

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

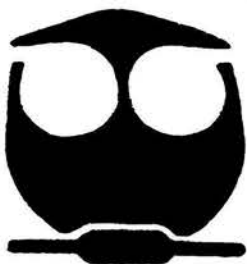
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE LA ENZIMA  
 $\beta$ -IONONA REDUCTASA DE  
*Paenibacillus amylolyticus*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Q.A. GABRIELA MALDONADO  
ROBLEDO



Tutor: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

MÉXICO, D. F.

Abril 2004



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.



# PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA $\beta$ - IONONA REDUCTASA DE *PAENIBACILLUS AMYLOLYTICUS*

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el laboratorio de Microbiología Industrial, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Roberto Arreguín Espinosa	Instituto de Química, UNAM
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Roberto Arreguín Espinosa, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de purificación y caracterización de la proteína.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día .....

El Jurado de Examen de defensa para la obtención del Grado de Maestría estuvo constituido por:

<b>Presidente</b>	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
<b>Secretario</b>	Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Facultad de Química, UNAM
<b>Suplente</b>	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
<b>Suplente</b>	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM



## Agradecimientos

---

### ✦ A mi familia

Por encima de todo, agradezco con cariño todo lo que han hecho por mi, porque gracias a ustedes, pude lograr mi sueño. Gracias por su apoyo, su cariño, su confianza. Un beso para todos, los quiero tanto.

### ✦ A José Eduardo

Si el amor es una enfermedad...

Gracias por todo, por lo bueno, por lo malo, por la paciencia, la ilusión, el cariño, el amor, por todo eso que hemos aprendido juntos. ¿Quién dice que no duelen las huellas en la arena? Espero que estés orgulloso de mi, aun falta mucho camino por recorrer, pero sé que de tu mano, va a ser mucho más fácil, divertido y emocionante. Eres el amor de mi vida y siempre lo vas a ser y sabes que ni TODO el tamaño de TODO, ni todo el infinito de infinitos me alcanza. Porque, nadie que te quiera como yo, habrá en este mundo.

### ✦ A mis amigos de toda la vida

Eswina, que te puedo decir, si ya lo sabes... ¿o no?

Cesitor, mi otro hermano, ya se armó!!!!

Agustín, siempre presente en las buenas, las malas y las peores. Gracias.

Silvia, aunque estés lejos, estás más cerca de lo que te imaginas, hoy y siempre.

Luz del Carmen, mi querida compañera y amiga de penas y alegrías.

### ✦ Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Le agradezco infinitamente todo lo que me ha dado: cariño, conocimiento, ejemplo y mucho más. Siempre tendrá un lugar muy especial en mi corazón y mi memoria

### ✦ A los miembros del Laboratorio de Microbiología Industrial

A todos y cada uno, les agradezco que de alguna u otra forma me hayan ayudado en todos estos años que pasé en este laboratorio, que fue como mi segunda casa. Me llevo un poco de cada uno de ustedes.

### ✦ Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Sé muy bien que este trabajo nunca hubiera sido posible sin su valiosa ayuda. Más que un tutor es un amigo muy especial para mi. Infinitas gracias.

### ✦ Al Dr. Barbarín Arreguín Lozano

Me considero una persona muy afortunada por haberlo conocido, gracias por esas charlas tan agradables y por toda esa sabiduría compartida. Un gran ejemplo para mi. Con mucho cariño.

☒ **A mis queridos amigos del Instituto de Química**

Oli, Vane, Eneas, Edgar, Héctor, Martín, mis queridos amigos y compañeros. Conocerlos fue algo de lo mejor que me pasó durante el posgrado. Con todo mi cariño hoy y siempre.

☒ **A mis profesores de la Maestría en Ciencias Bioquímicas**

Por todas sus valiosas enseñanzas.

☒ **A los miembros de mi comité tutorial**

Por su valiosa guía y aportaciones a la realización del presente trabajo

☒ **A los miembros del jurado de Maestría**

Agradezco el tiempo que se tomaron en revisar esta tesis así como sus atinados comentarios.

