotrichum* sp. y la mezcla de microorganismos son crecidos con luteína. Este experimento se repitió utilizando un gel más concentrado y pudo observarse que cuando ambos microorganismos se cultivan juntos en presencia de luteína además de la proteína de 88.56 kDa, se observa otra proteína de 17.6 kDa (Fig. 4). Este resultado nos hace pensar que parte del sistema enzimático de degradación de luteína es inducible en *Geotrichum* por la presencia de luteína.

Gel SDS-Poliacrilamida 10%

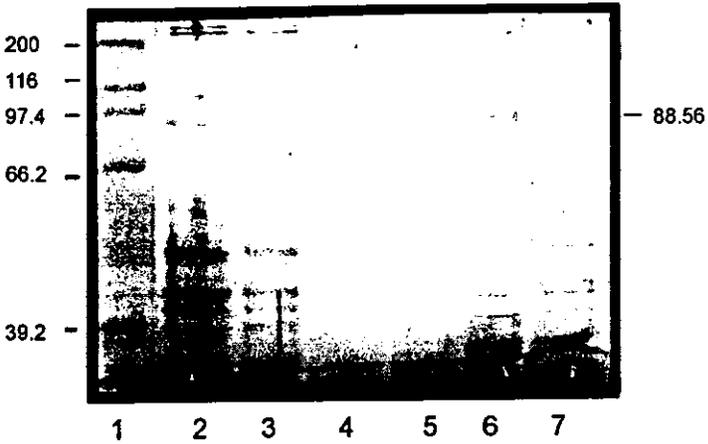


Fig 3. Gel SDS-poliacrilamida 10%. Muestras de proteína precipitada y concentrada de los medios de cultivo: 1. Marcador de peso molecular, 2. Mezcla de *Bacillus* y *Geotrichum* con luteína 3. Mezcla de *Bacillus* y *Geotrichum* sin luteína, 4. *Bacillus* con luteína, 5. *Bacillus* sin luteína, 6. *Geotrichum* con luteína, 7. *Geotrichum* sin luteína.

Gel SDS-Poliacrilamida 12%

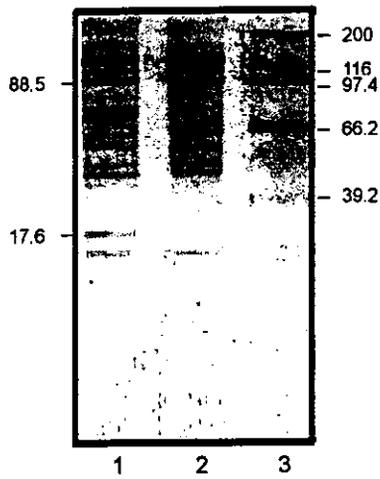


Fig 4. Gel SDS-poliacrilamida 12%. Muestras de proteína precipitada y concentrada de los medios de cultivo. 1. Mezcla de *Bacillus* y *Geotrichum* con luteína 2. Mezcla de *Bacillus* y *Geotrichum* sin luteína, 3. Marcador de peso molecular.

Zimograma

Se realizó un zimograma para detectar la actividad de oxidasa en la fracción proteica que degrada a la luteína en cajas petri, para ello esta fracción se separó por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 12% p/v (Maniatis et al., 1989). Para evitar la desnaturalización por el persulfato de amonio o TEMED el gel se eluyó por 1h antes de cargar las muestras. Después de la separación, el gel se incubó por 24 h a 29°C, superponiendo un gel de agarosa (0.3% p/v) preparado con buffer de fosfato de potasio 0.1M, pH 7.0 y luteína (0.04 mM). Bajo estas condiciones, no se detectó degradación de luteína.

Fermentación con diferentes concentraciones de luteína

Con el fin de evaluar la velocidad máxima de degradación de luteína y posteriormente poder optimizar la producción de los compuestos con aroma, se monitoreó la degradación de luteína en función del tiempo de fermentación variando la concentración de este sustrato. Se realizaron fermentaciones con el cultivo mixto de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. en las mismas condiciones reportadas por Sánchez-Contreras et al., (2000), pero con diferentes concentraciones de luteína (0.03, 0.04, 0.05, 0.1 y 0.12 mM). Se determinó la concentración de luteína en los medios de cultivo por densitometría a las 24 h de fermentación, lapso en el que se ha observado que se realiza la ruptura oxidativa de la misma. En la Fig 5 se

muestra el efecto que tiene la concentración de la luteína sobre su velocidad inicial de degradación a las 24 h de incubación.

