

47



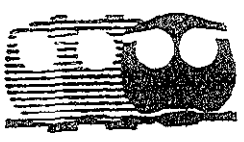
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DEL SISTEMA RESPONSABLE DE LA TRANSFORMACION DE LA β -IONONA EN COMPUESTOS CON AROMA A TABACO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA DE ALIMENTOS PRESENTA: GABRIELA MALDONADO ROBLEDO



MEXICO, D.F.

2001





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

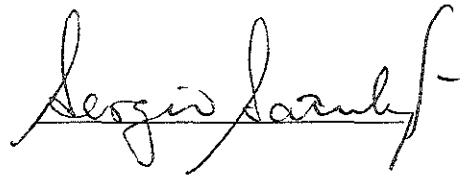
Jurado asignado:

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García
Vocal	Dr. Javier Plascencia de la Parra
Secretario	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
1er. Suplente	Biol. Luciano Hernández Gómez
2do. Suplente	Dr. Francisco Ruiz Terán

Tema desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Industrial, Depto. de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

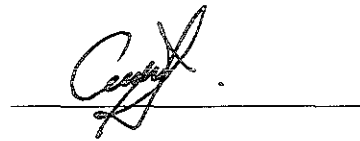
Asesor:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel



Supervisor Técnico:

Q. Ma. de los Ángeles Sánchez Contreras



Sustentante:

Gabriela Maldonado Robledo



Agradecimientos:

- ❖ **Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel**, con muchísimo cariño y admiración, por haberme dado la oportunidad de descubrir lo maravilloso de la ciencia.
- ❖ **A la Dra. Ma. de los Ángeles Sánchez Contreras**, por toda su paciencia y ayuda.
- ❖ **A todos los miembros del jurado**, por sus atinados comentarios.
- ❖ **A la M. en C. Beatriz Ruiz Villafán**, con cariño, por todos sus consejos, ayuda y apoyo moral.
- ❖ **Al E. en B. Marco Antonio Ortiz (MAO)**, por toda su ayuda.
- ❖ **A Eri, Silvia, Ely “la nena”, Israel, Joaquín, Miguelito:** porque juntos pasamos momentos muy padres, divertidos o tristes, pero inolvidables.
- ❖ **A mis compañeros** del laboratorio de Microbiología Industrial, con cariño.
- ❖ **A Ismael, Nora, Paty, Chucho, Rafa, Javier, Toño, Fabián, Pancho** y demás banda de la Facultad de Química, con un chorro de cariño.
- ❖ **Al QFB Agustín Luz Madrigal**, con cariño. Gracias por todos los momentos compartidos. Te deseo mucha suerte amigo.
- ❖ **A la MVZ Silvia Reyes Maya**, por estar conmigo en las buenas y en las malas, te quiero mucho.

A mi papá, Ing. Maldonado, con mucho amor:

Espero que siempre te sientas muy orgulloso de
"tu niña".

A mi mamá, Doña Susi:

Quiero que sepas que estoy orgullosa de ti, que
te quiero un chorro y que pase lo que pase
siempre estaremos juntas.

A mi hermana, Mónica, "Eswin":

Eres la mejor hermana que me pudo haber
focado, gracias por aguantarme, gracias por ser
mi amiga, te quiero mucho.

A mi hermano Carlos, "Carolo":

Quiero que sepas que a pesar de todo, tu sabes
que te quiero un chorro, espero que algún día
puedas encontrar tu camino y así, seguir mis
pasos.

A mi super abuelo, Don Carlos Robledo:

Sé que estarías muy contento de ver a tu
Gabrielita, el día de hoy. Te recuerdo con
mucho cariño y admiración y claro está,
también te extraño.

He visto

Un cielo estrellado, Un mar plateado,
Tormentas furiosas, Dignidad rebelde,
Buenas vibras de primavera,
Rapidez sobre el agua,
Máscaras y cabelleras,
Cantos en azul y oro,
Gritos en Azul...
Tintineos de copas,
Palabras a media voz,
El color de un suspiro,
Todo el tamaño de TODO hecho amor...

Ojitos amarillos. Tristeza.
Alegría. Furia. Tanto Amor.

He visto un corazón transformarse,
Que dejó al amor entrar,
Que lo dejó salir.
Que se siente inmensamente feliz.

Alegría infinita, el alma en la mano.
No importa nada, ni nadie de lo que se quedó atrás.

Imagino. Tantas cosas. Faltan tantas.
No puedo imaginar mi vida sin ti.
La imagino contigo, pintada de Azul y
Llena de Perfume de Gardenias.
Y la imagino así, para siempre.

El culpable:
El IQ, que no quiere serlo,
Mi casi microbiólogo,
A quien amo y admiro.
Quien tampoco tiene motivos
Para estar triste, sino al contrario...

A JERB

(El Ese Lalos)

Con TODO mi amor.

Índice

	Pág.
1.0 Resumen	1
2.0 Introducción	3
2.1 Producción industrial de aromas	3
2.2 Producción biotecnológica de aromas	7
2.2.1 Uso de microorganismos para la producción de aromas	8
2.2.2 Uso de enzimas en la producción de aromas	10
3.0 Marco Teórico	12
3.1 Generalidades sobre carotenoides	12
3.2 Obtención biotecnológica de aromas a partir de carotenoides	13
3.2.1 Uso de microorganismos	18
3.2.2 Uso de enzimas	19
3.2.2.1 Generalidades sobre oxidorreductasas	19
3.2.2.1.1 Uso de reductasas en la producción de aromas	21
3.2.2.1.2 Uso de oxigenasas en la producción de aromas	21
3.2.2.2 Uso de hidrolasas	22
3.2.3 Uso de tejidos y células vegetales	23
4.0 Antecedentes	24
4.1 Aislamiento y caracterización de los microorganismos	24
4.2 Identificación de los compuestos con aroma	26
5.0 Objetivos	28
6.0 Hipótesis	29
7.0 Estrategia General	30

	Pág.
8.0 Materiales y Métodos	31
8.1 Cepas microbianas de trabajo	31
8.2 Preservación de las cepas	31
8.3 Preinóculos e inóculos	31
8.4 Métodos analíticos	32
8.4.1 Determinación de luteína residual, producción de β -ionona y de aroma	33
8.4.2 Determinación de crecimiento	33
8.4.3 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa	34
8.4.3.1 Obtención del precipitado proteico	34
8.4.3.2 Determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa	35
8.5 Aislamiento de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa	36
8.6 Determinación del pH óptimo de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa	37
8.7 Determinación de la temperatura óptima de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa	38
9.0 Resultados y discusión	39
9.1 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa en <i>Bacillus</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp. y la mezcla de ambos utilizando un medio de cultivo adicionado con eofc como fuente de carbono	39
9.1.1 Cinéticas de crecimiento, consumo de luteína y producción de β -ionona y compuestos con aroma a tabaco en <i>Bacillus</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp. y la mezcla de ambos utilizando un medio de cultivo adicionado con eofc como fuente de carbono	40
9.2 Coenzima requerida por la β -ionona reductasa	45
9.3 Determinación del tiempo óptimo de la actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana	46
9.4 Determinación de la fracción con mayor actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana	49

	Pág.
9.5 Determinación del pH óptimo de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita al 20% de saturación con sulfato de amonio	51
9.6 Determinación de la temperatura óptima de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita al 20% de saturación con sulfato de amonio	52
9.7 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa en <i>Bacillus</i> sp. a partir de diferentes fuentes de carbono	54
9.8 Determinación de la actividad de β -ionona reductasa en <i>Geotrichum</i> sp. a partir de diferentes fuentes de carbono	58
10.0 Conclusiones	60
11.0 Bibliografía	62
Anexos	65
Anexo 1 Formulación del medio de cultivo empleado	65
Anexo 2 Determinación de la actividad catalítica	66
Anexo 3 Cantidad necesaria de sulfato de amonio a pesar según grado de saturación requerido	71
Anexo 4 Cálculos para la preparación de amortiguadores	72

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1 Esqueleto de <i>p</i> -mentano (A) y (trimetilciclohexenil)alquenona (B)	13
Figura 2 Principales clases de fragmentos provenientes de la degradación de carotenoides mediante la acción de dioxigenasas	16
Figura 3 Biotransformación de la β -ionona en 7,8-dihidro- β -ionona y 7,8-dihidro- β -ionol utilizando células inmovilizadas de <i>N. tabacum</i>	23
Figura 4 Microorganismos identificados en la colonia productora del aroma de tabaco	25
Figura 5 Ruta propuesta para la formación de los norisoprenoides derivados de la luteína	27
Figura 6 Reacción que se lleva a cabo para la determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa	35
Figura 7 Actividad de la β -ionona reductasa detectada en la mezcla microbiana y en cada uno de los microorganismos que la componen	40
Figura 8 Curva de crecimiento de la mezcla microbiana y de cada uno de los microorganismos por separado en un medio que contiene eofc como la principal fuente de carbono	42
Figura 9 Consumo de luteína durante la fermentación, por la mezcla microbiana y los microorganismos por separado	43
Figura 10 Producción volumétrica de β -ionona en los diferentes sistemas, a partir de un medio adicionado con eofc como fuente de carbono	43
Figura 11 Producción específica de β -ionona en los diferentes sistemas a partir de un medio adicionado con eofc como fuente de carbono	44
Figura 12 Producción de aroma de tabaco en los diferentes sistemas, a partir de un medio de cultivo adicionado con eofc como fuente de carbono	44
Figura 13 Actividad específica de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 60%, utilizando diferentes coenzimas	46
Figura 14 Determinación del tiempo óptimo de actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana, fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 60% de saturación	48

	Pág.
Figura 15 Actividad específica de la β -ionona reductasa y producción específica de aroma en las diferentes etapas de la fermentación	48
Figura 16 Reacciones propuestas para la transformación de la β -ionona en 7,8-dihidro- β -ionol	49
Figura 17 Actividad específica de la β -ionona reductasa, en las diferentes fracciones precipitadas del medio de cultivo, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50
Figura 18 Actividad de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita a 20% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes valores de pH	52
Figura 19 Actividad de la β -ionona reductasa en la fracción que precipita al 20% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a diferentes condiciones de temperatura	53
Figura 20 Curva de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en medio YTN, adicionado con diferentes fuentes de carbono	56
Figura 21 Cinética de producción de aroma de tabaco por <i>Bacillus</i> sp. crecido en diferentes fuentes de carbono	56
Figura 22 Actividad específica de la β -ionona reductasa en <i>Bacillus</i> sp. a partir de diferentes fuentes de carbono. Fraccionado a un 60% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	57
Figura 23 Cinética de crecimiento de <i>Geotrichum</i> sp. en medio YTN adicionado con diferentes fuentes de carbono	59

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Ventas estimadas en 1994 de las principales compañías fabricantes de aditivos que proporcionan sabor y aroma	5
Tabla 2 Consumo mundial de algunos compuestos con aroma	6
Tabla 3 Importantes compuestos con aroma generados por microorganismos	8
Tabla 4 Ejemplos de aromas que se obtienen a partir de los carotenoides	15
Tabla 5 Características de las reductasas purificadas a partir de cultivos celulares de <i>Nicotiana tabacum</i>	21
Tabla 6 Reactivos empleados en la determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa	35
Tabla 7 Amortiguadores empleados en la determinación del pH óptimo de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa	37

1.0 Resumen

Los compuestos naturales con aroma son de gran interés para la industria de las fragancias y los sabores. Debido a que las fuentes de estos compuestos son limitadas, existe un creciente interés en desarrollar fuentes alternativas para la obtención de los mismos. A últimas fechas, se ha desarrollado una alternativa biotecnológica a la producción sintética de compuestos norisoprenoides de 13 carbonos con aroma (ej. iononas), que involucra degradación de carotenoides, ya sea utilizando enzimas, microorganismos o cultivos de células vegetales. La ventaja de tales bioconversiones es que los productos que resultan de las mismas son considerados como "naturales" por las legislaciones de Estados Unidos y de la Comunidad Económica Europea.

En el Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, se aislaron dos microorganismos capaces de crecer en un medio suplementado con un extracto óleo de flor de cempasúchitl (que contiene 89% del oxicarotenoide luteína) como única fuente de carbono, los cuales resultaron importantes por su capacidad de generar compuestos volátiles con aroma a tabaco. Los microorganismos fueron identificados como *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. A partir de este hecho, se planteó una posible ruta metabólica para transformar a la luteína en dichos compuestos. El objetivo de este trabajo fue identificar el papel que realiza cada uno de los microorganismos de dicho sistema en la bioconversión de la luteína y caracterizar el sistema enzimático involucrado en la transformación del intermediario β -ionona en los compuestos con aroma a tabaco. La producción del aroma solo se logró en presencia de ambos microorganismos y luteína. Sin embargo, *Geotrichum* sp. fue capaz de producir β -ionona a partir de luteína, lo cual hace suponer que este microorganismo es el que se encarga de oxidar a la luteína. Por otro lado, al crecer a *Bacillus* sp. en un medio suplementado con la máxima cantidad de β -ionona producida por *Geotrichum* sp., como fuente de carbono, éste fue capaz de generar el perfil de aroma a tabaco, lo cual sugiere que este microorganismo es el responsable de la reducción de la β -ionona.

Utilizando un método espectrofotométrico, se detectó actividad de la enzima que llamamos β -ionona reductasa, la cual resultó ser NADPH dependiente. El tiempo óptimo de actividad de esta reductasa se encontró a las 42 h de incubación de un cultivo de la mezcla microbiana, utilizando luteína 0.04 mM como fuente de carbono. Se realizó una purificación parcial de la misma, precipitando el medio de cultivo con sulfato de amonio y la fracción con mayor actividad de reductasa resultó ser la que precipitó cuando se llevó a cabo una saturación del medio desde un 0 hasta un 20%. Se encontró que la β -ionona reductasa contenida en esta fracción presenta temperatura óptima entre 35 y 40°C, así como un valor de pH óptimo de 4.

2.0 *Introducción*

2.1 **Producción Industrial de aromas**

La producción y el uso de aromas en el ámbito industrial comenzaron en el siglo XIX con el aislamiento de algunas sustancias responsables del aroma característico de algunos productos naturales. Hace más de 150 años, el benzaldehído fue el primer compuesto saborizante que se identificó en el aceite de almendras dulces [1], pero sin embargo, fue el aislamiento, identificación y síntesis de la vainillina en 1876, lo que marcó los inicios de la industria moderna de los sabores y aromas. La síntesis de los compuestos que reproducen el olor y sabor característico de los productos naturales fue lo que dio lugar a una nueva rama de la industria química. Sin embargo, la expansión de dicha industria empezó hasta hace apenas 50 años [2].

Los ingredientes que proporcionan sabor y aroma comprenden el grupo más numeroso de aditivos empleados tanto en la industria alimentaria como en la de cosméticos y de productos de limpieza. Dichos productos incorporan cantidades importantes de sabores y fragancias, lo que justifica la aparición de una industria especializada.

La estructura de la industria de los sabores y aromas es complicada ya que no es homogénea, sino que está compuesta de sectores cercanamente interrelacionados[3], que son:

- 1) Los aceites esenciales y extractos naturales, los cuales se definen como materiales aromáticos obtenidos a partir de fuentes vegetales o animales mediante los procesos de destilación, prensado (en frío), extracción con solventes o maceración. Los aceites esenciales representan mezclas complejas conformadas por cientos de compuestos químicos y pueden ser utilizados para impartir una esencia o aroma para productos de consumo. Además pueden emplearse como materia prima para formular composiciones o como fuente para aislar compuestos, también usados en las formulaciones.

- 2) Los compuestos químicos con aroma, que son compuestos orgánicos con una estructura química definida, y que son producidos por síntesis orgánica, o aislados de los aceites esenciales. Básicamente se utilizan en la formulación de sabores y fragancias.

- 3) Las fragancias formuladas, que son mezclas complejas de materiales aromáticos tales como aceites esenciales y sus derivados naturales, así como de aromas sintéticos y que contienen mas de 100 constituyentes. Pueden estar concentradas, diluidas con disolventes o unidas a acarreadores. Estas fragancias se utilizan para dar esencias a los perfumes finos, productos para el cuidado personal y productos para aseo de la casa o como aditivos de la industria de tabaco.

El consumo de aromas y sabores en 1994 se estimó en US \$9.7 billones, de los cuales el 14.8% fue en aromas sintéticos, 17.5% en aceites esenciales y otros extractos naturales, 29.2% en fragancias formuladas y 38.5% en sabores [3].

Existen alrededor de 800 compañías dedicadas a producir tales aditivos en todo el mundo, pero menos de la mitad de ellas tienen ventas significativas y solo unas pocas de las principales casas de sabores y fragancias fabrican y venden el rango completo de productos existentes (incluyendo materias primas selectas y productos formulados). En el año de 1994, 14 compañías obtuvieron el 73.4% del total de las ganancias mundiales de la industria del ramo [3] (Tabla 1).

Tabla 1

Ventas estimadas en 1994 de las principales compañías fabricantes de aditivos que proporcionan sabor y aroma [3]

COMPAÑÍA	Ventas (millones de dólares)	% del total de ventas
International Flavors & Fragrances (EU)	1315	13.6
Givaudan-Roure (Suiza)	980	10.1
Quest International (Gran Bretaña/ Holanda)	930	9.6
Bayer -Harman & Reimer & Florasynth- (EU y Alemania)	850	8.8
Firmenich (Suiza)	708	7.3
Takasago International (Japón)	500	5.2
Bush Boake Allen (EU)	375	3.9
T Hasegawa Co. (Japón)	356	3.7
Dragoco Gerbending & Co. (Alemania)	260	2.7
Tastemaker (EU)	210	2.2
Universal Flavors (EU)	180	1.9
V Mane Fils (Francia)	160	1.7
Ogawa & Co. (Japón)	158	1.6
Robenet (Francia)	130	1.3
SUBTOTAL	7112	73.4
Otras compañías	2575	26.6
TOTAL	9687	100.0

La producción de materias primas para elaborar fragancias ha sido dominada por los fabricantes europeos, particularmente por las compañías francesas que tienen el 45% de la producción mundial de las mismas. Sin embargo, países como Brasil, China, Hong Kong, India y Singapur se han revelado por su papel importante dentro de este rubro [3].