☒ **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM**

Por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Maldonado Roberto

Cabrera

FECHA: Julio 9 2004

FIRMA: 

*No siempre el mejor camino es el más corto*  
(Proverbio árabe)

# Contenido

---

I. Resumen	1
II. Introducción	
1) Producción Industrial de aromas	2
2) Producción de aromas naturales	3
2.1) Utilización de microorganismos en la obtención de productos naturales con aroma	6
2.2) Utilización de enzimas en la obtención de productos naturales con aroma	9
2.2.1) Utilización de oxidorreductasas en la obtención de productos naturales con aroma	11
3) Carotenoides	12
4) Aromas a partir de carotenoides	13
4.1) Producción biotecnológica de compuestos con aroma derivados de carotenoides	17
4.2) Aromas derivados de los carotenoides presentes en el tabaco	18
III. Antecedentes	
1) Producción microbiana de derivados de la $\beta$ -ionona	22
2) Enzimas involucradas en la transformación de $\beta$ -ionona y otros terpenoides de estructura similar	25
3) Biotransformación de luteína hasta compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco	31
4) Caracterización del sistema responsable de la luteína en compuestos con aroma a tabaco	33
IV. Justificación	35
V. Objetivos generales	36
VI. Objetivos particulares	36
VII. Estrategia general	37
VIII. Materiales y Métodos	38
1) Microorganismo y condiciones de cultivo utilizadas	38
1.1) Conservación de la cepa	38

1.2)	Preinóculo e inóculo	38
1.3)	Fermentación y obtención del extracto libre de células	39
1.4)	Determinación de crecimiento en medio mínimo y consumo de $\beta$ -ionona	39
2)	Determinación del crecimiento y de la cantidad de proteína	41
3)	Determinación de la actividad enzimática	42
4)	Purificación de la $\beta$ -ionona reductasa	42
4.1)	Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	42
4.2)	Separación por electroenfoque en columna	43
4.3)	Separación por cromatografía de intercambio iónico en HPLC	43
5)	Determinación del peso molecular	44
6)	Análisis de los aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal	44
7)	Determinación del pH de máxima actividad	45
8)	Determinación de la temperatura de máxima actividad	45
9)	Determinación del punto isoeléctrico	46
10)	Estudios cinéticos	46
11)	Determinación del producto de reacción	46
12)	Purificación de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona	47
 IX Resultados		
1)	Ruptura del microorganismo	48
2)	Ubicación de la enzima dentro de la célula	50
3)	Crecimiento de <i>Paenibacillus amylolyticus</i> en MMS adicionado con $\beta$ -ionona como única fuente de carbono y energía	51
4)	Purificación de la $\beta$ -ionona reductasa	54
4.1)	Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	54
4.2)	Separación por electroenfoque en columna	55
4.3)	Separación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna de intercambio catiónico	59
4.4)	Resumen de la purificación	61
5)	Determinación del punto isoeléctrico	61
6)	Determinación del peso molecular	62
7)	Análisis de la secuencia de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de la $\beta$ -ionona reductasa	62

8)	Determinación del pH de máxima actividad y efecto de la composición del amortiguador sobre la actividad de la $\beta$ -ionona reductasa	63
9)	Determinación de la temperatura de máxima actividad de la $\beta$ -ionona reductasa	64
10)	Estudios cinéticos	66
11)	Aislamiento e identificación del producto de reacción de la $\beta$ -ionona	67
X	Discusión	74
XI	Conclusiones y Perspectivas	82
XII	Bibliografía	84
XIII	Anexo (Espectros de masas)	89