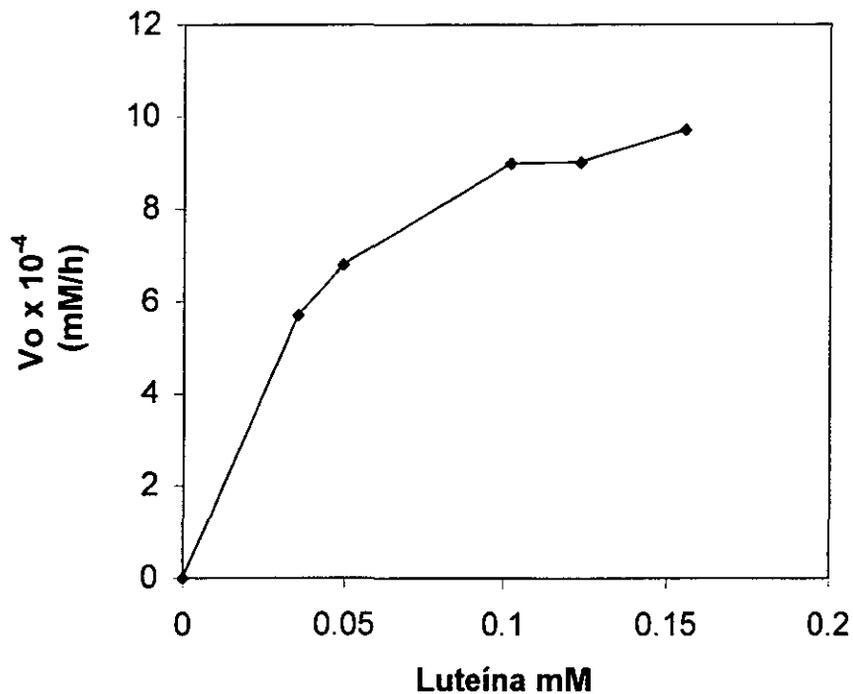


Fig 5. Efecto de la concentración de luteína sobre su velocidad de degradación a las 24 hrs de fermentación.

Podemos observar que la degradación de luteína se aproxima asintóticamente a una velocidad constante siguiendo una cinética de Michaelis-Menten.

La representación de este resultado graficando según Eadie-Hofstee (Fig 6) permite calcular valores de $V_{max} = 0.0305 \text{ mM/h}$ y $K_m = 24.926 \text{ mM}$.

Como observamos el valor de K_m es bastante grande, por lo que podríamos inferir que en este tiempo tenemos una cinética de primer orden, ya que depende linealmente de la concentración de sustrato.