Los aromas sintéticos son otro grupo importante de materias primas para hacer formulaciones e incluyen muchas clases de compuestos químicos tales como benzenoides, terpenos, compuestos del tipo del almizcle y compuestos heterocíclicos. Mas de 300 compuestos son los que se utilizan en las composiciones de fragancias y sabores, pero solamente se ofrecen unos pocos en el mercado; de éstos, menos de 100 se utilizan en cantidades mayores de 50 toneladas por año [3] (Tabla 2).

Tabla 2
Consumo mundial de algunos compuestos con aroma

COMPUESTO	CONSUMO (Ton/ año)
BENZENOIDES	
α -Amil cinamaldehído	2000
Anetol	3200
p-Anisalaldehído	1200
Acetato de bencilo	4000
Benzoato de bencilo	750
Salicilato de bencilo	950
Cinamaaldehído	2000
Cumarina	1850
Ciclamen aldehído	450
Oxido de difenilo	1500
Etil vainillina	1100
Eugenol	800
Heliotropina	1100
α -Hexil cinamaldehído	4300
Salicilato isoamílico	1100
Lilal	2500
Benzoato de metilo	1500
Salicilato de metilo	600
Alcohol 2-fenilefílico y ésteres	7000
Vainillina	5500
TERPENOS Y TERPENOIDES (cíclicos y acíclicos)	
Terpenos acetilados de madera de cedro	500
Bomeol/ Isobomeol y ésteres	1000
1-Carvona	400
Citral	1200
Citronelal	400
Citronelol y ésteres	2800
Geraniol/ nerol y ésteres	3500
Hidroxicitronelal	1100
Iononas/ metil iononas	3500
Linalool y ésteres	6000
1-Mentol	4000
α -Terpineol y ésteres	3300
Tetrahydrogeraniol y ésteres	710
QUÍMICOS DEL TIPO DEL ALMIZCLE	
Almizcles macrocíclicos	330
Nitroalmizcles	1700
Almizcles policíclicos	6200
OTROS	
Aldehídos alifáticos	1450
Ésteres de ácidos graso de cadena corta	5800
Compuestos heterocíclicos	230

2.2 Producción biotecnológica de aromas

Las operaciones a las que se somete a los alimentos, desde que son cosechadas las materias primas hasta que se almacenan y posteriormente se procesan, pueden causar un deterioro en la calidad de su sabor y aroma, que en la mayoría de los casos requiere de un enriquecimiento subsecuente con compuestos que les proporcionen el aroma que originalmente tenían, para que sean bien aceptados por los consumidores. Debido a que estos compuestos se utilizan en cantidades considerables, se han buscado alternativas para mejorar su producción. Los métodos biotecnológicos para la obtención de compuestos con aroma naturales se están expandiendo rápidamente, debido a que con dichos métodos se obtienen productos con aroma, que son clasificados como naturales por las legislaciones tanto de Europa como de Estados Unidos, lo que representa una ventaja económica muy grande [4].

Además, la obtención biotecnológica de aromas le proporciona a la industria de los aditivos ventajas adicionales: una independencia de la agricultura y de las posibles pérdidas ocasionadas por las condiciones locales de producción (clima, enfermedades, pesticidas, fertilizantes, restricciones de venta, inestabilidad socio-política del país donde se produce). En el enfoque biotecnológico también se tiene la posibilidad de escalar la producción a nivel industrial pues si se conocen las rutas metabólicas que conducen a la obtención de los aromas, y la manera en que estas rutas están reguladas, se pueden diseñar procesos para la sobreproducción del compuesto y su recuperación. De este modo, se tiene la posibilidad de crear una fuente inagotable de un producto que sea homogéneo y bien definido [1].

El desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción de compuestos con sabor y aroma puede ser una tarea ardua ya que la mayoría de los aromas naturales están formados por varios cientos de compuestos. Sin embargo, el problema se reduce si se toma en cuenta que existen muy pocos compuestos que se consumen en una cantidad superior a los 3000 kg/ año [5]. Al mismo tiempo, es importante conocer el papel del compuesto con aroma dentro de una formulación, así como su precio de venta, para decidir que tan adecuada es su producción biotecnológica.

Existen varias opciones para la producción biotecnológica de aromas, las cuales comprenden biotransformaciones de un solo paso, bioconversiones y síntesis de novo con microorganismos y enzimas. Los microorganismos se emplean para realizar transformaciones complejas o para obtener mezclas de productos, mientras que las enzimas se utilizan para transformaciones de un solo paso.

2.2.1 Uso de microorganismos para la producción de aromas

Muchos de los compuestos con aroma que les dan su carácter organoléptico distintivo a los alimentos o a las fragancias, han sido identificados en diversos cultivos microbianos y se ha visto que son estructuralmente idénticos a los que se obtienen de otras fuentes naturales como las plantas [1] (Tabla 3).

Tabla 3
Importantes compuestos con aroma generados por microorganismos [1]

Compuesto de importancia	Especie que la produce
Hongos	
Vainillina	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>
Benzaldehído	<i>Ischnoderma benzoinum</i>
Salicilato de metilo	<i>Phenillus</i> sp.
Lentionina	<i>Lentinus edodes</i>
Citronelol	<i>Mycena pura</i>
Linalool	<i>Wolfiporia cocos</i>
Cumarinas	<i>Pleurotus euosmus</i>
Metil cetonas	<i>Aspergillus niger</i>
Pirazinas	<i>Aspergillus</i> sp.
Levaduras	
Furaneol	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Lactonas macrolíticas	<i>Torulopsis bombicola</i>
Feniletanol y ésteres	<i>Kluyveromyces</i> sp.
Bacterias	
Diacetilo	<i>Lactobacillus lactis</i>
Metil cetonas	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Geosmina	<i>Streptomyces citreus</i>
Pirazinas	<i>Bacillus</i> sp.
2-Acetil-1-pirrolina	<i>Bacillus cereus</i>
Borneol, isoborneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>

Al utilizar microorganismos para la producción de compuestos con aroma, se pueden tener dos opciones: las biosíntesis y las biotransformaciones/ bioconversiones. Las biosíntesis se refieren a la producción de compuestos químicos a partir del metabolismo secundario de las células o los procesos de fermentación, mientras que las bioconversiones se definen como el uso de células microbianas para llevar a cabo modificaciones o interconversiones específicas sobre las estructuras químicas, en donde el proceso comprende una o un número pequeño de reacciones enzimáticas [6]. Por otro lado, si la transformación involucra varios pasos, se habla entonces de biotransformaciones [7]

La mayoría de los compuestos con aroma obtenidos a partir de fermentaciones microbianas, son metabolitos secundarios que se producen en bajas concentraciones [6], pero pueden ser detectados al nivel de muy pocas partes por millón. Sin embargo, la cantidad tan pequeña en que son generados los compuestos con aroma y el alto costo requerido para su recuperación, son los principales obstáculos para el desarrollo de nuevos procesos de fermentación. Se considera que la producción industrial de un aroma utilizando microorganismos es costea-ble solamente si el compuesto en cuestión tiene un valor en el mercado de US \$200 a US \$500/kg [8].

El uso de los microorganismos es una buena alternativa para la obtención biotecnológica de aromas con respecto a los métodos de síntesis química tradicional, e incluso procesos enzimáticos, ya que no requieren de cofactores ni de sistemas para la regeneración de los mismos. La ventaja de trabajar con microorganismos radica en que pueden manipularse para sobreproducir el producto deseado. Primero se hace una selección de microorganismos potencialmente productores de un aroma. El siguiente paso es conocer tanto bioquímica como fisiológicamente el comportamiento de tal organismo y tratar de dilucidar las rutas metabólicas y las enzimas involucradas en la producción del aroma de interés. Una vez que se conoce esto último, se puede proceder a hacer una manipulación, ya sea genética o fisiológica, para incrementar la producción del compuesto de interés. Por otro lado, los parámetros de la fermentación tales como aireación, composición del medio de cultivo, cantidad de preinóculo, alimentación de sustratos, temperatura y pH también

pueden manipularse para mejorar tanto la calidad como la cantidad del producto con aroma que se esté generando [8].

Sin embargo, algunas desventajas aun deben ser superadas. Entre éstas tenemos el hecho de que las reacciones a menudo involucran el uso de sustratos a muy bajas concentraciones molares, del orden de micromoles, y que los rendimientos y velocidades de reacción son a menudo muy bajos.

2.2.2 Uso de enzimas en la producción de aromas

El uso de enzimas se ha convertido en una alternativa a los procesos fermentativos para obtener aromas que pueden clasificarse como naturales. El 65% de las enzimas que se utilizan en la síntesis orgánica pertenecen a las hidrolasas o a las deshidrogenasas. Sin embargo, las reacciones de deshidrogenación en su mayoría son llevadas a cabo por microorganismos debido a que a las enzimas se les tiene que proporcionar su cofactor [9].

Durante mucho tiempo, no se utilizaron industrialmente las enzimas, principalmente por considerarse que presentan la desventaja de ser costosas, algunas veces poco específicas y en general inestables. Sin embargo, debido a los avances tanto en química, biología y tecnología de enzimas, tal percepción ha cambiado, porque:

- 1) Se ha visto que muchas reacciones enzimáticas transforman estereoselectivamente sustratos ya sea naturales o artificiales a productos sintéticos útiles.
- 2) Se han desarrollado nuevas técnicas para la inmovilización y estabilización de enzimas [10].
- 3) Los recientes avances en biología molecular y celular, bioinformática y química analítica han creado nuevas herramientas para manipular genes que permitan la expresión de una proteína en particular [11].

4) La tecnología de DNA recombinante ha abierto el camino para la producción a bajo costo de proteínas, incluyendo enzimas, y para la alteración de sus propiedades [12-13].

3.0 Marco teórico

3.1 Generalidades sobre carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos naturales mas ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estructuralmente son compuestos de 40 átomos de carbono, derivados del isopreno. Pueden ser de dos clases: los carotenos, compuestos hidrocarbonados (ej. β -caroteno, α -caroteno), y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos (ej. luteína, zeaxantina). Estos compuestos, poseen colores que van del amarillo al rojo, lo cual se deriva de la presencia de dobles enlaces conjugados que conforman un cromóforo largo, lo que les da la característica de absorber luz en la región visible. Al ser moléculas no polares, se encuentran asociados con las regiones lipofílicas de las células, incluyendo las membranas [14].

Los carotenoides son producidos por bacterias, algas, algunos hongos y plantas, y aunque no son sintetizados por los animales, éstos pueden ser alterados por oxidación o isomerización y convertidos en vitamina A y retinoides. Los carotenoides se utilizan en avicultura y en piscicultura como suplementos de alimentos para proporcionar color a la piel de pollos, salmones y crustáceos. Estudios recientes sobre la participación de los carotenoides en la salud de los humanos han demostrado que son de utilidad en la prevención o retardo de algunas enfermedades degenerativas, incluyendo al cáncer [14].

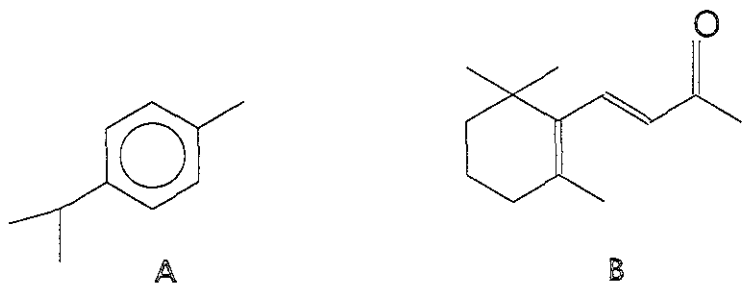
Tradicionalmente, los carotenoides se obtienen a partir de plantas (ej. flores de cempasúchitl, maíz) o por síntesis química, aunque algunos de ellos se producen por síntesis microbiana [14].

3.2 Obtención biotecnológica de aromas a partir de carotenoides

Los aldehídos y las cetonas juegan un papel fundamental en la perfumería y continúan siendo la elección por excelencia para la composición de los perfumes [15]. Mientras que las cetonas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, la mayoría de los derivados de aldehídos se obtienen mediante síntesis. Entre los terpenos monocíclicos, los aldehídos se encuentran en una muy baja concentración en los aceites esenciales y por lo mismo, rara vez son utilizados. Por otra parte, las cetonas que tengan los esqueletos *p*-mentano o (trimetilciclohexenil)alquenona **A** y **B** son comercialmente importantes como compuestos con aroma (Fig. 1).

Figura 1

Esqueletos de *p*-mentano (A) y (trimetilciclohexenil)alquenona (B)



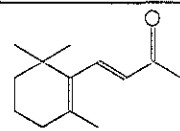
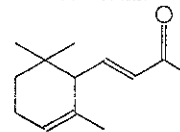
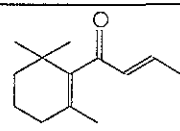
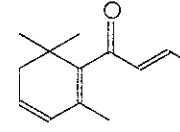
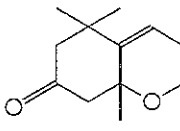
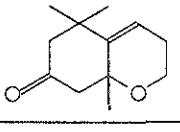
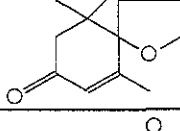
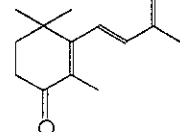
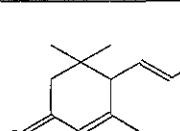
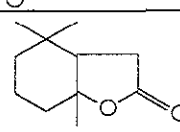
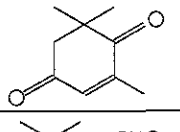
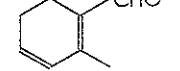
A partir de la combinación de dobles enlaces, ya sea conjugados o no con el grupo carbonilo, se han preparado múltiples sustancias, en función de los compuestos que han sido aislados de manera natural por sus propiedades de aroma. Entre estos, tenemos fragancias de gran impacto tales como las mentonas, carvonas, iononas y damasconas. La desventaja de su síntesis orgánica es que resulta costosa y no se obtienen productos ópticamente puros, lo cual en aromas es muy importante, ya que muchas veces, solamente un isómero tiene las propiedades de aroma que se desean [16]

Se sabe que los carotenoides son precursores de múltiples compuestos que imparten aromas muy característicos, entre los que se cuentan los aromas del azafrán, el té, las rosas, las uvas y el tabaco, dentro de los cuales proporcionan notas que se consideran esenciales para el perfil de los mismos. Estos aromas se consideran como muy atractivos en la industria de los sabores y fragancias, por sus propiedades aromáticas y debido a que tienen un umbral de aroma muy bajo.

A pesar de que se conocen múltiples compuestos con aroma que provienen de los carotenoides (Tabla 4)., los cuales se han aislado a partir de extractos de plantas, aun se conoce muy poco sobre la bioquímica del catabolismo de los mismos para la formación de aromas.

Tabla 4

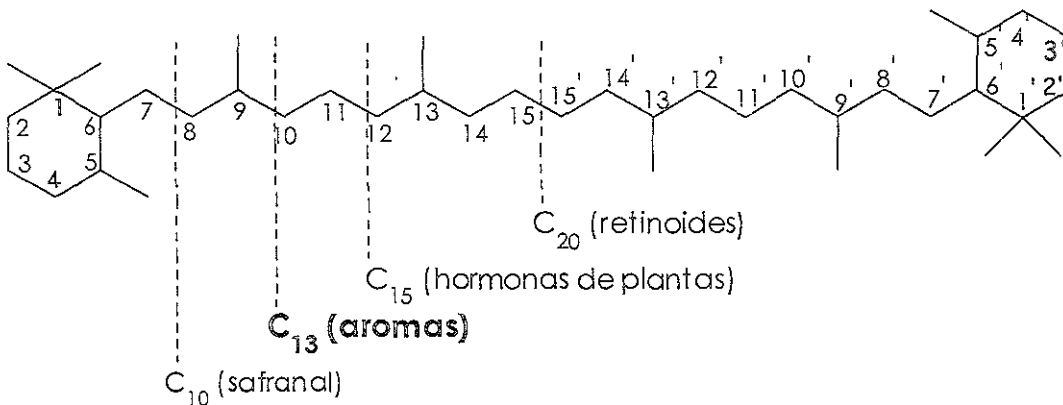
Ejemplos de algunos aromas que se obtienen a partir de los carotenoides

NOMBRE	ESTRUCTURA	DONDE SE ENCUENTRA	AROMA
β -Ionona		Rosa, té negro, jitomate, moras, fruta de la pasión, zanahorias, Tabaco	Madera, violetas, frutal
α -Ionona		Grosella, te negro, frambuesa, zanahoria, plátano, cereza, Tabaco , durazno, palomitas de maíz	Madera, tono a violeta
β -Damascona		Rosa, Té negro, papaya, ron, Tabaco	Frutal, té
β -Damascenona		Chabacano, rosa, cerveza, carambola, uva, kiwi, mango, jitomate, vino, ron, frambuesa	Nota a tabaco, floral, té
Oxo-Edulano I		Fruta de la pasión, Tabaco Burley , Tabaco Virginia	Tabaco oriental
Oxo-Edulano II		Fruta de la pasión, Tabaco Burley , Tabaco Virginia	Tabaco oriental
Teaspirona		Té negro, Tabaco Burley	Té
4-oxo- β -ionona		Té negro, Tabaco Burley	Rico en notas dulces
3-oxo- α -ionona		Tabaco Virginia	Dulce, floral
Dihydroactinidiolina		Té negro, jitomate, casia, ámbar, Tabaco	Muy ligero y fresco
4-oxoisoforona		Té negro, azafrán	Té, herbal
Safranal		Azafrán, té negro, jugo de toronja, hierba mate, páprika	Azafrán, verde, dulce, heno

Se sabe que la ruptura *in vivo* de los carotenoides, generalmente es catalizada por sistemas enzimáticos de dioxigenasas [17-20]. Todos los dobles enlaces de la cadena central de los carotenoides son susceptibles al ataque enzimático, lo que resulta en la formación de varias clases de compuestos que tienen 10, 13, 15 o 20 átomos de carbono (Fig. 2).