# I. Resumen

---

Las iononas y sus derivados son compuestos con aroma muy apreciados en la industria de los aditivos y de la perfumería. Forman parte de aromas muy importantes como el de las rosas, el té y el tabaco. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, donde son producidas por las plantas como sustancias antimicrobianas o para atraer insectos polinizadores. Proviene de la ruptura oxidativa de los carotenoides y en la actualidad se producen por síntesis orgánica, lo que hace costoso el proceso. Por todo lo anterior, la biotecnología ha surgido como una alternativa interesante para su producción, ya que, además de ser muy específica, el producto obtenido legalmente se considera como "natural". Se han aislado diferentes microorganismos, principalmente hongos filamentosos, capaces de transformar a la  $\beta$ -ionona, en derivados de mayor valor agregado. Algunas cepas del género *Streptomyces* también han sido capaces de llevar a cabo dichas transformaciones aunque con un rendimiento mucho menor. Sin embargo, nunca se ha estudiado la bioquímica de la formación de estos compuestos, ya que no se conocen las vías metabólicas que conducen a su producción. En el Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, se obtuvo una colonia microbiana, compuesta por una levadura (*Trichosporon asahii*) y una bacteria (*Paenibacillus amylolyticus*), capaz de crecer en un medio suplementado con el oxicarotenoide luteína y de transformarlo hasta  $\beta$ -ionona y sus derivados reducidos, presentes en el perfil del aroma a tabaco. La ruptura de la luteína la lleva a cabo *T. asahii*, produciendo  $\beta$ -ionona, compuesto que se acumula en el medio e inhibe su propio crecimiento. Sin embargo, *P. amylolyticus* transforma la  $\beta$ -ionona en sus derivados reducidos, detoxificando el medio y permitiendo así que ambos microorganismos continúen creciendo. En esta bacteria se identificó una actividad de  $\beta$ -ionona reductasa, dependiente de NADPH. El propósito del presente trabajo fue el de purificar y caracterizar dicha enzima. La  $\beta$ -ionona reductasa se purificó a homogeneidad aproximadamente 350 veces. Se encontró que es una enzima citosólica, aparentemente monomérica, cuyo peso molecular es de 58 kDa. Los estudios cinéticos revelaron que posee una cinética tipo Michaelis-Menten con una alta afinidad por su sustrato. Además, se encontró que su  $pI$  es de 4.1, su  $pH$  y temperatura de máxima actividad son 7.2 y 40°C respectivamente. Se obtuvo la secuencia de los extremos N- y C-terminales de la enzima y se encontró que únicamente el extremo C-terminal posee una alta identidad con alquilhidroperóxido reductasas de otras bacterias Gram positivas. Se aisló el producto de la reacción de la  $\beta$ -ionona-reductasa, el cual resultó ser 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, con lo que se concluye que esta enzima participa llevando a cabo la primera reducción de la  $\beta$ -ionona hasta 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol. Finalmente se encontró que *P. amylolyticus* no puede utilizar a la  $\beta$ -ionona como fuente de carbono y energía, y que únicamente transforma a este compuesto, cuando existe una fuente de carbono en el medio.

## II. Introducción

---

### 1) Producción industrial de aromas

La producción y uso de los sabores y las fragancias en una escala industrial, comenzó en el siglo XIX con el aislamiento de los compuestos responsables del aroma característico de algunos productos naturales (ejemplo: el cinamaldehído aislado del aceite de la canela y el benzaldehído aislado de las almendras). La síntesis de los compuestos químicos con aroma que reproducían el olor y sabor característico de los productos naturales, pronto se volvió común y dio lugar a una nueva rama de la industria de los productos químicos (Somogyi, 1996). El aislamiento, identificación y síntesis de la vainillina marcaron los inicios de la industria moderna de los sabores y aromas (Krings, 1998).

Los compuestos químicos con aroma se usan tanto en formulaciones de saborizantes (para impartir un sabor y aroma atractivos a los alimentos y bebidas procesados), como en formulaciones de fragancias (que dan un aroma agradable a bienes de consumo tales como perfumes, productos de belleza, cosméticos, detergentes y limpiadores). Los sabores y fragancias son mezclas muy complejas, que en sus formulaciones no sólo incluyen compuestos químicos con aroma, sino también aceites esenciales y extractos naturales, así como solventes, diluyentes y acarreadores.

En el año 2000, la industria mundial de sabores y fragancias, incluyendo las ventas de sabores y fragancias compuestos, fue valuada en cerca de \$14 billones de dólares, lo cual representa un crecimiento anual del 4% desde 1997. La producción de compuestos químicos con aroma, calculada a partir de estimados de oferta/ demanda por regiones geográficas principales contribuyó con \$1.8 billones de dólares del valor total (Somogyi y Kishi, 2000).

Desde 1996, la demanda de compuestos químicos con aroma ha crecido cerca de un 2.7% anual, con un consumo valorado en un estimado de \$1.7 billones de dólares en el año 2000 (Somogyi y Kishi, 2000).



A pesar de que se sabe que existe mucha demanda para algunos productos, la producción estimada de compuestos químicos con aroma parece estar sólo en un pequeño exceso con respecto al consumo. Esto se debe a que la demanda actual de estos compuestos se encuentra en equilibrio con la oferta.