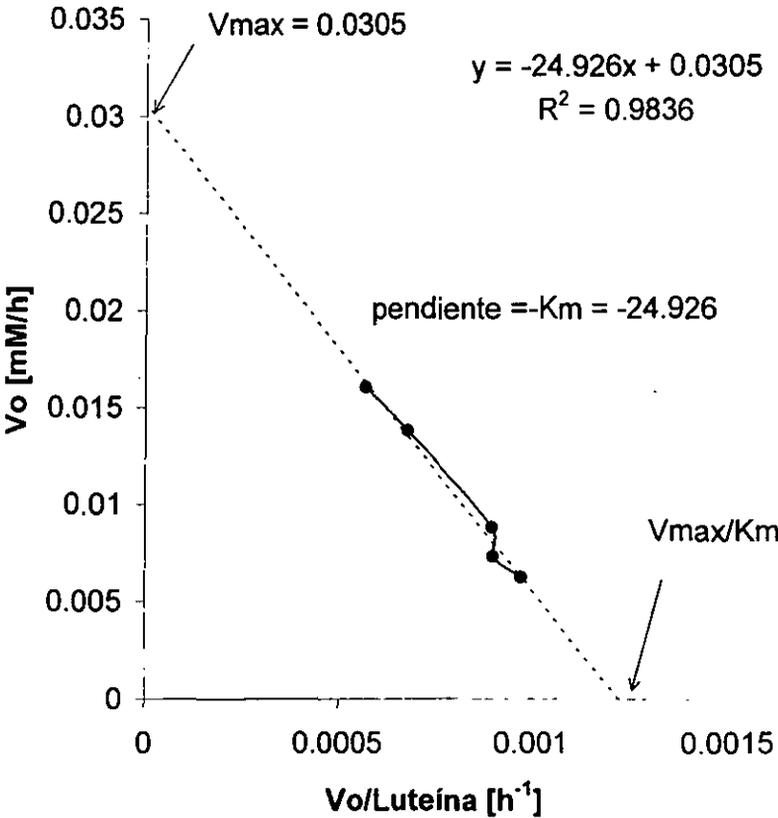


Fig 6. Representación de Eadie-Hofstee, para calcular V_{max} y K_m

Degradación de zeaxantina

La degradación de zeaxantina genera el mismo perfil de aroma a tabaco que se genera cuando la fermentación se realizó con luteína. En la Fig. 7 podemos observar una cromatografía en capa fina que compara los extractos de los medios de cultivo de este experimento con los que se obtienen cuando la fermentación se realiza con luteína.

Cualitativamente observamos que la mancha con R_f 0.79, es ligeramente más intensa que la que se genera usando luteína como sustrato. Además, observamos que cuando la fermentación se realiza con zeaxantina se generan dos manchas con R_f 0.63 y 0.46, mientras que la fermentación con luteína muestra una sola con R_f 0.63. Comparando cuantitativamente la degradación de luteína con la de zeaxantina (Fig 9a), observamos que se degrada el 86.37% de luteína y solo el 68.75 % de zeaxantina, además el producto con aroma se genera en una relación molar 1:1 y 1:2 con luteína y zeaxantina respectivamente (Fig 9c). Este resultado puede deberse a la ruptura oxidativa de la zeaxantina en sus dos extremos. Por otro lado, no se observan diferencias significativas comparando el crecimiento y el consumo de glucosa de las ambas fermentaciones (Fig. 9b).

Degradación de luteína y zeaxantina en función del tiempo de fermentación

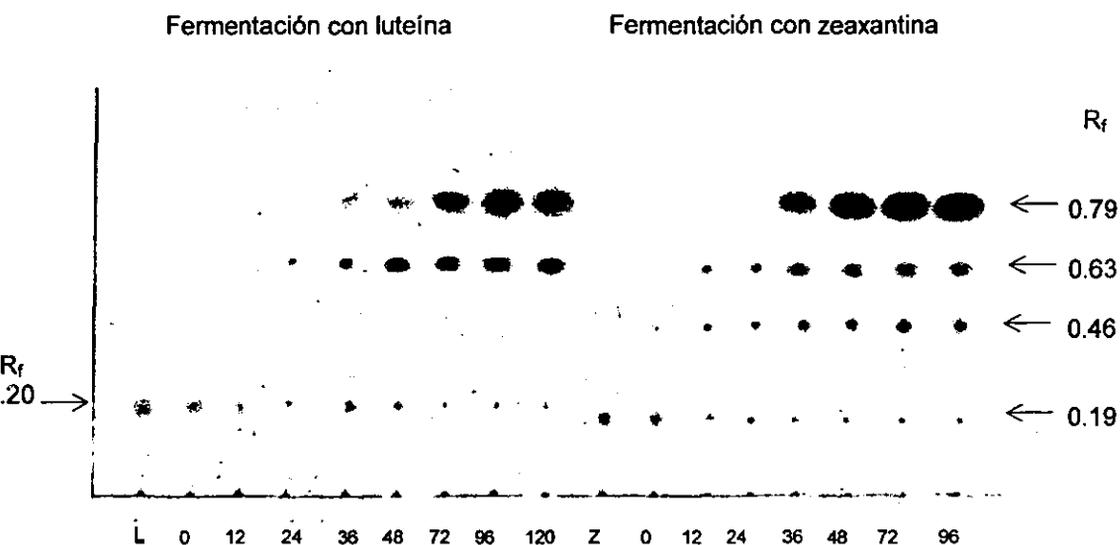


Fig.7 Cromatografía en capa fina, TLC-ALUGRAMSIL-UV 254, placas de 0.54 mm de espesor, desarrolladas en CH₂Cl₂/AcOET (80/20) y reveladas por aspersion de Ce(SO₄)₂·4H₂O (10%) en H₂SO₄ (2N) y calentamiento.