Figura 2

Principales clases de fragmentos provenientes de la degradación de carotenoides mediante la acción de dioxigenasas [24]



En tejidos de frutas, se ha visto que el ataque oxidativo del doble enlace localizado en la posición 9,10 (9',10') parece ser preferido, además de que solamente esta reacción de ruptura conduce a los norisoprenoides de 13 carbonos, los cuales se consideran como importantes productos con aroma.

Existe evidencia de que estos compuestos de 13 carbonos provienen de la degradación oxidativa de los carotenoides:

- 1) Estereoquímica de los fragmentos: Se han hecho experimentos que demuestran que la estereoquímica del fragmento de 13 C es idéntica a la del carotenoide del cual proviene [21].

- 2) Cambio en la composición de carotenoides durante la maduración o el procesamiento de las plantas en donde se encuentran presentes: En el té, tabaco y uvas se ha encontrado que el incremento en la concentración de norisoprenoides de 13 C, coincide con un decremento en la concentración de carotenoides [22-24].

- 3) Identificación de otros fragmentos provenientes del carotenoide: Además de los compuestos de 13 carbonos, se han encontrado en los tejidos de frutas, fragmentos de 14 o 27 carbonos. Así, se ha propuesto que primero se da la ruptura enzimática en el doble enlace 9,10 del carotenoide, lo que genera un fragmento de 13 C y uno de 27 C [25]. Este fragmento de 27 C, también sufre el ataque de dioxigenasas, lo que genera otro fragmento de 13 C y uno de 14 C, el cual se deriva de la porción central del carotenoide.

Los fragmentos obtenidos a partir de esta ruptura por dioxigenasas, se conocen como productos primarios de degradación. De estos, solamente la α - y la β -ionona presentan un umbral de aroma bajo. Estos compuestos, pueden sufrir una serie de reacciones posteriores, antes de convertirse en un compuesto con un aroma más importante. Estas transformaciones incluyen reacciones de oxidación, deshidrogenación, reducción o eliminación.

En resumen, los tres pasos para la formación de compuestos norisoprenoides de 13 C con aroma son [26]:

- 1) Ruptura inicial por dioxigenasas
- 2) Transformación(es) enzimática(s) subsecuente(s) de los productos primarios de degradación
- 3) Conversión final catalizada por ácido a un compuestos con aroma.

La producción biotecnológica de aromas a partir de carotenoides, se puede llevar a cabo mediante el uso de: microorganismos, enzimas o células vegetales.

3.2.1 Uso de microorganismos

Los sistemas microbianos, generalmente son utilizados cuando se requiere que el compuesto que se les suministra como sustrato sufra una modificación como: hidroxilación, epoxidación u oxidación multienzimática controlada. Esto puede lograrse utilizando solamente microorganismos intactos en forma de cultivo microbiano, células en reposo o células inmovilizadas. En general, los microorganismos se prefieren cuando lo que se requiere es una reacción de óxido-reducción, debido a que no se requiere adición de cofactores y a que este tipo de enzimas suelen ser muy inestables.

Se han aislado un gran número de compuestos con un anillo trimetilciclohexano a partir del tabaco. Estos compuestos tienen la característica de tener un umbral de aroma muy bajo [27] y se piensa que son componentes clave de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de la planta de tabaco curadas al aire.

Debido a lo expuesto, se han realizado múltiples investigaciones para tratar de obtener aromas de tabaco mediante la transformación microbiana ya sea a partir de carotenoides o de iononas, las cuales se consideran como intermediarios claves de los carotenoides [28]. En 1982, en la compañía Suiza Givaudan, utilizando células en reposo de *Lasiodiplodia theobromae* ATCC 28570, se logró la oxidación de la β -ionona y se obtuvo un aceite esencial característico del tabaco Burley.

El problema con la biotransformación de la β -ionona es en primer lugar, que este compuesto tiene una alta actividad antimicrobiana. Mikami, *et al*, [29] encontraron que los únicos géneros microbianos capaces de hacer lo anterior fueron *Aspergillus* y *Rhizopus*. Sin embargo, el microorganismo que más ha sido utilizado para biotransformar a la β -ionona en sus derivados hidroxilados, ha sido el hongo *Aspergillus niger*. Lo anterior se debe a que este microorganismo posee una alta actividad de hidroxilación sobre los terpenos y terpenoides. Los principales productos que se han obtenido de tales transformaciones son: 4-hidroxi- β -ionona, 2-hidroxi- β -ionona, 2-oxo- β -ionona y 4-oxo- β -ionona [30].

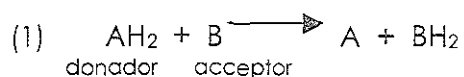
La resistencia de *A. niger* a la inhibición por β -ionona puede incrementarse si para llevar a cabo la biotransformación de la misma, se utiliza el micelio atrapado en cubos hidrofóbicos de poliuretano y se añade isooctano, al medio de cultivo [31]. Otra solución a la toxicidad de la β -ionona, utilizando cultivo por lotes, fue empleada con otra cepa de *A. niger* (IFO 8541) inmovilizando sus esporas en esferas de alginato de calcio, con lo cual se obtuvo un rendimiento mas alto de los compuestos con aroma [32].

3.2.2 Uso de enzimas

Para la producción de compuestos norisoprenoides de 13 carbonos con aroma existen tres sistemas enzimáticos que han ganado importancia: las oxidorreductasas, las hidrolasas y las dioxigenasas [26].

3.2.2.1 Generalidades sobre oxidorreductasas

El 25% de todas las aplicaciones de enzimas en biotecnología, comprende a las oxidorreductasas [26]. Las oxidorreductasas son una clase de enzimas que catalizan reacciones entre dos sustratos, un oxidante y un reductor. La reacción que se lleva a cabo es esencialmente una transferencia de equivalentes de reducción (usualmente dos) desde un sustrato hasta el otro, (como átomos de hidrógeno, electrones, iones hidruro, etc.). En un gran número de casos la oxidación de donador consiste en la conversión de un grupo $-\text{CHOH}-$ en un grupo $>\text{C}=\text{O}$ o de un grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ en un grupo $-\text{CH}=\text{CH}-$ mediante la remoción de dos átomos de hidrógeno. En otras palabras, la reacción general es una deshidrogenación del donador y la enzima responsable se denomina deshidrogenasa. La ecuación general de la reacción es la siguiente:



Hay discrepancia en la manera en la que los equivalentes de reducción son transferidos del donador al aceptor. Existen "tres escuelas de pensamiento" que explican lo anterior. La primera habla de "aceptores de hidrógeno", "donadores de hidrógeno", "acarreadores de hidrógeno", "transporte de hidrógeno", etc.; la segunda de "aceptores, donadores, transporte, de electrones etc."; la tercera, que se ha desarrollado más recientemente, tiende a explicar los procesos en términos de la transferencia de un ión hidruro, lo cual consiste en la transferencia de un átomo de hidrógeno y de un electrón, y el hecho de que puedan ser transferidos simultáneamente no implica que son transferidos como una sola partícula "ion hidruro", o que dicha partícula exista en el sistema.

La gran mayoría de las reacciones redox involucra la transferencia de dos equivalentes de reducción, de una forma o de otra, principalmente debido a que la ruptura de un enlace covalente produce dos extremos y se requieren dos equivalentes para reducirlos, como en el caso del aceptor B en la reacción (1) ($B - BH_2$).

Cuando solo se intercambia un electrón en las reacciones redox, estamos hablando de procesos que a menudo requieren de cofactores tales como flavina, coenzimas quinoides o metales de transición.

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y su análogo 2'-fostato ($NADP^+$) están involucrados en la mayoría de las oxidaciones donde se transfieren dos electrones y que son catalizadas por las deshidrogenasas. El anillo de la nicotinamida puede aceptar un hidruro o dos electrones y un protón para formar los cofactores reducidos $NADH$ o $NADPH$. La transferencia reversible de hidruros desde un sustrato reducido al $NAD(P)$ y la transferencia desde el $NAD(P)H$ a un sustrato oxidado, es estereoselectiva y característica de cada enzima.

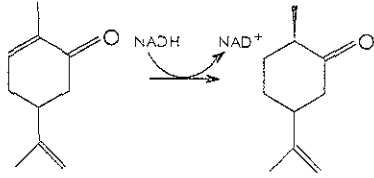
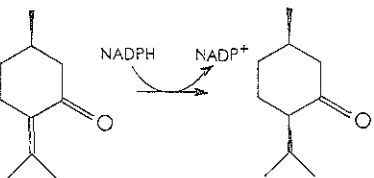
Los cofactores de nicotinamida, usualmente no se encuentran unidos covalentemente a las enzimas y se disocian fácilmente. La desventaja es que son demasiado caros como para utilizarse como reactivos estequiométricos en síntesis a gran escala, por lo que se hace necesario el buscar la forma de reciclar el cofactor si se requiere el uso de enzimas que requieran cofactores de nicotinamida [34].

3.2.2.1.1 Uso de reductasas en la producción de aromas

Tang y Suga, han estudiado la biotransformación de compuestos utilizando células inmobilizadas de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) [35]. En 1992, probaron dichas células sobre los sustratos carvona y pulegona, dos compuestos ampliamente utilizados en perfumería, y a partir de éstas, purificaron dos enzimas reductasas, capaces de actuar sobre los dobles enlaces tanto endocíclicos como exocíclicos, y que nombraron como Reductasa I y Reductasa II, encontrando que tienen las siguientes características: (Tabla 5)

Tabla 5

Características de las reductasas purificadas a partir de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum*

	REDUCTASA I	REDUCTASA II
Reacción que cataliza		
Coenzima requerida	NADH	NADPH
pH óptimo	7.7	6.5
Temperatura óptima	30-35 °C	30-35 °C
No. de subunidades	4 subunidades idénticas de 22 kDa c/u	2 subunidades de 22 kDa c/u y 2 subunidades de 45 kDa c/u

3.2.2.1.2 Uso de oxigenasas en la producción de aromas

Para la producción de aromas, también se han utilizado otras enzimas, entre las cuales se encuentran las metaloenzimas oxidoreductasas como las lipooxigenasas que catalizan la dioxigenación enantio y regioselectiva de ácidos grasos insaturados del tipo del ácido linoléico [36].

Otro método para obtener compuestos con aroma de 13 carbonos consiste en utilizar a la fracción de carotenoides de las plantas como precursores de aromas. En este caso, la ruptura de la cadena de carotenoides, se lleva a cabo mediante reacciones de "co-oxidación", utilizando enzimas como la lipooxigenasa u otros sistemas de oxidasas como la fenoloxidasa, la lactoperoxidasa y la xantina oxidasa. Tratando al β -caroteno con la lipooxigenasa se ha observado que se llega a la formación de compuestos con aroma como la β -ionona, la 5,6-epoxi- β -ionona y la dihidroactindiolina [37].

3.2.2.2 Uso de hidrolasas

Para la producción de aromas y sabores utilizando enzimas, se utiliza principalmente a las hidrolasas, de las cuales, las más utilizadas son las lipasas, que son hidrolasas de serina que catalizan la hidrólisis de lípidos hasta ácidos grasos y glicerol. Estas enzimas se utilizan para llevar a cabo reacciones de lipólisis y de resolución de mezclas racémicas, para obtener alcoholes alifáticos y terpenos ópticamente puros. Otro tipo de hidrolasas frecuentemente utilizadas para la producción de aromas, son las glicosidasas. En muchas frutas y otros tejidos de plantas, los norisoprenoides oxigenados derivados de los carotenoides, al igual que otros metabolitos secundarios, se acumulan como glucósidos no volátiles y no poseen aroma. La ruptura enzimática de los precursores glucósidicos se emplea para obtener aromas libres de gran importancia, por lo que se utilizan en la producción de jugos o vinos con el fin de mejorar su sabor, además de que ofrece una alternativa para obtener aromas a partir de material de desecho de las frutas, como el bagazo y las cáscaras [26].

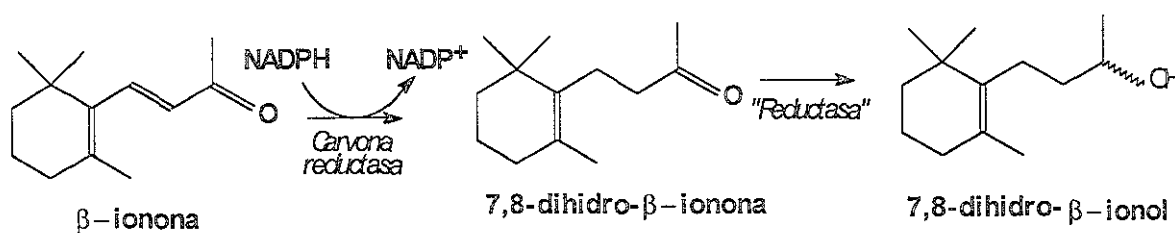
3.2.3 Uso de tejidos y células vegetales

A pesar de que no se han obtenido cantidades importantes de aromas utilizando cultivos de células vegetales, se considera que este sistema puede tener cierto potencial en las reacciones de biotransformación. La mayor ventaja de esta tecnología, es la regio y la estereoespecificidad de las transformaciones que se llevan a cabo sobre los sustratos exógenamente administrados. Sin embargo, existe la desventaja de que la eficiencia de transformación es muy baja y que en algunas ocasiones se presenta la formación de subproductos.

En 1994, Tang y Suga, probaron las células inmovilizadas de *N. tabacum* sobre la β -ionona y sugirieron un mecanismo de dos pasos para su conversión, primero en 7,8-dihidro- β -ionona y posteriormente en 7,8-dihidro- β -ionol [38]. El primer paso involucra a una reductasa anteriormente descubierta por estos investigadores, la cual llamaron *carvona reductasa*, que actúa sobre el doble enlace exocíclico de la β -ionona, antes de que el grupo carbonilo sea reducido enzimáticamente en el segundo paso (Fig. 3).

Figura 3

Biotransformación de la β -ionona en 7,8-dihidro- β -ionona y 7,8-dihidro- β -ionol utilizando células inmovilizadas de *N. tabacum* [26]



4.0 Antecedentes

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo de trabajo, se aislaron dos microorganismos capaces de utilizar a la luteína (β,ϵ -caroten-3,3'-diol) como fuente de carbono y además, de generar un aroma con el perfil característico del tabaco curado al aire. Se llevó a cabo tanto la identificación de los microorganismos responsables de producir el aroma, como de los compuestos que lo poseen de la manera que a continuación se describe:

4.1 Aislamiento y caracterización de los microorganismos

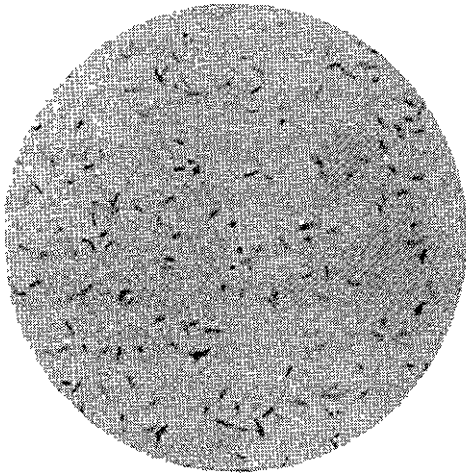
El aislamiento de los microorganismos empleados en el presente trabajo, se realizó a partir de una muestra de lodo residual recolectado durante el proceso de producción de un extracto óleo de flor de cempasúchitl (que contiene hasta un 89% del oxicarotenoide luteína), la cual se agrega como aditivo en el alimento para pollos con el fin de pigmentar tanto piel como la yema de sus huevos.

A partir de esta muestra, se aislaron 19 colonias por su capacidad de degradar a la harina de flor de cempasúchitl. De estas colonias, dos de ellas resultaron de interés por su capacidad de producir compuestos volátiles, en especial una de ellas, que al crecer en la harina de cempasúchitl como fuente de carbono, era capaz de degradarla y además generar un aroma a tabaco.

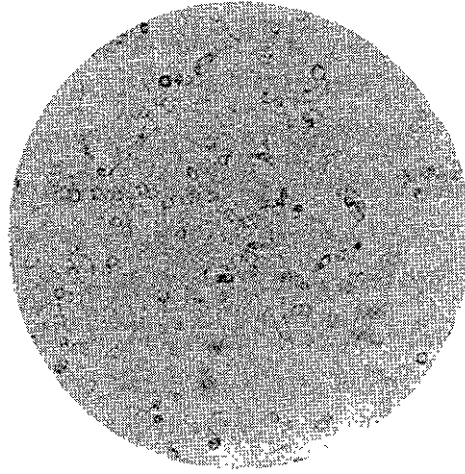
Al analizar a la colonia productora del aroma, se encontró que estaba formada por dos microorganismos, que resultaron ser una bacteria y una levadura. La colonia seleccionada se identificó mediante pruebas bioquímicas de acuerdo a Dolan y Roberts [39]. A partir de estas pruebas, se logró llegar a la conclusión de que se trataba de un cultivo mixto de *Bacillus* sp. y de *Geotrichum* sp. (Fig. 4). La proporción de cada uno de ellos resultó ser de 3×10^8 y 1×10^6 UFC/ mL de *Geotrichum* sp. y *Bacillus* sp. respectivamente.

Estos microorganismos fueron probados por separado, con el propósito de conocer si en esta condición eran capaces de crecer en luteína y producir el aroma, o si forzosamente se requería de la participación de ambos en dicho proceso. Se encontró que, si bien ambos microorganismos por separado eran capaces de crecer en un medio suplementado con luteína como única fuente de carbono, solamente la mezcla resultó capaz de producir el aroma a tabaco [40].