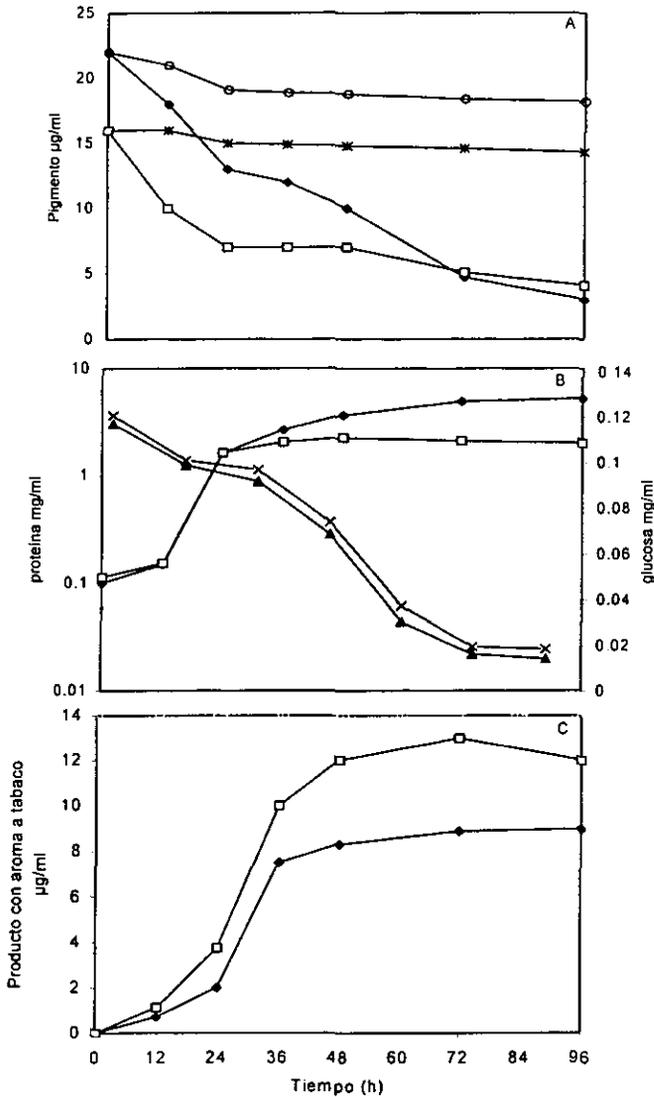


Fig. 8 Mezcla de microorganismos cultivada a 29°C y 60 rpm en medio YTN con luteína 0.04 mM o zeaxantina 0.03 mM y glucosa 0.02% A) Luteína consumida en presencia ♦ y en ausencia ○ de microorganismos y zeaxantina consumida en presencia □ y en ausencia * de microorganismos B) Cinética de crecimiento con luteína ♦ y con zeaxantina □, glucosa residual cuando se adiciona luteína × y zeaxantina ▲. C) Cinética de formación de compuestos a partir de luteína □ y zeaxantina ♦.

Discusión

Los carotenoides han sido estudiados ampliamente. Se han usado como colorantes y pro vitamínicos, pero actualmente se sabe que la degradación natural de los carotenoides contribuye a la calidad del aroma y sabor de muchos alimentos. En este sentido la utilidad de los carotenoides es ilimitada y se requiere de un conocimiento detallado de los sistemas enzimáticos responsables de dichas transformaciones.

Las iononas y damacenonas son responsables de los agradables aromas que se obtienen durante la maduración de algunos frutos. Se ha comprobado que estos compuestos se generan por diferentes métodos a partir de la ruptura de los carotenoides (Winterhalter, 1996). En la mayoría de los casos la ruptura oxidativa de los enlaces C-C es específica para los átomos 9-10 y 9'-10' de los carotenoides, dando lugar a la formación de iononas, damacenonas y sus derivados.

En este trabajo se generaron a partir de la luteína, 4 compuestos con un fuerte aroma a tabaco, todos ellos, han sido reportados como importantes constituyentes del aroma de la planta de tabaco (Burton y Kasperbauer 1985). En la naturaleza, las hojas de tabaco se maduran después de la cosecha para adquirir el perfil de aroma característico. Durante este proceso de maduración se ha comprobado que los carotenoides, y principalmente la luteína, decrecen considerablemente, mientras que las iononas y sus derivados aumentan (Burton y Kasperbauer 1985). En nuestro caso, durante el crecimiento de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp se degrada a la luteína, transformandola a productos con aroma a tabaco. Este proceso se da

básicamente en tres etapas: 1) ruptura oxidativa, 2) reducción, e 3) hidroxilación. Los resultados reportados en este trabajo confirman la hipótesis que se planteo y soportan la idea de que una de las etapas limitantes para esta bioconversión es la ruptura oxidativa.

Por ejemplo, en una fermentación de un litro, seguida por 96 horas, observamos que la mezcla de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. produce aproximadamente 31.8 mmoles de compuestos con aroma por cada 33.92 mmoles de luteína, pero cuando en la fermentación se utiliza zeaxantina en lugar de luteína, se degradan 21.28 mmoles de pigmento y se producen aproximadamente 39.7 mmoles de compuestos con aroma. Esto se debe a que la generación de los productos con aroma se da por la ruptura oxidativa de la molécula de zeaxantina en sus dos extremos, posiciones 9-10 y 9'-10', mientras que la molécula de la luteína solo se rompe en el extremo con el anillo beta, posición 9-10, generando como intermediario β -ionona. Este resultado hace pensar que la ruptura oxidativa de la luteína es específica para el extremo con el anillo β -insaturado (Fig. 6 del artículo).

La formación de β -ionona se da desde las 24 h de fermentación y se mantiene como único producto hasta las 36 h, probablemente debido a que este producto es tóxico en grandes cantidades. Como podemos observar en la Fig 8b, cuando el medio de cultivo es suplementado con zeaxantina, el crecimiento se ve ligeramente inhibido después de las 24 h, probablemente debido a que se genera más β -ionona como intermediario, ya que la producción de este compuesto se da en una relación molar de 2:1 cuando se empleó zeaxantina como sustrato. En la segunda etapa de

la bioconversión este intermediario disminuye su toxicidad por medio de dos reducciones sucesivas, llegando a acumularse sin ningún efecto aparente sobre el crecimiento microbiano. De este modo, al final de la fermentación encontramos principalmente 7,8-dihydro- β -ionol. Este compuesto junto con la 7,8-dihydro- β -ionona, se han reportado como productos de transformación de β -ionona, por la acción de reductasas aisladas de la planta de *Niconiana tabacum* (Tang y Suga 1994). El ultimo compuesto obtenido fue la 3-hidroxi- β -ionona, este compuesto se ha aislado de algunas flores, como *Osmanthus Fragans* apreciada por su agradable olor (Yang y Min 1993). También se ha obtenido a partir de β -ionona, usando un sistema de hidrolasas de *Aspergillus Niger* (Larroche 1995).

Por otro lado, hemos encontramos una estrecha correlación entre los sistemas enzimáticos que participan en la bioconversión de luteína a productos con aroma, y no se ha logrado separar por completo cada una de las etapas mencionadas. No es raro encontrar una correlación de este tipo, ya que las hidrolasas microbianas generalmente aparecen mezcladas con los sistemas de oxidasas que utilizan oxígeno molecular y que además requieren de un sistema de transporte de electrones, relacionado con un sistema de oxido-reductasas dependiente de NADP o NADPH (Smith, 1984).

Con este trabajo se han sentado las bases para lograr la separación de cada una de las etapas de esta bioconversión. Un paso importante fue lograr la degradación de luteína por un filtrado libre de células. Los resultados indican que la ruptura oxidativa de la luteína se debe a la acción de varias proteínas, que se excretan al

medio de cultivo, puesto que los extractos proteicos después de la separación por electroforesis no degradaron a la luteína, mientras que antes de la separación sí lo hacían. Posiblemente las dos proteínas que se inducen por la presencia de luteína actúan conjuntamente. Lamentablemente no se logró probar que un solo microorganismo sea responsable de este proceso, lo que dificultará la caracterización de este sistema. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que una de estas proteínas se encargue de la deshidroxilación y otra de la ruptura oxidativa. Puesto que no se probó si este sistema de bioconversión funciona usando β -caroteno como sustrato, de ser cierta esta suposición, al preparar un zimograma utilizando β -caroteno en lugar de luteína, muy probablemente podríamos detectar la actividad de oxidasa dependiente de un solo microorganismo.