Figura 4
Microorganismos identificados en la colonia productora del aroma de tabaco



Bacillus sp. BM-B-340



Geotrichum sp. BM-H-105

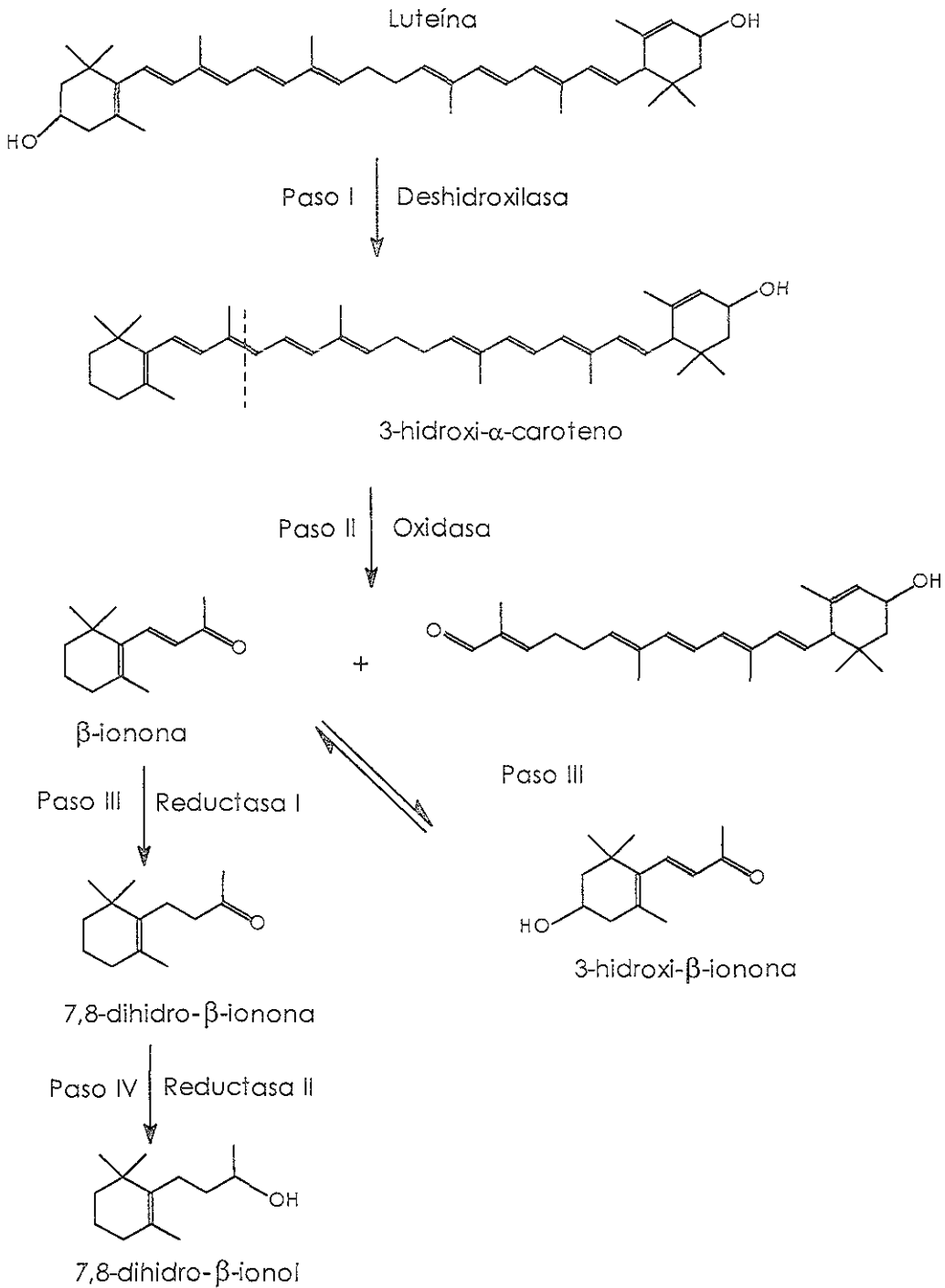
4.2 Identificación de los compuestos con aroma

Los compuestos con aroma fueron aislados a partir del medio de cultivo de una fermentación realizada con la mezcla de microorganismos, recuperándose a diferentes tiempos de fermentación por medio de una corriente de nitrógeno. Una vez condensados, estos compuestos se analizaron mediante *cromatografía de gases* acoplada a espectroscopía de masas. De las muestras tomadas a 96 h de fermentación, se identificaron cuatro componentes principales, 7,8-dihidro- β -ionol, β -ionona, 7,8-dihidro- β -ionona y 3-hidroxi- β -ionona. La proporción de cada uno de ellos, se encontró que fue de 84.2, 9.4, 3.5 y 2.9% respectivamente. Al tiempo de 36 h de fermentación, el único compuesto que se identificó resultó ser la β -ionona, lo cual sugiere que ésta puede ser precursora de los otros tres compuestos [40].

A partir de estos y otros resultados, se llegó a proponer la siguiente ruta para explicar como es que ocurre la transformación de luteína en compuestos con aroma (Fig. 5).

Figura 5

Ruta propuesta para la formación de los norisoprenoides derivados de la luteína [40]



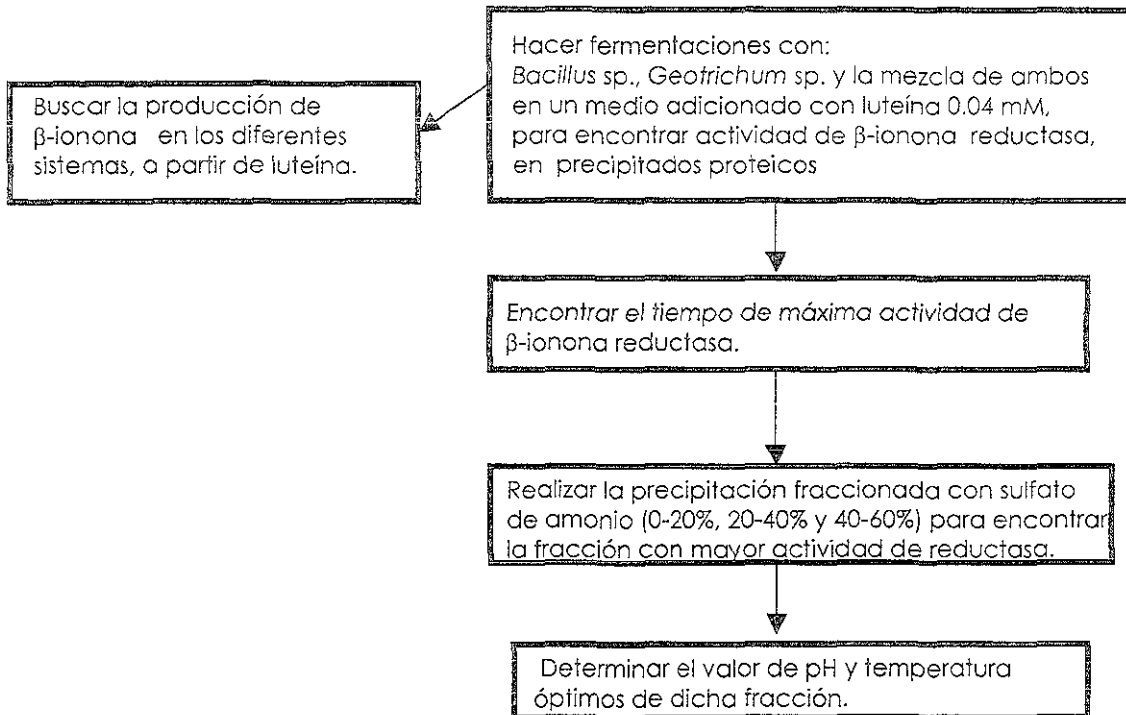
5.0 *Objetivos*

- ❖ Identificar la fracción proteica en cultivos de *Bacillus* sp., *Geotrichum* sp. y la mezcla de ambos, que presente mayor actividad de β -ionona reductasa y encontrar su temperatura y valor de pH óptimos.
- ❖ Obtener más evidencias que permitan confirmar la ruta de transformación sugerida, de tal forma que se puedan proponer estrategias para encontrar el papel que juega cada uno de los microorganismos empleados en la misma.

6.0 *Hipótesis*

En función de la obtención de β -ionona, 7,8-dihidro- β -ionol y 7,8-dihidro- β -ionona, a partir de la degradación de luteína, suponemos la presencia de reductasas que actúan sobre la β -ionona para formar derivados reducidos cuya mezcla posee un perfil de aroma a tabaco. La caracterización de este sistema enzimático, así como el conocimiento de la participación de cada microorganismo en la ruta de transformación ayudará a optimizar el sistema.

7.0 Estrategia general



8.0 *Materiales y métodos*

8.1 Cepas microbianas de trabajo

Los microorganismos empleados en el presente trabajo fueron identificados como *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. Ambos son conservados en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México, D.F., registrada en el World Data Center on Microorganisms (WDC) como UNAM-48, con los códigos BM-B-340 y BM-H-105 respectivamente.

8.2 Preservación de las cepas

Se utilizaron placas de medio YTN sólido (Anexo 1). Por separado, se sembró por extensión en las placas a cada uno de los microorganismos. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 29 °C durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, las cajas se rasparon utilizando un asa bacteriológica, traspasando los microorganismos a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca, conteniendo 5 mL de medio YTN con glicerol al 40%. Luego de homogeneizar perfectamente el medio, se distribuyó el medio, en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5-mL, conteniendo cada uno 1 mL del medio con microorganismo. Dicho medio se almacenó a una temperatura de -20 °C.

8.3 Preinóculos e inóculos

Se cultivó a *Bacillus* sp. y a *Geotrichum* sp. por separado. Del medio de conservación de cada microorganismo, se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembró por extensión en placas de medio YTN sólido, incubándolas a 29 °C durante 48 h.

Para la preparación de los preinóculos, se preparó una suspensión basal. Utilizando un asa bacteriológica, se raspó al microorganismo de las placas, se

resuspendió en 5 mL de solución salina 0.85% (p/v) estéril, hasta obtener una densidad óptica de 0.3 a una longitud de onda de 540 nm.

Para preparar los inóculos, se sembró 1 mL de la suspensión basal en matraces Erlenmeyer de 250-mL con deflectores inferiores, que contenían 25 mL de medio YTN líquido. Los cultivos fueron incubados a 29 °C en un agitador rotatorio (180 rpm) durante 24 h.

8.4 Métodos analíticos

Las fermentaciones líquidas se llevaron a cabo en botellas de vidrio con capacidad de 500 mL, que contenían 300 mL de medio YTN adicionado con glucosa (0.02%) y extracto óleo de flor de cempasúchitl (eofc), obtenido de Industrial Orgánica, en Monterrey, N.L., México, o β -ionona (Sigma, ~95% de pureza), como fuentes de carbono. La harina de flor de cempasúchitl fue añadida al medio de cultivo justo antes de ser inoculado el medio, a una concentración de 22.4 mg/L a partir de una solución stock (22.4 mg/mL) preparada en etanol al 70% y esterilizada por filtración (utilizando membranas Millipore de 0.45 μ m). Cuando se utilizó la β -ionona como fuente de carbono, se añadió al medio de cultivo antes de ser inoculado, a una concentración de 0.08 μ g/mL, tomando una alícuota del envase original, esterilizándola por filtración, a través de membranas Millipore de 0.45 μ m. El medio se sembró con 15 mL del inóculo de *Bacillus* sp. y 0.15 mL del inóculo de *Geotrichum* sp. Cuando se hicieron experimentos con los microorganismos por separado, las botellas fueron sembradas con 15 mL del inóculo del microorganismo en cuestión. Los cultivos fueron incubados a 29 °C con agitación rotatoria (60 rpm). De estos cultivos se tomaron 3 mL cada 12 h con el fin de determinar crecimiento, consumo de luteína y producción de aromas, cuando se hicieron cinéticas de crecimiento y producción, o bien, se retiró la botella entera cada determinado tiempo, cuando se trató de obtener proteína extracelular.

8.4.1 Determinación de luteína residual, producción de β -ionona y de aromas

Para llevar a cabo las determinaciones de producción de aromas, β -ionona y luteína residual, se tomaron 2 mL de muestra de los cultivos de cada uno de los microorganismos o de la mezcla de ambos cada 12 h, centrifugando a 7000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y tanto la luteína como los aromas, fueron extraídos agitando el medio con 1 mL de acetona pura durante 1 minuto. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción, añadiendo 2 mL de una mezcla de dietil éter: éter de petróleo (1:1) seca y agitando durante 10 segundos. La fase orgánica fue separada por centrifugación durante 4 min a 7000 rpm y el solvente se eliminó con la ayuda de una corriente suave de nitrógeno.

Las muestras fueron disueltas en 50 μ L de CH_2Cl_2 , y se aplicaron 15-20 μ L en placas para cromatografía TLC-ALUGRAM-SILG-UV254 de 0.54 mm de espesor. Las placas fueron eluidas por separado, la primera en una mezcla de elución consistente en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (80/20) para determinar la cantidad de luteína residual y la segunda en una mezcla de hexano/ $\text{AcOEt}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (90/5/5) para determinar la producción tanto de β -ionona como de compuestos con aroma.

Los cromatogramas fueron analizados mediante densitometría, utilizando para ello un densitómetro CAMAG II a longitudes de onda de 270 nm para determinar compuestos con aroma y de 450 nm para determinar luteína residual. Como estándares se utilizaron una solución de harina de flor de cempasúchitl en cloruro de metileno (10 mg/mL), β -ionona (Sigma, ~95% pureza) y la mezcla de productos con aroma, la cual fue purificada mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 Merck, y eluida en una mezcla de hexano/ AcOEt (80/20).

8.4.2 Determinación de crecimiento

Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 7000 rpm, para separar el sobrenadante de las células. El paquete celular obtenido, fue resuspendido en 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y guardado en congelación durante al menos 12 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se descongelaron y posteriormente se

centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min. Al precipitado obtenido, se le adicionó 1 mL de NaOH 0.4 N, se sometió a agitación vigorosa y posteriormente se incubó a 37 °C durante 1 h. De cada tubo se tomaron alícuotas de 100 µL a las cuales se les determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Lowry, *et al*, [41], utilizando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de 0, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/mL. La determinación se hizo por triplicado, leyendo las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

8.4.3 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa

8.4.3.1 Obtención del precipitado proteico

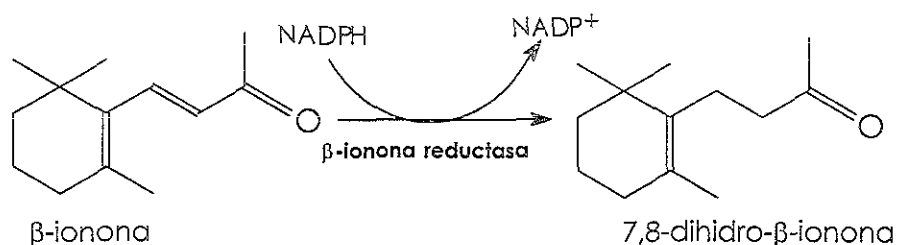
Se realizó un cultivo con la mezcla microbiana, de la manera antes descrita, pero esta vez no se tomaron muestras. El medio de cultivo fue retirado de la incubación luego de 48 h. Se eliminaron entonces las células del medio de cultivo mediante centrifugación en botellas con capacidad de 250-mL a 10,000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Este medio se precipitó con sulfato de amonio a una temperatura de 4 °C, hasta un 60% de saturación, adicionando de manera lenta la sal para obtener un mejor rendimiento en la precipitación. Una vez transcurrido el tiempo de precipitación, las proteínas se recuperaron centrifugando el medio de cultivo durante 10 min a 10,000 rpm a una temperatura de 4 °C. La muestra de proteína, se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos, 50 mM, pH = 7 y se sometió a diálisis para eliminar el sulfato de amonio, contra amortiguador de fosfatos 50 mM, pH = 7, empleando 1 L de amortiguador por cada mL de muestra dializada. La diálisis se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C, con agitación constante, durante al menos 6 horas, cambiando el amortiguador cada 2 horas. Transcurrido el tiempo de diálisis, la muestra de proteína, se concentró en membranas de ultrafiltración, centrifugando la muestra durante 3.5 min, a 2500 rpm, a una temperatura de 4 °C. La muestra ya concentrada, se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos, 50 mM, pH = 7 y glicerol al 40%, estéril y se guardó en alícuotas de 200 µL en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5-mL a -20 °C. Cabe mencionar que el glicerol se utilizó como estabilizante de la proteína.

8.4.3.2 Determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa

La determinación se llevó a cabo en el espectrofotómetro, a una longitud de 340 nm, en la región UV del espectro, midiendo la velocidad de desaparición del NADPH, mediante una reducción en la absorbancia de la solución. La reacción en estudio, es la siguiente (Fig. 6):

Figura 6

Reacción que se lleva a cabo para la determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa



Para ajustar a cero el equipo, se utilizó 1 mL agua bidestilada. La determinación se hizo colocando en la celda de cuarzo las siguientes cantidades de reactivos:

Tabla 6

Reactivos empleados en la determinación espectrofotométrica de la actividad de la β -ionona reductasa

REACTIVO	REACCIÓN	CONTROL A	CONTROL B
Amortiguador fosfatos, 50 mM, pH = 6.6	780 μ L	800 μ L	880 μ L
NADPH 0.38 mM	100 μ L	100 μ L	100 μ L
β -ionona 0.04 mM	100 μ L	100 μ L	-----
Muestra de proteína	20 μ L	-----	20 μ L

El control A, se hizo para verificar que ninguno de los otros reactivos, salvo la muestra de proteína que contiene a la β -ionona reductasa, oxide al NADPH, mientras que el control B, se hizo para verificar la especificidad de la enzima por la β -ionona.

A partir del instante en que se agregó la muestra de proteína a la celda, se comenzó a contar el tiempo de reacción, midiéndose la absorbancia a 340 nm, cada minuto, durante 5 min. Cabe mencionar que cada ensayo se realizó por triplicado.

Para determinar la actividad enzimática, se emplearon las fórmulas reportadas en el Anexo 2.