Por otra parte la caracterización del sistema de reductasas promete ser más sencilla ya que existen reportes de un sistema similar, aislado de *Nicotiana tabacum* que reduce β -ionona, generando los mismos compuestos que nosotros obtuvimos a partir de luteína (Tang y Suga, 1994). Estudios preliminares han detectado que la actividad de reductasa está presente en *Bacillus* sp. y se ha encontrado que esta actividad es dependiente de NADPH (Maldonado G., comunicación personal).

CONCLUSIONES

- La bioconversión de luteína a productos con aroma se realiza durante el crecimiento celular de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp., básicamente en tres etapas: 1) ruptura oxidativa, 2) reducción, e 3) hidroxilación obteniéndose compuestos con un perfil de aroma similar al del tabaco.
- Las proteínas responsables de la degradación de luteína se excretan al medio de cultivo y la generación de este sistema enzimático depende de ambos microorganismos.
- La ruptura oxidativa es específicamente en el extremo del anillo β -insaturado, generando doble cantidad de producto cuando se utiliza zeaxantina en lugar de luteína.
- Aunque la ruptura oxidativa de la luteína depende de un sistema multienzimático parte de este sistema es inducible en *Geotrichum* sp. por la presencia de luteína.
- La transformación de luteína a compuestos con aroma, realizada por *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp., representa ventajas significativas con respecto a otros procesos de degradación térmica, microbiana o enzimática. Sin embargo, la cantidad de luteína transformada es muy baja, porque la velocidad de degradación de luteína disminuye después de las 24.

PERSPECTIVAS

- Optimizar la cantidad de luteína que *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp. son capaces de degradar por hora de fermentación.
- Corroborar la ruta de degradación propuesta, caracterizando todos los intermediarios generados e identificando las diferentes actividades enzimáticas, en cada etapa de la fermentación.
- Encontrar la relación que existe entre *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp durante la transformación de luteína a compuestos con aroma.
- Determinar la función que tienen las proteínas de 88.5 y 17.6 kDa, que se excretan al medio de cultivo, cuando *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp crecen en presencia de luteína.

REFERENCIAS

1. Armstrong G.A. (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biology of carotenoid pigment biosynthesis: A colourful tale. *Ann. Rev. Microbiol* 51: 629-659
2. Armstrong G.A. y Hearst J.E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoids pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237.
3. BFA Laboratories (1994). Method for the enzymatic preparation of aromas, particularly ionons and C6 to C10 aldehydes WO Patent 94/08028
4. Bioquimex, Comunicación personal (Ing. A.Torres)
5. Block G.B. Patterson y Subar A. (1992). Fruit, ege tables and cancer prevention : a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18: 1-20
6. Britton G., Liaeen_Jensen S. y Pfander H. (1995). Carotenoids today and challenges for the future . En G. Britton, S. Liaeen_Jensen y H. Pfander (eds) *Carotenoids Vol. 1ª : Isolation and Analysis*, p 13-26. Birkhauser Verlang, Basel.
7. Britton G. (1991). Carotenoids. *Meth Olant Biochem.* 7: 473-517.
8. Burton H.R. y Kasperbauer M.J. (1985). Changes in chemical composition of tobacco lamina during senescence and curing 1. Plastid pigments. *J. Agric Food Chem* 33:879-883.
9. Crout D.H.G., Christen M. (1989). In *Modern synthetic Methods*, Scheffold, C.R. (ed). Springer:Berlin, Heidelberg, pp 1-114
10. Demming A. B., Gilmore A.M., y Adams W.W. (1996). *FASEB J.* 10 (4): 403-412.