8.5 Aislamiento de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa

Se utilizó un cultivo de la mezcla microbiana, centrifugada a las 48 h de incubación, para eliminar células en botellas con capacidad de 250-mL, a 10,000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. Una vez obtenido el medio libre de células, éste se precipitó hasta un 20 % de saturación con sulfato de amonio. La precipitación se hizo mediante adición lenta de la sal a una temperatura de 4 °C. Las proteínas que precipitaron, se recuperaron por centrifugación del medio de cultivo 10 minutos a 10,000 rpm, siendo la temperatura de 4 °C. Para eliminar el sulfato de amonio, la muestra de proteína se sometió a diálisis, de la misma manera que cuando la precipitación se hizo del 0-60% de saturación. El medio de cultivo ya libre de esta fracción, se volvió a saturar con sulfato de amonio, esta vez hasta el 40%, para obtener una nueva fracción proteica. Estas proteínas, también se recuperaron por centrifugación y se sometieron a diálisis de la manera antes descrita. Entonces, el medio de cultivo, se sometió a una nueva precipitación, esta vez hasta el 60% de saturación, para obtener la tercera fracción de proteínas, las cuales, fueron tratadas de igual forma que las anteriormente mencionadas.

La cantidad empleada de sulfato de amonio en cada precipitación se determinó a partir de los valores de la tabla del Anexo 3.

Se determinó la actividad de β -ionona reductasa de cada una de las fracciones obtenidas, mediante el método espectrofotométrico.

8.6 Determinación del pH óptimo de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa

Se realizó la determinación espectrofotométrica de actividad de la β -ionona reductasa con la fracción que presentó mayor actividad y variando el pH. Se decidió probar un intervalo de valores de pH, desde 3 hasta 9, utilizando los siguientes amortiguadores, siempre en concentración 0.05 M (Tabla 7).

Los amortiguadores se prepararon de acuerdo a lo indicado en el Anexo 4.

Tabla 7
Amortiguadores empleados en la determinación del pH óptimo de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa

AMORTIGUADOR	pH
Citratos	3, 4 y 5
Fosfatos	6 y 7
Tris-Cl	7 y 8
Boratos	8 y 9

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando el método espectrofotométrico, sustituyendo el amortiguador fosfatos pH = 6.6 por cada uno de los amortiguadores antes mencionados.

8.7 Determinación de la temperatura óptima de la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa

Una vez que se encontró el pH óptimo, se procedió a buscar la temperatura óptima de la reacción, para lo cual, la determinación espectrofotométrica, se realizó en un espectrofotómetro a temperatura constante, probando un intervalo de temperaturas, desde los 20 hasta los 50 °C.

9.0 Resultados y discusión

9.1 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa en *Bacillus* sp., *Geotrichum* sp. y la mezcla de ambos utilizando un medio de cultivo adicionado con eofc como fuente de carbono

Se realizó una fermentación empleando medio YTN adicionado con eofc para tener una concentración de luteína 0.04 mM como fuente de carbono, donde se probaron 4 sistemas diferentes: (1) *Bacillus* sp.; (2) *Geotrichum* sp.; (3) Mezcla *Geotrichum* sp.: *Bacillus* sp. (1:100); (4) Mezcla microbiana en medio YTN sin luteína. Luego de 48 h de incubación, se hizo la precipitación del medio de cultivo libre de células con sulfato de amonio, hasta un 60% de saturación. El tiempo de fermentación y el porcentaje de saturación, se eligieron con base en experimentos realizados anteriormente en el laboratorio, ya que en estas condiciones fue donde se encontró actividad de la β -ionona reductasa. Luego de someter a diálisis a las muestras de proteína, se procedió a determinar su actividad utilizando un método espectrofotométrico, con NADH 0.38 mM como cofactor, a temperatura ambiente y un valor de pH de 6.6.

Solamente se encontró actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla de microorganismos (Fig. 7), pero no en cada uno de ellos por separado, cuando se crecen en medio YTN adicionado con harina de flor de cempasúchitl como fuente de carbono. Lo anterior, puede sugerirnos que los microorganismos actúan en conjunto para poder degradar exitosamente a la luteína hasta los compuestos con aroma. Además, se hizo un control de la mezcla microbiana en medio YTN sin luteína y tampoco se encontró actividad en dicho sistema. Esto nos puede indicar que la actividad de la β -ionona reductasa no es constitutiva.

Actividad específica de β -ionona reductasa en los diferentes sistemas

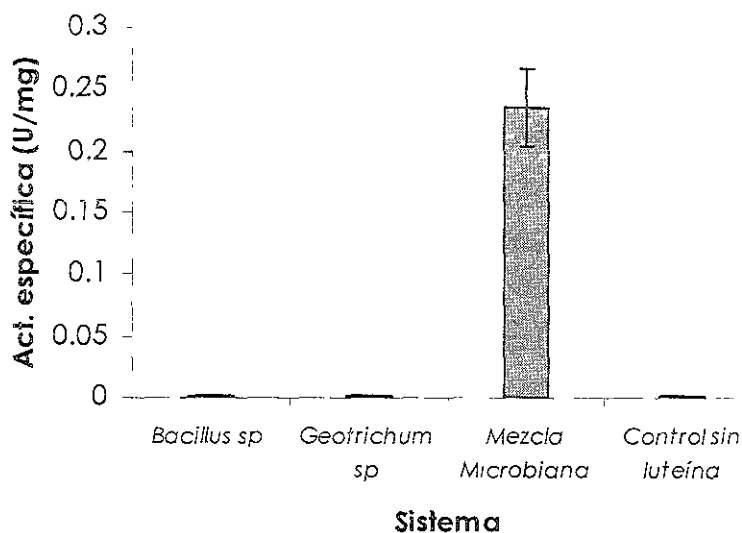


Figura 7

Actividad de la β -ionona reductasa detectada en la mezcla microbiana y en cada uno de los microorganismos que la componen

9.1.1 Cinéticas de crecimiento, consumo de luteína y producción de β -ionona y compuestos con aroma a tabaco en *Bacillus* sp., *Geotrichum* sp. y la mezcla de ambos utilizando un medio de cultivo adicionado con eofc como fuente de carbono

Al mismo tiempo que se hizo la fermentación para buscar actividad de reductasa, se llevó a cabo otra fermentación en cada una de las condiciones con el fin de conocer como se da tanto el crecimiento, el consumo de luteína como la producción, de β -ionona y de compuestos con aroma, para relacionarlos con la actividad de la β -ionona reductasa. Como control, se utilizó medio YTN adicionado con eofc, sin microorganismos, esto debido a que los carotenoides son moléculas muy sensibles a la luz, el calor, el oxígeno y los cambios de pH y se quiso comprobar que la degradación de la luteína y la producción de la β -ionona se debía a la acción de los microorganismos sobre la luteína y no a otros factores que afectarían a dicha molécula, como los anteriormente mencionados. Se hicieron determinaciones de las variaciones en composición desde cero hasta 84 h, tomando muestras cada 12 h, y

desde las 36 h hasta las 48 h, cada 3 h para establecer lo que ocurre justo antes de que se precipite la proteína a las 48 horas.

Podemos observar que todos los microorganismos fueron capaces de crecer en el medio con luteína como fuente de carbono (Fig. 8). Esto indica que cada uno de ellos, tiene la maquinaria enzimática necesaria para degradar al oxicarotenoide y utilizarlo como fuente de carbono para crecer. Debido a que el medio de cultivo es complejo, se podría pensar que tal vez el crecimiento proviene de la utilización de otros componentes como fuente de carbono, sin embargo, en la figura 9 se muestra el consumo de luteína, y se puede observar, que tanto la mezcla, como los microorganismos por separado, fueron capaces de degradarla, aunque, la mezcla lo hace un poco más rápido, y a las 84 h, prácticamente se ha agotado la luteína presente en el medio de cultivo.

Se asegura que los microorganismos son los responsables de la degradación de la luteína adicionada al medio, debido a que la degradación de la misma en las condiciones de cultivo utilizadas, no es significativa. Pero, esto no quiere decir que todas las condiciones microbianas probadas, tengan la capacidad de transformar a la luteína en compuestos con aroma a tabaco. Sabemos, que todos los dobles enlaces de los carotenoides son susceptibles al ataque enzimático, sin embargo, la ruptura en el doble enlace de la posición 9,10 (9',10'), es la única que produce los compuestos norisoprenoides de 13 carbonos [26]. En la figura 10 se observa la producción de β -ionona, a partir de luteína, y tanto la mezcla como *Geotrichum* sp. fueron capaces de la conversión. En el control sin microorganismos, no se detectó la presencia de la β -ionona, por lo que aseguramos que la que se determina no es producto de la degradación que sufre la luteína debido a las condiciones de cultivo. La β -ionona es un producto primario de degradación de la luteína, cuando ésta se rompe en el enlace 9,10. Podemos pensar entonces, que *Geotrichum* sp. si tiene las enzimas necesarias para oxidar a la luteína en dicha posición y producir así al intermediario β -ionona (Fig. 11), pero que, como no es capaz de transformar dicho compuesto en el aroma de tabaco, no posee las enzimas que se utilizan en la reducción de la β -ionona. En cuanto a *Bacillus* sp, a pesar de que observamos que fue capaz de crecer en el medio que contiene luteína, no la degradó en la posición 9,10, sino en cualquiera otra y probablemente el producto que resulta de tal ruptura

sea utilizado como fuente de carbono. Si se parte de luteína como fuente de carbono principal, únicamente la mezcla de microorganismos es capaz de transformarla en compuestos con aroma, y se puede observar que la máxima producción de los mismos, se presentó en la fase estacionaria del crecimiento de ambos microorganismos (Fig. 12). Además, únicamente en la mezcla microbiana se detectó la actividad de la β -ionona reductasa, partiendo de un medio de cultivo cuya principal fuente de carbono era la luteína. Esto de nuevo nos indica que partiendo de esta condición, la mezcla microbiana es necesaria para obtener el aroma, lo cual sugiere que existe una cooperación entre estos dos microorganismos.

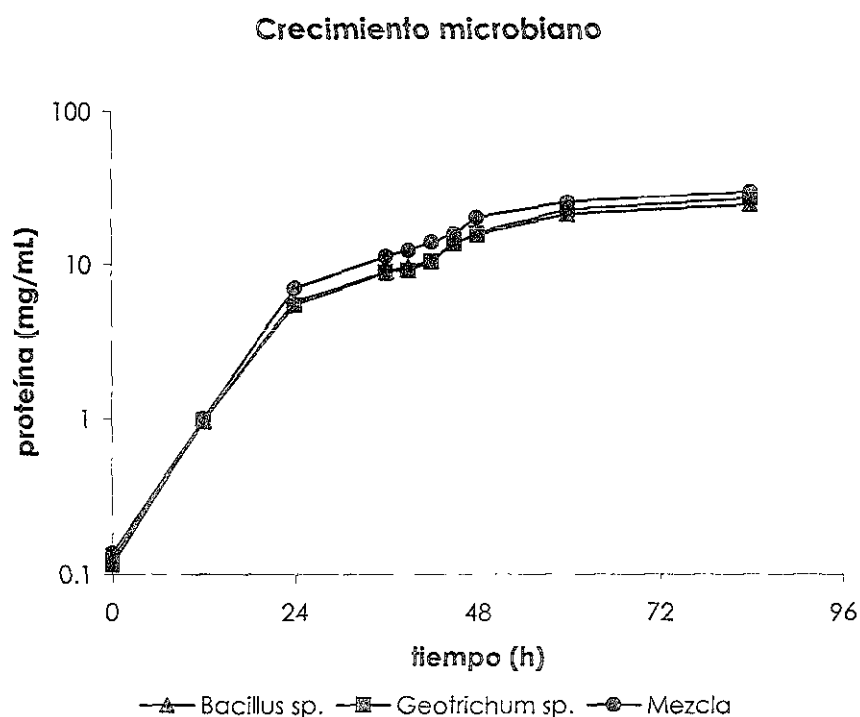


Figura 8
 Curva de crecimiento, de la mezcla microbiana y de cada uno de los microorganismos por separado, en un medio que contiene eofc como la principal fuente de carbono

Luteína residual en el medio de cultivo

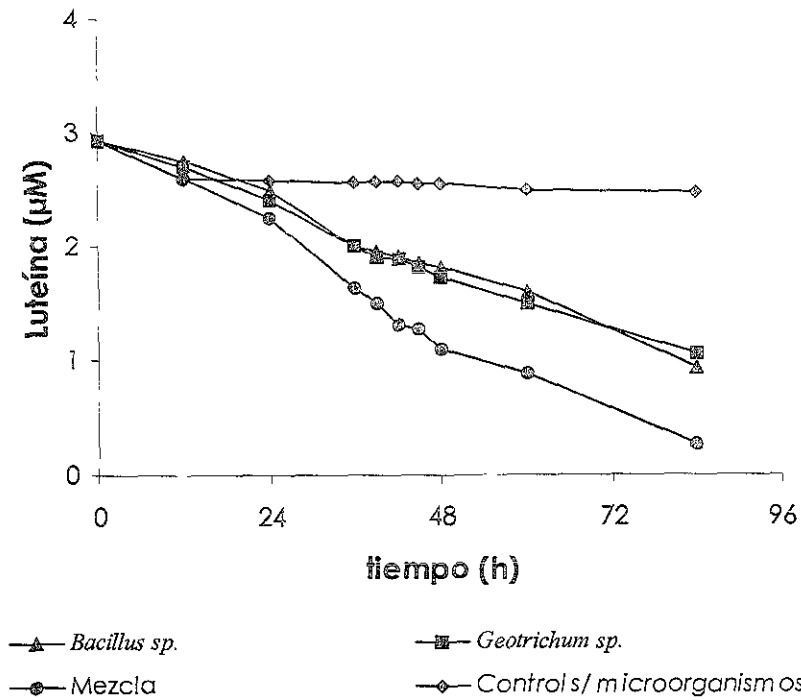


Figura 9
Consumo de luteína durante la fermentación, por la mezcla microbiana y los microorganismos por separado

Producción volumétrica de β -ionona

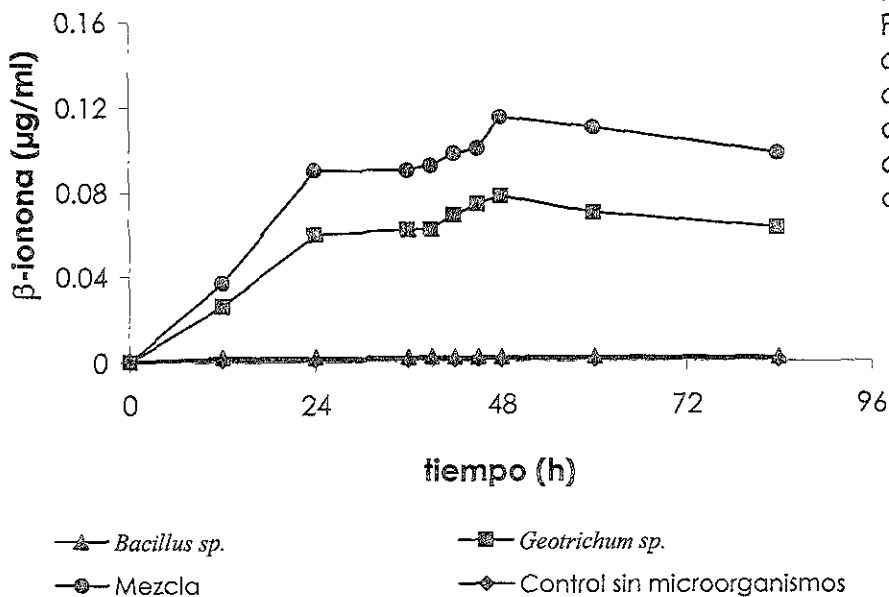


Figura 10
Producción volumétrica de β -ionona en los diferentes sistemas, a partir de un medio adicionado con eofc como fuente de carbono

Producción específica de β -ionona

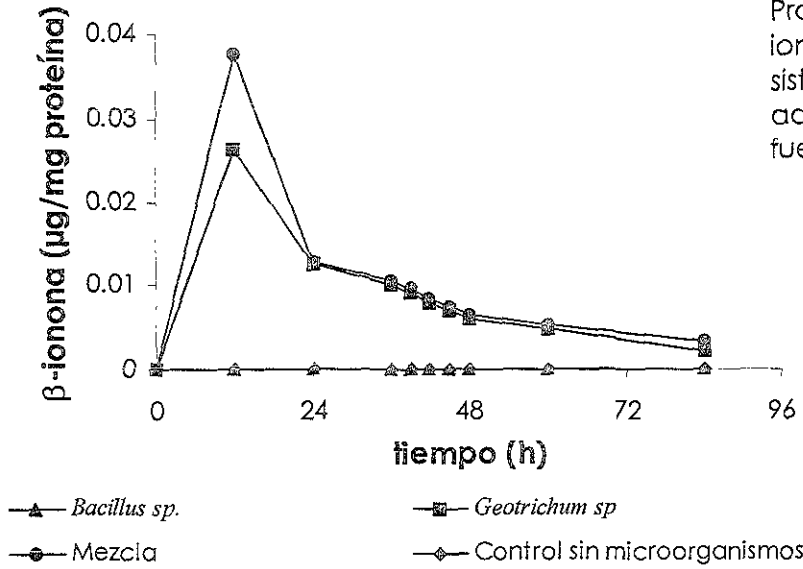


Figura 11

Producción específica de β -ionona en los diferentes sistemas a partir de un medio adicionado con eofc como fuente de carbono

Producción específica de aroma

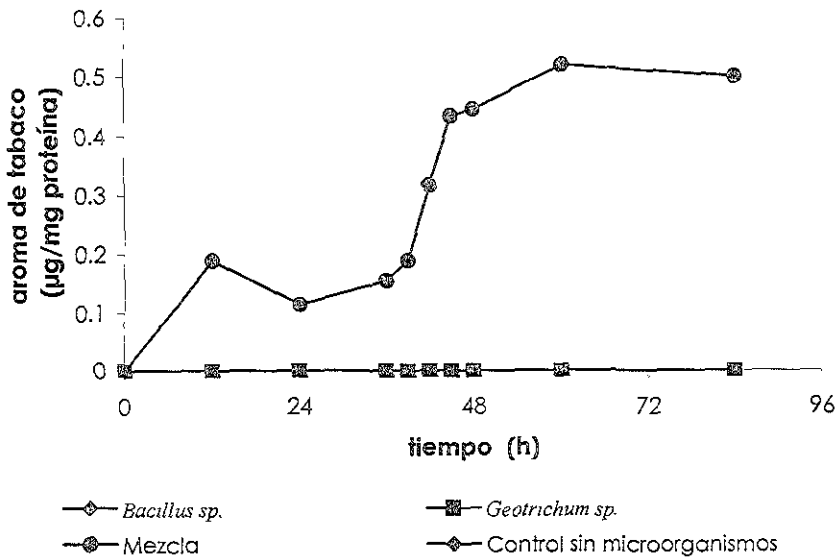


Figura 12

Producción de aroma de tabaco en los diferentes sistemas, a partir de un medio adicionado con eofc como fuente de carbono

9.2 Coenzima requerida por la β -ionona reductasa

Como solamente se detectó actividad de β -ionona reductasa en la mezcla microbiana partiendo de luteína como principal fuente de carbono, se decidió seguir trabajando solo con la mezcla microbiana, para conocer más sobre las características bioquímicas de la reductasa involucrada.

Sabemos que la enzima que estamos buscando es una reductasa, y que todas estas enzimas, necesitan de un cofactor. Se decidió probar con cual cofactor (NADH o NADPH), se obtenía una mayor actividad de β -ionona reductasa. Para lo anterior, se hizo una fermentación con la mezcla microbiana, utilizando harina de flor de cempasúchitl como principal fuente de carbono. A las 48 h de incubación, se retiraron las botellas, y el medio de cultivo libre de células, se precipitó con sulfato de amonio, hasta el 60% de saturación. A la proteína ya desalada, se le determinó su actividad de β -ionona reductasa, utilizando el método espectrofotométrico, solo que utilizando en una determinación NADH 0.38 mM y en la otra NADPH 0.38 mM. La determinación se llevó a cabo a un pH de 6.6 y a temperatura ambiente.

Como se puede observar, la actividad de β -ionona reductasa fue aproximadamente 15 veces mayor cuando se utiliza NADPH como coenzima que cuando se utiliza NADH (Fig. 13), lo que nos sugiere que esta enzima emplea el NADPH como cofactor.

A pesar de su estrecha semejanza química, el NADPH y el NADH no son intercambiables metabólicamente. Mientras que el NADH participa en la utilización de la energía libre de la oxidación de los metabolitos para sintetizar ATP, el NADPH se halla relacionado con el empleo de la energía libre de la oxidación metabólica para la biosíntesis reductora, que de otra manera sería endergónica [42].

Actividad específica de β -ionona reductasa

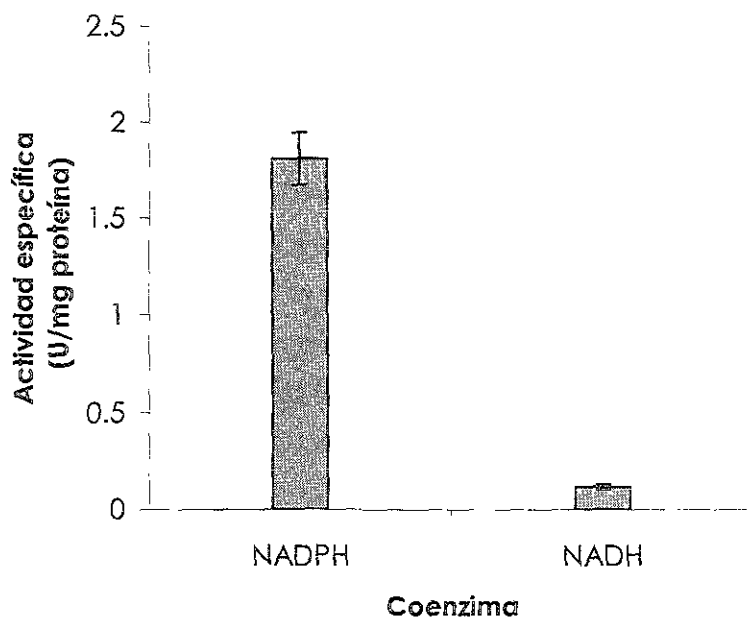


Figura 13

Actividad específica de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 60%, utilizando diferentes coenzimas

9.3 Determinación del tiempo óptimo de producción de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana

Para determinar el tiempo óptimo de producción de la β -ionona reductasa en la mezcla, se hizo una fermentación con la mezcla microbiana, empleando luteína como fuente de carbono. Se probaron los siguientes tiempos 24, 36, 39, 42, 45, 48 y 60 horas, utilizando 3 botellas de 500-mL para cada tiempo, mismas que se retiraron de la incubación al tiempo antes mencionado y se procedió a precipitar el medio de cultivo con sulfato de amonio, hasta el 60% de saturación. A las proteínas obtenidas en cada tiempo, se les determinó su actividad enzimática, por el método espectrofotométrico. Esta determinación se hizo a temperatura ambiente y a un pH = 6.6, utilizando NADPH 0.38 mM como coenzima.

En esta determinación, se utilizó como sustrato de la reductasa, una β -ionona que había sido recién comprada, debido a que la β -ionona con la que se había venido trabajando, ya tenía bastante tiempo y se encontraba muy degradada, sin embargo, para poder comparar con las anteriores determinaciones, se hizo un control con esta β -ionona vieja a 48 h y podemos ver que la actividad ha disminuido considerablemente. Para fines de comparar resultados, en adelante nos referiremos a lo obtenido en este experimento.

En este caso, el tiempo óptimo al cual la actividad de la enzima β -ionona reductasa fue mayor, se encontró a las 42 horas de incubación (Fig. 14), para luego caer paulatinamente, hasta ser muy baja a las 60 horas. Este resultado, coincide con la cinética de producción específica de β -ionona (Fig. 10), ya que cuando la actividad enzimática es mayor, la cantidad de este metabolito es poca, lo cual puede indicar que mientras más actividad enzimática se tenga, más rápido se transforma la β -ionona.

Además, podemos observar que a pesar de que la actividad enzimática comenzó a caer una vez pasadas las 42 h, la producción específica del aroma continuó aumentando (Fig. 15).

Tiempo óptimo de actividad específica de β -ionona reductasa en la mezcla microbiana

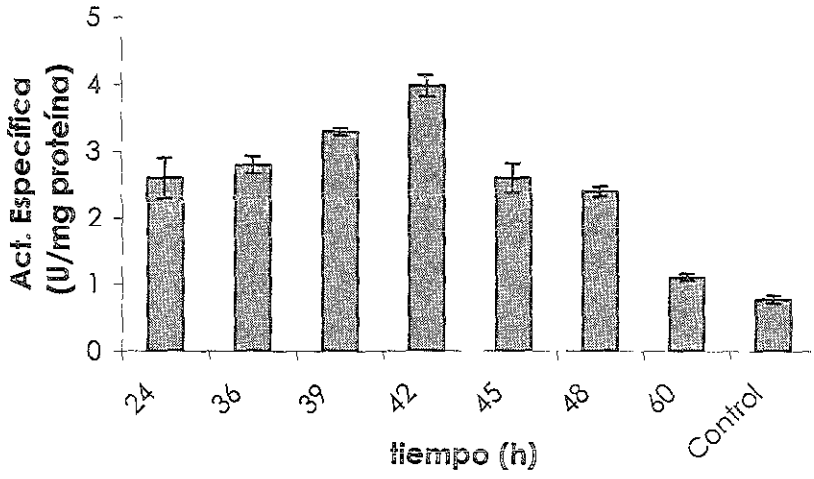


Figura 14
Determinación del tiempo óptimo de actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana, fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 60% de saturación

Actividad específica de la β -ionona reductasa y producción específica de aroma por la mezcla microbiana

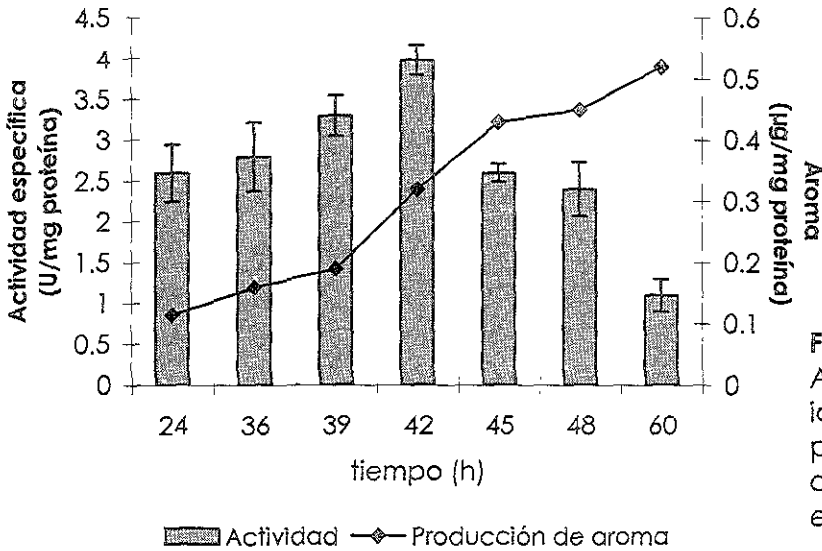
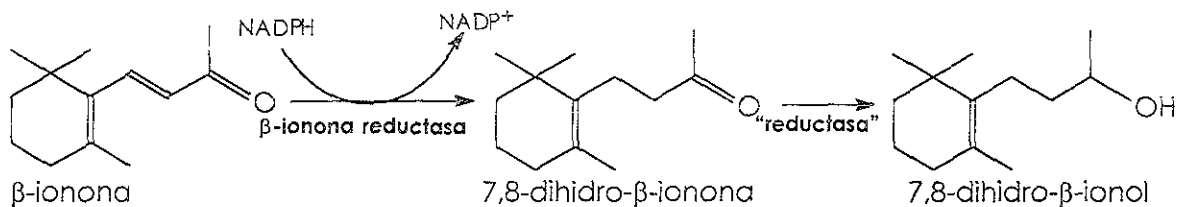


Figura 15
Actividad específica de la β -ionona reductasa y producción específica de aroma en las diferentes etapas de la fermentación

Este hecho nos hace pensar en la existencia de una segunda enzima, encargada de reducir el grupo carbonilo en el alcohol correspondiente. Podemos pensar entonces, que al haberse transformado la β -ionona en 7,8-dihidro- β -ionona, la β -ionona reductasa ya no tiene sustrato sobre el que actuar y por eso su actividad comienza a caer, y así, podemos suponer que existe otra enzima que transforma la 7,8-dihidro- β -ionona, en 7,8-dihidro- β -ionol (Fig.16), que es un importante componente del aroma de tabaco.

Figura 16

Reacciones propuestas para la transformación de la β -ionona en 7,8-dihidro- β -ionol



9.4 Determinación de la fracción con mayor actividad de la β -ionona reductasa en la mezcla microbiana

Se llevó a cabo una precipitación fraccionada del medio de cultivo, para establecer la fracción donde la actividad fuera mayor. Para esto, se hizo una fermentación con la mezcla microbiana, en medio YTN, adicionado con harina de flor de cempasúchitl. Luego de 42 h de incubación, se procedió a precipitar el medio de cultivo, en tres fracciones, 0-20%, 20-40%, 40-60%. Luego de eliminar el sulfato de amonio, se procedió a determinar la actividad de las fracciones. La determinación se hizo a temperatura ambiente, pH de 6.6, utilizando NADPH 0.38 mM como coenzima.

Como se observa en la figura 17, la fracción que precipitó entre 0-20% de saturación con sulfato de amonio, es la que presentó mayor actividad. Aproximadamente se tienen 7 veces más actividad en esta fracción que en la que está presente en la fracción que precipita entre 20-40% de saturación y,

aproximadamente 49 veces más actividad que la encontrada para la fracción que precipita entre 40 y 60% de saturación con el sulfato de amonio. Este resultado indica que la actividad enzimática que nos interesa, esto es, la β -ionona reductasa, está presente en fracciones de proteínas muy hidrofóbicas. Sabemos que la solubilidad de una proteína en disolución acuosa es una función sensible a las concentraciones de las sales disueltas [42]. En la precipitación por salado, se lleva a cabo una deshidratación del microambiente de la molécula de proteína. Cuando las proteínas están en solución, las moléculas de agua forman una capa sobre las regiones hidrofóbicas de la proteína. El agua está ordenada en esa capa de manera que maximiza la formación de puentes de hidrógeno, sin embargo, este ordenamiento resulta energéticamente desfavorable. A altas concentraciones de sal, el agua es transferida desde las regiones hidrofóbicas para asociarse con los iones de la sal [45]. De aquí, concluimos que mientras más hidrofóbica sea la proteína, precipitará con menor cantidad de sulfato de amonio. Esto nos hace pensar que en la estructura primaria de la β -ionona reductasa, predominan los aminoácidos no polares.

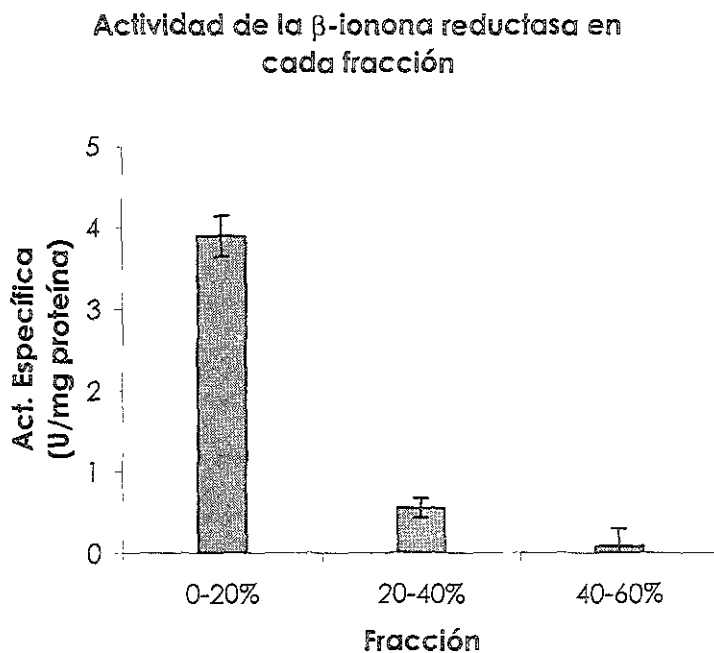


Figura 17
Actividad específica de la β -ionona reductasa, en las diferentes fracciones precipitadas del medio de cultivo, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

9.5 Determinación del pH óptimo de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita al 20% de saturación con sulfato de amonio

Se buscó el pH al cual la actividad de la β -ionona reductasa fuera mejor. Se hizo una fermentación con la mezcla microbiana, utilizando harina de flor de cempasúchitl como fuente de carbono. Luego de 42 h de incubación, se procedió a precipitar al medio de cultivo con sulfato de amonio, hasta un 20% de saturación. En un principio, se probó un intervalo de pH desde 4 hasta 9. Como el resultado obtenido, mostró que el pH óptimo estaba comprendido entre 4 y 5, se decidió probar este intervalo (Fig. 18). A un 4 pH se encontró la máxima actividad, por lo que se decidió probar valores de pH por debajo de 4, y se determinó la actividad en un intervalo de pH entre 3 y 4 y como se observa en la figura 18, el pH de 4 resultó óptimo.

Las enzimas, como todas las proteínas, poseen propiedades que son muy sensibles al pH. El pH afecta a varios factores: (1) la fijación del sustrato a la enzima, (2) la actividad catalítica de la enzima, (3) la ionización del sustrato y (4) la variación de la estructura de la proteína. Las velocidades iniciales de muchas reacciones enzimáticas en función del pH, muestran curvas en forma de campana, como en este caso la que se obtiene para la β -ionona reductasa. Estas curvas reflejan la ionización de ciertos aminoácidos que han de encontrarse en un estado de ionización determinado a fin de que pueda darse la actividad enzimática [42]. En este caso, podemos pensar que a un pH de 4, tenemos ionizados a todos los aminoácidos que se necesitan para que la β -ionona reductasa actúe sobre su sustrato.

Actividad específica de la β -ionona reductasa

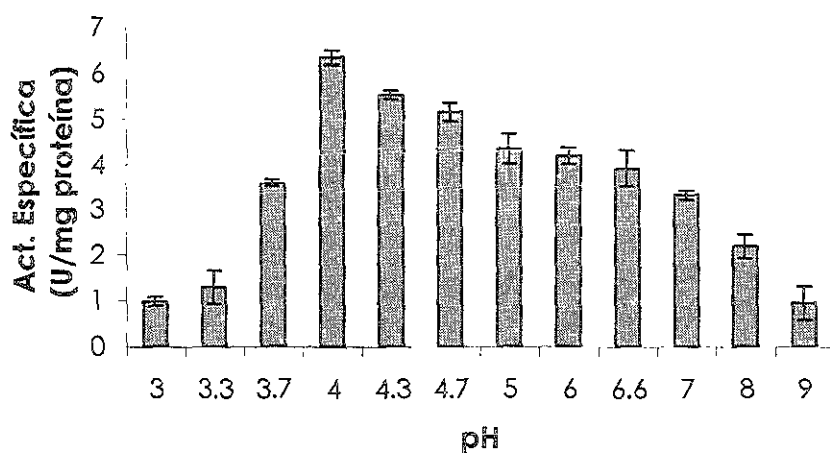


Figura 18

Actividad de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita a 20% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes valores de pH

9.6 Determinación de la temperatura óptima de la β -ionona reductasa contenida en la fracción que precipita al 20% de saturación con sulfato de amonio

Conocido el valor de pH al cual es máxima la actividad de la β -ionona reductasa, se procedió a buscar la temperatura óptima para la actividad de la misma. Se hizo una fermentación con la mezcla microbiana, y luego de 42 h, se hizo la precipitación del medio hasta un 20% de saturación. La determinación de la actividad se hizo por el método espectrofotométrico, utilizando el amortiguador de citratos 0.05 M pH = 4. Se probó un intervalo de temperaturas desde 20 hasta 50 °C. La temperatura óptima, resultó estar entre los 35 y los 40 °C (Fig. 19).