11. Ekstrand B. y Bjorck L. (1986). Fast protein liquid chromatography of antibacterial components in milk. Lactoperoxidase lactoferrin and lysosyme. J. Chrom. 358 (2): 429-33
12. Enzell C. (1985). Biodegradation of carotenoids an important route to aroma compounds. Pure Appl. Chem. 57: 693-700.
13. Enzell C. Wahlberg I. y Aasen A.J. (1977). Isoprenoids and alkaloids of tobacco. Progress Chem. Org. Nat. Prod. 34: 1-79
14. Gaziano J.M. (1994). Antioxidant vitamins and coronary artery diseases risk. Am. J. Med. 97: (suppl. 3A) 18s-21s.
15. Gey K.F. (1998). Vitamina E plus C and interacting conutrients required for optimal Health. A critical and constructive review of epidemiology and sipplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. Biofactors 7:113-174.
16. Gomez R, Goni F.M. y Macaarulla J.M. (1978). Carotenoids from marigold (*Tagetes erecta*) petals and their esterified fatty acids. Rev. Esp. Fisiol. 34: 253-256.
17. Hadden W.L., Watkins R.H., Levy L.W., Regalado E., Rivadeneria D.M., Van Breemen R.B. y Schwartz S.J. (1999). Carotenoids composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. J. Agric. Food. Chem. 47: 4189-94.
18. Hagedorn S. y Kaphammer B. (1994). Microbial Biocatalysis in the generation of flavor an fragrances chemicals. Ann. Rev. Microbiol. 48:773-800.

19. Johnson E.A y Schroeder W. A. (1995). Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng.* 53:119-178.
20. Law B.A. y Mulholland F. (1991). The influence of biotechnological developments on cheese manufacture. *Biotechnol. Gene. Eng. Rev.* 9:369-409
21. Larroche C., Creuly C. y Gros J.-B. (1995). Fed batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 222-227.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
23. Lutz-Wahl S., Fisher P., Schmidt-Dannert C., Wohlleben W., Hauer B. y Schmid RD. (1998). Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3878-81.
24. Maniatis T., Fritsh E.F. y Sambrook J. (1989). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: *Molecular Cloning*. (ed) Cold Spring Harbor Laboratory, New York: pp. 18.47-18.55
25. Murata M. y Kawanishi S. (2000). Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J. Biol. Chem.* 275:2003-2008
26. Paust J. (1996). Carotenoids Technical Synthesis. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen H. Pfander (eds). *Carotenoids Vol. 2: Sinthesis*, p. 259-291. Birkhauser Verlag, Basel.
27. Bureau S.M., Baumes R. L., y Razungles A. J., (2000). Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. Syrah. *J. Agric. Food Chem.*, 48. 1290-97.

28. Rodriguez-Amaya DB (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. Arch. Latinoam. Nutr. 49:38S-47S
29. Rosenberg I.M. (1996). Getting started with protein purification In: Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques, (ed) Birkhäuser, Boston, pp. 99-133
30. Sanderson G. W. y Gonzalez G. (1971). Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenoids in black tea aroma formation. J. Food Sci 36: 231-235.
31. Schiedt K. y Liaeen-Jensen S. (1995). Isolation and analysis. En: G. Britton, S. Liaeen-Jensen y H. Pfander (eds) Carotenoids Vol. 1ª: isolation and Analysis P 81-103. Birkhauser Verlag, Basel
32. Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J. A. y McCarty D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize. Science 276:1872-1874
33. Smith L.L., (1984) Steroids. In: Kieslich K. (ed) Biotechnology, vol 6ª. Verlag Chemie, Weinheim. P 31-38.
34. Sode K., Karube I., Araki R. y Mikami Y. (1989). Microbial conversion of β -ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent. Biotechnol. Bioeng. 33 : 1191-1195.
35. Tang Y-X. y Suga T. (1992). Characterization of two enone reductases from *Nicotiana tabacum* cell cultures. Phytochemistry. 31: 2599-2603
36. Whitehead M. I. (1998) Challenges to biocatalysis from flavor chemistry. Foodtechnology. 52: 40-46.

37. Winterhalter P. (1996). Carotenoids-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects In: Takeoka G.R., Teranishi R., Williams P.J., Kobayashi A. (eds). *Biotechnology for improved foods and flavours*. (ACS Symposium Series (637).
38. Yang T.S., Min D.B. (1993). Food flavors, ingredients and composition. In: Charambolus G. (ed) *Proceedings of the VII International Flavor Conference*. Elsevier, Amsterdam. Pp 150-157.
39. Yamazaki Y., Hayashi Y., Arita M., Hieda T., y Mikami Y. (1988). Microbial conversión of α -ionone, α -methyليونone and α -isomethyليونone. *Appl. Environm. Microbiol.* 54: 2354-2360