La mayoría de las reacciones químicas se llevan a cabo a una velocidad mucho mayor a medida que aumenta la temperatura. Un incremento en la temperatura imparte más energía cinética a las moléculas que reaccionan lo que resulta en más colisiones productivas por unidad de tiempo. Las reacciones enzimáticas se comportan de una manera similar, hasta cierto punto ya que su actividad catalítica resulta de una estructura terciaria, precisa y altamente ordenada, que coloca grupos R específicos de los aminoácidos de tal manera que se formen los

sitios de unión estereoespecíficos para el sustrato así como el sitio catalítico. La estructura terciaria está mantenida por un gran número de enlaces no covalentes que resultan débiles. Si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura terciaria se desestabiliza y se dice que la enzima está desnaturalizada, o lo que es lo mismo, que ha perdido su actividad catalítica. Así, a medida que la temperatura se incrementa, el incremento esperado en la velocidad que resulta de mas colisiones de la enzima con el sustrato está balanceado con la creciente velocidad de desnaturalización. De esta manera, una gráfica de velocidad contra temperatura a menudo muestra un pico, denominado "temperatura óptima" [43].

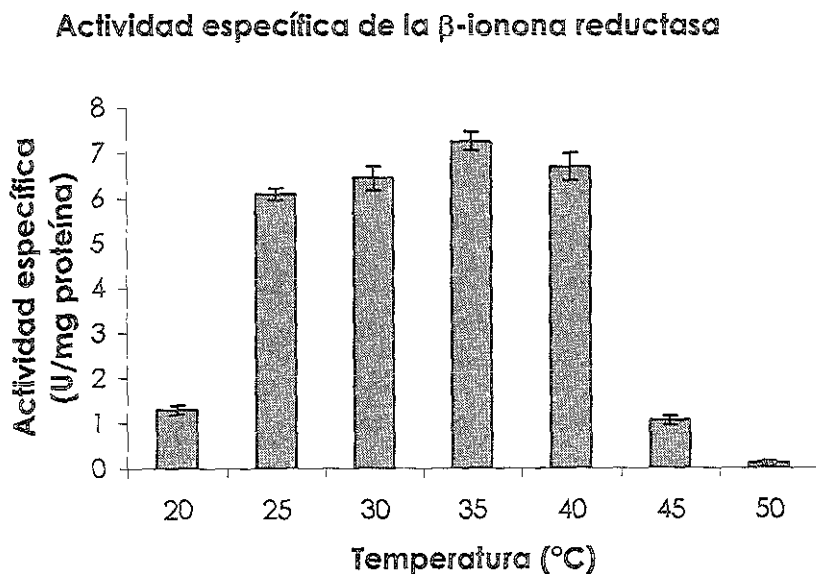


Figura 19
Actividad de la β -ionona reductasa en la fracción que precipita al 20% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a diferentes condiciones de temperatura

9.7 Determinación de la actividad de la β -ionona reductasa en *Bacillus* sp. a partir de diferentes fuentes de carbono

Se decidió determinar la actividad de β -ionona reductasa en *Bacillus* sp. debido a que se encontró que únicamente *Geotrichum* sp. es capaz de producir β -ionona. Además, solamente la mezcla de estos dos microorganismos puede transformar a la luteína en compuestos con aroma. Entonces, dados estos hechos, suponemos que *Geotrichum* sp. está oxidando a la luteína, y en este paso produce a la β -ionona, pero que ya no es capaz de transformarla hasta los compuestos con aroma, papel que suponemos, tiene *Bacillus* sp. en la ruta de transformación.

Con el fin de comprobar lo anteriormente expuesto, se hizo una fermentación con *Bacillus* sp., probando tres fuentes de carbono en medio YTN: (1) adicionado con luteína 0.04 mM, que es la condición en la que el bacilo crece pero no produce aroma; (2) adicionado con β -ionona 0.08 $\mu\text{g/mL}$, que es la concentración máxima de este compuesto que produce *Geotrichum* sp. (producción volumétrica, Fig. 10) cuando crece en un medio adicionado con luteína; y (3) adicionado con luteína 0.04 mM y β -ionona 0.08 $\mu\text{g/mL}$, que es la condición en la que se encuentra *Bacillus* sp., cuando está formando parte del cultivo mixto en medio YTN con luteína como principal fuente de carbono. Cabe mencionar que este experimento se realizó al principio del trabajo experimental de esta tesis, pero para fines de presentación de resultados, se reporta al final.

De esta manera, en esta fermentación, se hicieron cinéticas tanto de crecimiento (Fig. 20), como de producción de aroma (Fig. 21), desde 0 hasta 48 h, tiempo después del cual, se precipitó la proteína del medio de cultivo libre de células, con sulfato de amonio, hasta un 60% de saturación. A la muestra libre de sal, se le determinó la actividad de β -ionona reductasa por el método espectrofotométrico (Fig. 22). La determinación se hizo a las siguientes condiciones: temperatura ambiente, pH de 6.6 y NADPH 0.38 mM como coenzima.

Podemos observar que *Bacillus* sp. fue capaz de crecer en las tres condiciones que se probaron de fuentes de carbono, presentándose el mejor crecimiento en luteína (Fig. 20). Cabe hacer notar que este resultado nos indica que *Bacillus* sp. es

capaz de utilizar a la β -ionona como fuente de carbono, lo que nos sugiere que tiene las enzimas necesarias para esto.

Por otra parte, los compuestos con aroma a tabaco no se producen cuando la luteína es la fuente de carbono, porque *Bacillus* sp. no tiene las enzimas necesarias para romper a la luteína en el enlace 9,10, que es lo que conduce a la producción de β -ionona, y posteriormente de compuestos con aroma. Sin embargo, en la condición donde la fuente de carbono es la β -ionona, sí hubo producción de compuestos con aroma, lo que hace suponer que *Bacillus* sp. tiene las enzimas para reducir a este compuesto y transformarlo hasta el aroma. La producción de aroma fue ligeramente menor cuando el microorganismo en estudio se creció en luteína y β -ionona, quizá por la presencia de la luteína como fuente de carbono adicional (Fig. 21).

Hablando de la actividad de la β -ionona reductasa, cuando *Bacillus* sp. se creció en luteína como principal fuente de carbono, no produce la enzima, pero sí se detectó actividad de la misma cuando las fuentes de carbono son β -ionona y luteína con β -ionona (Fig. 22). Esto nos hace suponer que tal vez la síntesis de la β -ionona reductasa en el microorganismo, se ve inducida por la presencia de β -ionona. La actividad resulta ser casi 2 veces mayor cuando la fuente de carbono es solamente β -ionona que cuando ésta se encuentra en combinación con luteína. Esto lo podemos explicar porque, cuando solamente hay β -ionona, tenemos un menor crecimiento y por lo tanto, la actividad específica de la enzima es mucho mayor, además de que, al haber otra fuente de carbono, además de la β -ionona, posiblemente el microorganismo está ocupando la otra fuente de carbono. Existen reportes de microorganismos capaces de crecer en este compuesto como fuente de carbono. En 1995, Larroche y colaboradores [32] probaron una cepa de *A. niger* en un medio con glucosa y β -ionona como fuentes de carbono y observaron que el microorganismo era capaz de utilizar a la β -ionona, una vez que se había terminado la glucosa en el medio.

Curva de crecimiento de *Bacillus* sp.

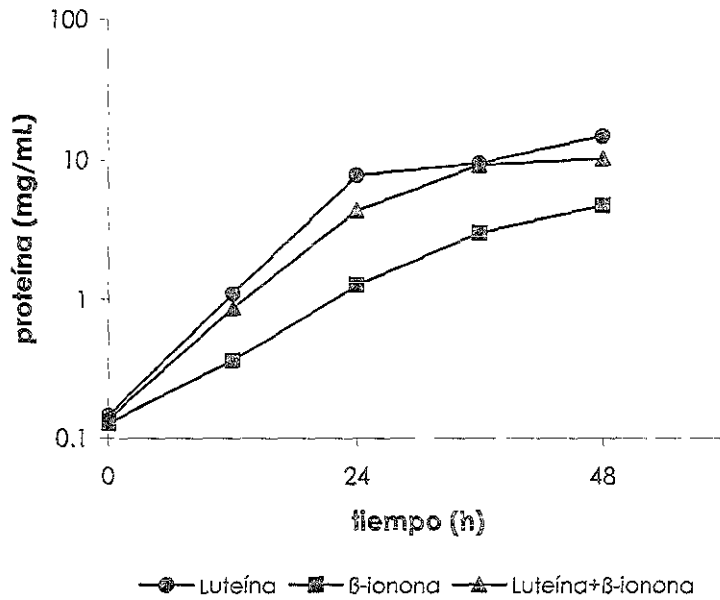


Figura 20

Curva de crecimiento de *Bacillus* sp. en medio YTN, adicionado con diferentes fuentes de carbono

Producción específica de aroma

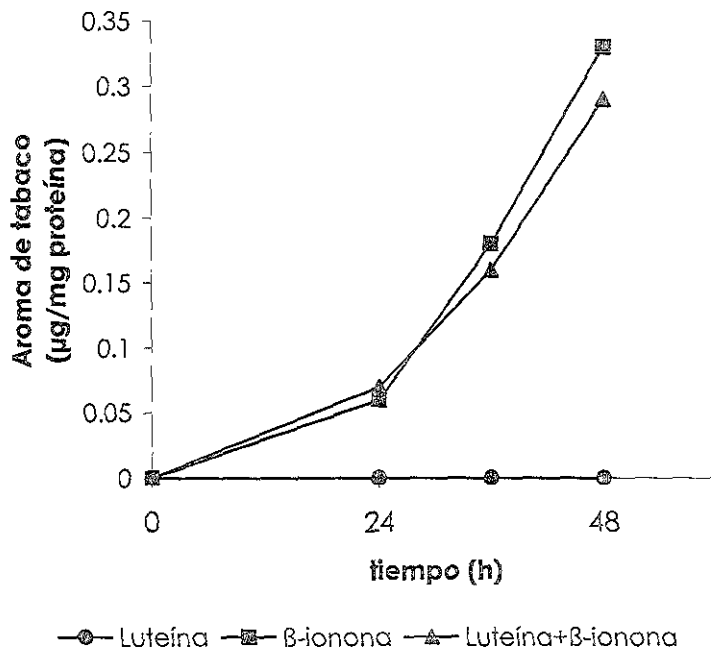


Figura 21

Cinética de producción de aroma de tabaco por *Bacillus* sp. crecido en diferentes fuentes de carbono

Actividad de la β -ionona reductasa

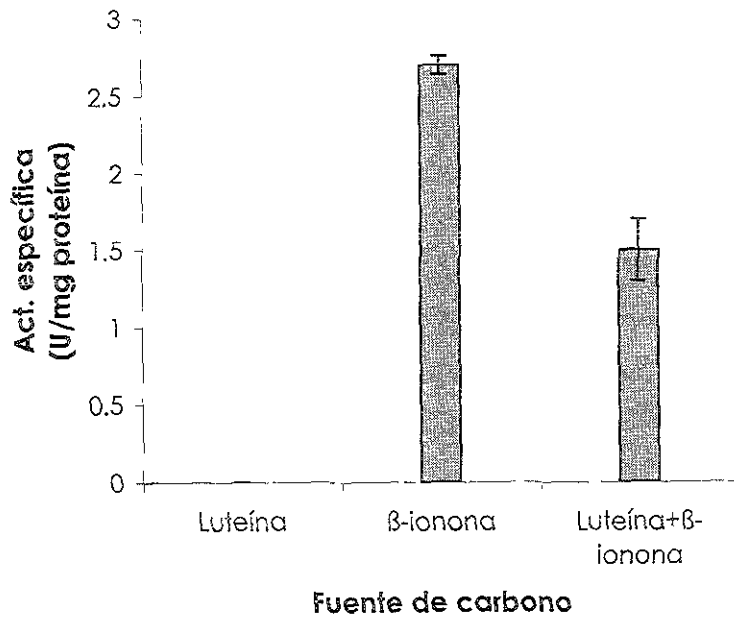


Figura 22

Actividad específica de la β -ionona reductasa en *Bacillus* sp. a partir de diferentes fuentes de carbono. Fraccionado a un 60% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

9.8 Determinación de la actividad de β -ionona reductasa en *Geotrichum* sp. a partir de diferentes fuentes de carbono

Se decidió buscar actividad de β -ionona reductasa en un cultivo de *Geotrichum* sp. para confirmar la sospecha de que esta levadura no es capaz de producirla, así como no es capaz de transformar a la luteína en compuestos con aroma de tabaco y poder tener así un poco más claro lo que está ocurriendo en la ruta de biotransformación de la luteína en compuestos con aroma.

Así, se llevó a cabo una fermentación con *Geotrichum* sp. en medio YTN, probando las mismas condiciones de diferentes fuentes de carbono que se probaron con *Bacillus* sp. Se analizaron los siguientes parámetros: crecimiento, producción de aromas y actividad de β -ionona reductasa.

Como puede verse (Fig. 23), *Geotrichum* sp. fue incapaz de crecer en β -ionona como fuente de carbono. Se sabe que este compuesto posee una alta actividad antifúngica, esto al provocar la inhibición de la cadena respiratoria impidiendo el consumo de oxígeno [32]. Sin embargo, crece muy bien en luteína.

No se detectó ni producción de compuestos con aroma, ni actividad de β -ionona reductasa, ni cuando la fuente de carbono era luteína, ni cuando era β -ionona, en principio porque en esta última, ni siquiera se presenta crecimiento. Sin embargo, si recordamos, *Geotrichum* sp. es capaz de producir β -ionona cuando crece en un medio cuya fuente de carbono es luteína (Fig. 10).

Como el compuesto que se produce luego de la ruptura de este carotenoide es β -ionona, podemos suponer que *Geotrichum* sp. posee una enzima oxidasa, que actúa sobre el doble enlace ubicado en la posición 9,10 de la molécula de luteína, produciéndose así β -ionona. Sin embargo, esta levadura fue incapaz de crecer en el medio con β -ionona (Fig. 23), por lo que tampoco es capaz de producir aroma de tabaco y en consecuencia, no posee la enzima β -ionona reductasa.

Curva de crecimiento de *Geotrichum* sp.

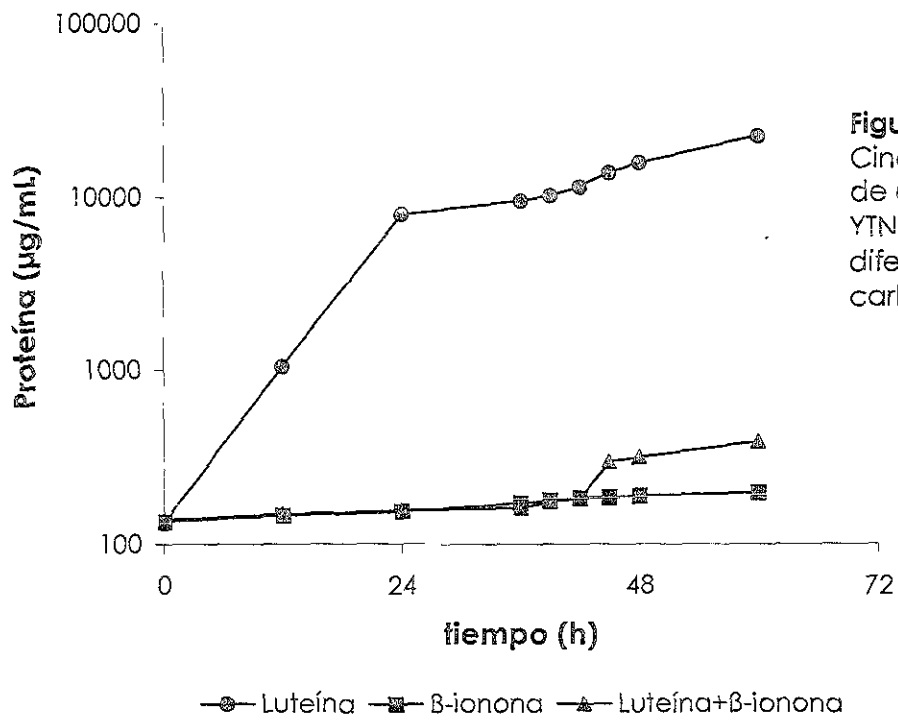


Figura 23
Cinética de crecimiento de *Geotrichum* sp. en medio YTN adicionado con diferentes fuentes de carbono

10.0 Conclusiones

Del presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- ❖ Cuando se parte de medio YTN adicionado con luteína como principal fuente de carbono, únicamente la mezcla de *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. es capaz de producir compuestos con aroma a tabaco, y solamente esta mezcla presenta actividad de la enzima β -ionona reductasa.
- ❖ Tanto la mezcla microbiana como cada uno de los microorganismos que la componen, son capaces de degradar a la luteína; sin embargo, solamente la mezcla y *Geotrichum* sp. la oxidan en el enlace 9,10 para producir β -ionona.
- ❖ El tiempo óptimo para la producción de β -ionona reductasa por la mezcla microbiana, a partir de luteína, es de 42 h. La enzima es más afín por NADPH que por NADH.
- ❖ Al fraccionar por precipitación el medio de cultivo de la mezcla microbiana, se encontró que la fracción con mayor actividad de β -ionona reductasa es la que precipita al 20% de saturación con sulfato de amonio. En esta fracción, la β -ionona reductasa presentó una mejor actividad a un pH de 4 y a una temperatura entre 35 y 40° C
- ❖ *Bacillus* sp. es capaz de crecer en luteína como fuente de carbono, pero no produce aromas a partir de ella, ni presenta actividad de β -ionona reductasa. Sin embargo, también puede crecer en β -ionona, y en esta condición, se encontró tanto la producción de aromas como la actividad de β -ionona reductasa.
- ❖ La actividad de β -ionona reductasa es inducible en *Bacillus* sp. por la presencia de β -ionona en el medio de cultivo.

- ❖ *Geotrichum* sp. no puede crecer en β -ionona como fuente de carbono, sin embargo, crece adecuadamente cuando la fuente de carbono es luteína. En esta condición no produce aromas de tabaco pero si se detecta producción de β -ionona.
- ❖ Es de suponerse que *Geotrichum* sp. podría ser el responsable de la ruptura oxidativa de la luteína, en el enlace 9,10, y que *Bacillus* sp. podría ser el encargado de reducir a la β -ionona hasta los compuestos con aroma. Esta interesante hipótesis merece ser estudiada en mayor detalle en trabajos futuros.

11.0 Bibliografia

- [1] **Krings U, Berger RG**; Biotechnological production of flavours and fragrances; *Appl. Microbiol Biotechnol* (1998)49:1-8
- [2] **Armstrong DW, Brown LA, Porter S, Ruffen R**; Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. En: Schreier P, Winterhalter P (eds); *Progress in flavour precursor studies*; Allured; Carol Stream, Ill; (1993) pp 425-438
- [3] **Somogyi PL**; The Flavour and fragrance industry: serving a global market; *Chemistry& Industry* (1996) 4:170-173
- [4] **Feron G, Bonnarme P, Durand A**; Prospects for the microbial production of food flavours; *Trends Food Sci Technol*; (1996) 7: 285-293
- [5] **Stofberg J, Kirschman JC**; The consumption ratio of flavouring materials: a mechanism for setting priorities for safety evaluation; *Food Chem Toxicol*;(1985) 23: 857-60.
- [6] **Welsh F, Murray WD, Williams RE**; Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals; *Crit Rev Biotechnol*; (1989) 9: 105-169
- [7] **Engel KH, Roling I**; Generation of flavors by microorganisms and enzymes: An overview. En Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ y Kobayashi A. (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors* (ACS Symposium Series 637); American Chemical Society; Washington D.C.; (1996) pp 120-123.
- [8] **Sprecher E, Hanssen HP**; Recent trends in the research on flavors produced by fungi. En: Berger RG, Nitz S y Schreier P (eds); *Topics in flavor research*; Eichorn; West Germany; (1985) pp 385
- [9] **Schreier P**; Enzymes and flavour biotechnology; *Adv Biochem Eng Biotechnol*; (1997) 55:51-70
- [10] **Roberts SM, Wiggins K, Casy G**; Preparative biotransformations: Whole cells and isolated enzymes in organic synthesis; Wiley, Chichester; (1992)
- [11] **Roig MG, Kennedy JF**; Perspectives for biophysicochemical modifications of enzymes; *Crit Rev Biotechnol* (1992) 12: 391-406
- [12] **Chung GH, Lee YP, Jeohn GH, Yoo OJ, Rhee JS**; Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1; *Agric Biol Chem*; (1991) 55: 2359-2365
- [13] **Kugimiyas W, Otani Y, Kohno M, Hashimoto Y**; Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *Rhizopus niveus* lipase; *Biosci Biotech Biochem*; (1992) 56: 716-719

- [14] **Sánchez A, Flores-Cotera L, Langley E, Marín R, Maldonado G y Sánchez S**; Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones; *Revista Latinoamericana de Microbiología* (1999) 41:175-191
- [15] **Markerl T, Henkel K-GaA**; Fed. Rep. Ger DE 1981 7042-4, Use of monocyclic bicyclic and tricyclic aldehydes as odoriferous substances; 1999 (*Chem Abstr* 131: 276818-20)
- [16] **Anzaldí M, Sotofattori E, Dusatti F, Ferro M, Pani M y Balbi A**; Synthesis of ionones and carvone analogues: olfactory properties and preliminary toxicity assays; *Eur J Med Chem* (2000) 35: 797-803
- [17] **Enzell C**; Biodegradation of carotenoids – an important route to aroma compounds; *Pure & Appl Chem* (1985) 57: 693-700
- [18] **Rock CD, Heath TG, Gage DA, Zeevat JAD**; Abscicic alcohol is an intermediate in abscicic acid biosynthesis in a shunt pathway form abscicic aldehyde; *Plant Physiol*; (1991) 97: 670-676
- [19] **Erdam J**; *Clin Nutr*; Carotenoids in black tea; (1988) 7: 101-106
- [20] **Winterhalter P, Schreier P**; Carotenoids as precursors of odor compounds; *Food Rev Int*; (1995) 11: 237-254
- [21] **Enzell CR, Wahlberg I**; Tobacco isoprenoids; *Nat Prod Rep*; (1987) 4 (3):237-76.
- [22] **Sanderson GW, Co H, Gonzales JG**; Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenoides in black tea aroma formation; *J Food Sci*; (1971) 36: 231-235
- [23] **Enzell CR**; en Flavor '81; Schreier P (ed); W. de Gruyter: Berlin; (1981) pp 449-478
- [24] **Kotseridis Y, Razungles A, Bertrand A, Baumes R**; Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis; *J Agric Food Chem*; (2000)48:5383-8.
- [25] **Eugster CH, Märki-Fischer E**; The chemistry of rose pigments; *Angew Chem Int Ed Engl*; (1991) 30: 654-672
- [26] **Winterhalter P**; Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects, en Takeoka, G.R., Teranishi, R, Williams, PJ y Kobayashi, A (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors* (ACS Symposium Series 637); American Chemical Society; Washington D.C.; (1996) pp 120-123.
- [27] **Ohloff G**; Chemistry of odor stimuli; *Experientia*; (1986) 42:271-9
- [28] **Larroche C, Gros JB**; Special transformation processes using fungal spores and immobilized cells; *Adv Biochem Eng Biotechnol*; (1997) 55: 179-220
- [29] **Mikami Y, Watanabe E, Fukunaga Y, Kasaki T**; Isolation and characterization of β -ionone using microorganisms; *Agric Biol Chem*; (1978) 42: 1075-1088

- [30] **Mikami Y, Fukunaga Y, Arita M, Kisaki T**; Biotransformation of terpenes by *Aspergillus niger*; *Appl Env Microbiol*; (1981) 41: 6-14
- [31] **Sode K, Karube, I, Araki R, Mikami Y**; Microbial conversion of β -ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent; *Biotechnol Bioeng*; (1989) 33: 1191-1195
- [32] **Larroche C, Creuly C, Gros JB**; Fed-batch biotransformation of β -ionone by *Aspergillus niger*; *Appl Microbiol Biotechnol*; (1995) 43: 222-227
- [33] **Dixon M, Webb EC**; Enzymes; 3a edición; Academic Press; New York; (1979) pp 277-290
- [34] **Wong CH, Whitesides GM**; Enzymes in synthetic organic chemistry; Pergamon; Oxford; (1994) pp 325-342
- [35] **Tang Y-X y Suga T**; Characterization of two enone reductasas from *Nicotiana tabacum* cell cultures; *Phytochemistry*; (1992) 31: 2599-2603
- [36] **Corey EJ**; Mechanism of enzymic lipoxygenation of arachidonic acid. En: Bartmann W, Sharpless KB (eds); Stereochemistry of organic and bioorganic transformations; VCH Publ; Weinheim; (1987) pp 286-315
- [37] **Bosser A, Papolorey E, Beling JM**; A simple way to (\pm)-dihydroactinidiolide from β -ionone related to enzymatic co-oxidation of β -carotene in aqueous solution; *Biotechnol Prog*; (1995) 11:689-692
- [38] **Tang Y-X y Suga T**; Biotransformation of alpha- and beta- ionones by immobilized cells of *Nicotiana tabacum*; *Phytochemistry*; (1994) 37: 737-740
- [39] **Dolan CT, Roberts GD**; Identification procedures. En: Washington JA (ed); Laboratory procedures in clinical microbiology; Little Brown; Boston; (1974) pp 153-164.
- [40] **Sánchez-Contreras A, Jiménez M, Sánchez S**; Bioconversion of lutein to products with aroma; *Appl Microbiol Biotechnol* (2000) 54: 528-534
- [41] **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**; Protein measurement with the Folin- phenol reagent; *J Biol Chem*; (1951) 193: 265-275
- [42] **Voef D, Voef JG**; Bioquímica; Ediciones Omega; Barcelona; (1992) pp 83, 372, 617.
- [43] **Segel IH**; Enzyme kinetics; John Wiley & Sons; New York; (1975) pp 926-941
- [44] **Bergmeyer HU**; Methods of enzymatic analysis; 3rd edition; Vol III; VCH Publ; Weinheim; (1987) pp 585-595
- [45] **Rosenberg IM**; Protein Analysis and Purification; Birkhäuser, Boston; (1996) p 126

Anexos

ANEXO 1

Formulación del medio de cultivo empleado

MEDIO YTN

Compuesto	% p/ v
NaCl	3.0
Extracto de levadura	1.0
Triptona	1.0
Glucosa	0.1
Elementos traza	0.1
Agar (cuando es el caso)	1.5

Ajustar pH a 7.2 y esterilizar en autoclave a 20 libras de presión, 120 °C, durante 30 min.

Determinación de la actividad catalítica [44]

Bajo las condiciones en la que la concentración de la enzima es mucho menor que la del sustrato, la mayoría de las enzimas se rigen por la ecuación de *Michaelis – Menten* para el cálculo de velocidad de reacción:

$$V_{\max} = k_2[E]_0$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

donde: V_{\max} = Velocidad máxima de la reacción, que se da a altas concentraciones de sustrato, cuando la enzima está saturada.

k_2 = Constante de velocidad de formación de los productos

$[E]_0$ = Concentración molar de la enzima.

v_0 = Velocidad inicial de la reacción (operativamente, es la velocidad medida antes de que ~ 10% del sustrato se haya convertido en producto).

$[S]$ = Concentración molar de sustrato.

K_m = Constante de *Michaelis – Menten* (concentración del sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima).

Bajo un conjunto definido de condiciones físicas de temperatura, pH, etc., pueden asumirse valores constantes para k_2 , y para K_m . De ahí que la actividad de la enzima sea proporcional en forma lineal a la concentración, de la enzima. Además, la ecuación predice que cuando $[S]$ es mucho mayor que el valor de K_m , la velocidad catalítica se vuelve independiente de $[S]$ y se dice que la enzima está saturada con respecto al sustrato.

Los procedimientos analíticos basados en la espectrofotometría ya sea en la región del visible o del ultravioleta, rutinariamente detectan cromóforos a concentraciones de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/ml}$ de solución. Si se considera un peso molecular promedio de la enzima de 100 000 y un número de recambio de 100 por minuto, entonces el cálculo muestra que solo 10^{-10} moles son necesarias para formar 1 μmol de producto en 1 minuto en 1 mL de volumen de la mezcla de reacción. Así, la concentración necesaria de enzima será de solamente 10^{-7} M para que se formen cantidades detectables de enzima. Como el número de recambio de 100 asumido es poco para la mayoría de las enzimas estándar, y como es posible prolongar el período de incubación por más de 1 minuto para permitir una mayor formación de producto, es posible la detección de cantidades aun menores de enzima.

La gran desventaja de los métodos basados en la determinación de la actividad es que el resultado depende en su totalidad del método. Aún las alteraciones menores en cualquier parámetro del ensayo tal como temperatura, pH, concentración del buffer, concentración del sustrato pueden tener profundos efectos sobre la actividad catalítica determinada, por lo que las condiciones de ensayo a ensayo para determinar la actividad de una enzima, deben conservarse estrictamente.

Es por lo anterior que no hay valores confiables de actividad catalítica molar disponibles en la mayoría de los casos y esta es la razón por la que la "concentración" de la enzima es frecuentemente expresada en términos de la velocidad catalítica medida, mas que en unidades de "cantidad de sustancia" por litro, tal como mol/ L. Sin embargo, para propósitos de comparación, las determinaciones de actividad son perfectamente adecuadas, si se expresan como actividades específicas, esto es, unidades/ mg de proteína total.

Fórmulas para el cálculo de actividad enzimática utilizando el método espectrofotométrico [44]

Para determinar la actividad catalítica z , se emplea la velocidad de la conversión catalizada de sustrato por unidad de tiempo, $\mu\text{mol}/\text{min}$ o mol/s .

De la ley de Lambert y Beer, tenemos que:

$$(a) \quad c = \frac{\log I_0/I}{\varepsilon d} = \frac{A}{\varepsilon d} \quad \text{mmol/L}$$

para una reacción química, esto nos da que:

$$(b) \quad c_1 - c_2 = \frac{A_1 - A_2}{\varepsilon d}; \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon d} \quad \text{mmol/L}$$

De acuerdo a la ecuación (b), la actividad catalítica (conversión en moles por unidad de tiempo) es:

$$(c) \quad z = \frac{\Delta c V}{\Delta t} = \frac{\Delta A V}{1000 \varepsilon d \Delta t} \quad \text{mol/s (kat)}$$

(unidades: ε en $\text{L mol}^{-1} \text{mm}^{-1}$; V del volumen de ensayo en L; d en mm; t en s)

$$(c1) \quad z = \frac{\Delta c V}{\Delta t} = \frac{1000 \Delta A V}{\varepsilon d \Delta t} \quad \mu\text{mol}/\text{min (U)}$$

(unidades como en la ecuación (c); t en min)

La concentración de actividad catalítica en la muestra es:

$$(d) \quad b = \frac{\Delta A V}{1000 \varepsilon d \Delta t v} = \frac{\Delta A}{1000 \varepsilon d \Delta t \varphi} \quad \text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1} \text{(kat/L)}$$

(unidades como para ecuación (c); v en L; $\varphi = v/V$ en L/L)

$$(d1) \quad b = \frac{1000 \Delta A V}{\varepsilon d \Delta t v} = \frac{1000 \Delta A}{\varepsilon d \Delta t \varphi} \quad \mu\text{mol min}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ (U/ L)}$$

(unidades como para la ecuación (d))

La actividad catalítica relacionada a la masa de proteína, o sea la actividad específica z_c/m_s , es:

$$(e) \quad z_c/m_s = \frac{\Delta A V}{1000 \varepsilon d \Delta t v \rho_{\text{proteína}}} = \frac{\Delta A}{1000 \varepsilon d \Delta t \varphi \rho_{\text{proteína}}} \quad \text{kat/ g}$$

(unidades como para la ecuación (d)); $\rho_{\text{proteína}}$ en g/L)

$$(e1) \quad z_c/m_s = \frac{1000 \Delta A V}{\varepsilon d \Delta t v \rho_{\text{proteína}}} = \frac{1000 \Delta A}{\varepsilon d \Delta t \varphi \rho_{\text{proteína}}} \quad \text{U/ g}$$

(unidades como para la ecuación (e))

Símbolos

c	Concentración de sustancia, mol/ L
I	Intensidad de luz
ε	Coefficiente de absorción milimolar, L mmol ⁻¹ mm ⁻¹
d	Longitud de paso óptico, mm
A	Absorbancia
z	Actividad catalítica, kat, U
kat	Katal, mol s ⁻¹
U	Unidad internacional (para enzimas), $\mu\text{mol min}^{-1}$
V	Volumen de ensayo, L
t	Tiempo, s (min, h)
b	Actividad volumétrica, kat/ L, U/ L
v	Volumen de muestra utilizado en el ensayo, L
φ	Fracción de volumen de la muestra en la mezcla de ensayo, v/V
Z_c/m_s	Actividad específica, kat/ g, U/g
ρ	Concentración de masa, g/ L

UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PATAGONIA

Coeficientes de absorción milimolar del NAD(P)H [44]

Los coeficientes de absorción milimolar ($L\text{ mmol}^{-1}\text{ mm}^{-1}$) para el NADH y NADPH a temperaturas de 25 °C y 30 °C son para uso práctico:

	340 nm	Hg 334 nm	Hg 365 nm
NADH	6.3×10^2	6.18×10^2	3.4×10^2
NADPH	6.3×10^2	6.18×10^2	3.5×10^2

ANEXO 3

Cantidad necesaria de sulfato de amonio a pesar según grado de saturación requerido [45]

		Concentración final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % de saturación																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		Gramos de sulfato de amonio sólido a ser añadidos a 1 L de solución																
Concentración inicial de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % de saturación	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

Ejemplo:

Si se desea precipitar 1 L de medio de cultivo, desde 0, hasta 20%, la tabla indica que se requieren 114 g de sulfato de amonio sólido.

Si se desea precipitar 1 L de medio de cultivo, desde 20 hasta 40% de saturación, la tabla indica que se requieren 123 g de sulfato de amonio sólido.

Cálculos para la preparación de amortiguadores

Se parte de la ecuación de Henderson – Hasselbach.

$$(i) \quad pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

donde $[A^-]$ es la concentración de la base conjugada y $[HA]$ es la concentración del ácido

La concentración total de las especies que contienen a A, Co, se define como:

$$(ii) \quad Co = [A^-] + [HA]$$

Ahora, despejando $[A^-]$ de la ecuación (i), tenemos que:

$$(iii) \quad pH - pKa = \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$(iv) \quad 10^{pH - pKa} = \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$(v) \quad [A^-] = (10^{pH - pKa})[HA]$$

De (v), sustituyendo $[A^-]$ en (ii), obtenemos lo siguiente:

$$(vi) \quad Co = (10^{pH - pKa})[HA] + [HA]$$

Ahora, se despeja de (vi) a $[HA]$:

$$(vii) \quad Co = [HA](1 + 10^{pH - pKa})$$

$$(viii) \quad [HA] = \frac{Co}{(1 + 10^{pH - pKa})}$$

Con esta ecuación, se calcula la concentración de $[HA]$, que luego se sustituye en la ecuación (ii), para conocer la concentración de $[A^-]$.

Ejemplo:

Se desea preparar un amortiguador de fosfatos, 0.05 M, pH = 6

El pKa del $H_2PO_4^-$ es de 7.21, así, de (viii), tenemos que:

$$[NaH_2PO_4] = \frac{0.05M}{(1 + 10^{6-7.21})} = 0.0471M$$

Este valor, se sustituye ahora en la ecuación (ii):

$$[Na_2HPO_4] = 0.05M - 0.0471M = 0.0029M$$

Se desean preparar ahora 25 mL, para lo cual hay que pesar lo siguiente:

$$g \text{ de } NaH_2PO_4 = \left(0.0471 \frac{mol}{L}\right) \times \left(137.99 \frac{g}{mol}\right) \times 0.025 L = 0.1625 g$$

$$g \text{ de } Na_2HPO_4 = \left(0.0029 \frac{mol}{L}\right) \times \left(141.965 \frac{g}{mol}\right) \times 0.025 L = 0.0103 g$$

Ahora, se mezclan estas dos sales, se disuelven en un volumen de agua bidestilada menor a 25 mL, se ajusta el pH y posteriormente, se afora a 25 mL con agua bidestilada.