Mientras que la producción de compuestos químicos con aroma es virtualmente imposible de asegurar debido al gran número de compuestos químicos involucrados en una red altamente compleja de mercadeo internacional, se estima que el consumo varía significativamente a nivel mundial, dependiendo del área geográfica así como de la categoría de los productos. En el año 2000, los Estados Unidos y Europa occidental, en conjunto, consumieron el 70% del total de los compuestos químicos con aroma y sobre el 90% del total de químicos del tipo del almizcle utilizados en composiciones de sabores y fragancias (Somogyi y Kishi, 2000).

En el período 1996-2000, el consumo de compuestos químicos con aroma en Europa aumentó a una velocidad anual de aproximadamente 6.8% en valor. Este crecimiento impresionante puede deberse a la apertura de los mercados de Europa del Este, lo que representó una muy buena oportunidad para los proveedores europeos. En Japón, el consumo de los compuestos con aroma ha disminuido debido a que las regulaciones favorecen a los productos de origen natural. Los compuestos con aroma de origen sintético se utilizaron en menos del 25% de los productos complejos (Somogyi y Kishi, 2000).

## **2) Producción de aromas naturales**

Los compuestos químicos con aroma son los compuestos orgánicos volátiles que se encuentran en alimentos y perfumes y que les proporcionan su carácter organoléptico distintivo. Un sabor o fragancia es una mezcla compleja de tales compuestos. Sin embargo, estos compuestos a menudo acentúan características organolépticas particulares (frutal, floral, cárnico) (Hagedorn y Kaphammer, 1994). Desde hace mucho tiempo, los compuestos con aroma, ya sean mezclas complejas o compuestos puros, han sido extraídos a partir de fuentes botánicas o producidos a través de fermentaciones (ejemplo: productos lácteos fermentados). Como ya se mencionó, hasta el siglo XIX se sintetizó el primer compuesto con aroma (vainillina) y a partir de ese momento, se han



sintetizado muchos otros. A pesar de este hecho, aún hoy en día, muchos compuestos que imparten aromas característicos se extraen a partir de fuentes vegetales por razones económicas y porque los consumidores prefieren los productos naturales.

En años recientes, el mercado ha visto una gran demanda “de vuelta a lo natural”, lo cual probablemente se debe al incremento de compuestos de origen “no natural” que se ha encontrado poseen alguna forma de toxicidad. Debido a lo anterior, los consumidores se sienten más atraídos hacia los compuestos naturales, particularmente aquellos de consumo frecuente. Sin embargo, la diferencia en precio entre un compuesto sintético y uno extraído naturalmente puede ser considerable, por ejemplo USD \$12/ kg para la vainillina sintética y cerca de USD \$4000 /kg para la extraída de vainas del árbol de vainilla (Feron, *et al.*, 1996)

El significado del término “natural” puede variar entre diferentes comunidades. En Estados Unidos, definen el término “aroma natural” como:

El aceite esencial, oleorresina, esencia, extracto, hidrolizado proteico, o cualquier producto proveniente del tostado, calentamiento o transformación enzimática, que contiene los constituyentes del aroma derivados de una especia, fruta o jugo de fruta, vegetal, jugo de un vegetal, levadura, hierba, corteza, brote, raíz, hoja, flor o cualquier otro material vegetal, o productos de fermentación, cuya función en el alimento sea proporcionar un aroma, más que ser un nutriente. (Código Federal de Regulaciones, 21 CFR 101.22.a.3.).

Esta definición de “natural”, incorpora así a los productos modificados por las células vivas o sus componentes, incluyendo a las enzimas.

Debido al aumento de la preferencia por productos naturales, se ha ejercido mayor presión para la producción de compuestos naturales con sabor y aroma utilizando la extracción, sobre todo de las plantas. Esta materia prima, sin embargo, se encuentra sujeta a varios problemas. El principal es que generalmente contienen concentraciones muy bajas de los compuestos deseados, lo cual eleva mucho los costos de extracción. Más aún, la fuente de la materia prima se encuentra sujeta a los cambios estacionales y variaciones climáticas, lo que afecta de manera importante tanto al rendimiento como a la calidad de los compuestos que se obtienen. La fuente de materia prima también se

encuentra influida por la estabilidad socio-política de la región productora; esto ha sido una preocupación importante de las industrias comercializadoras de estos compuestos. Por otro lado, algunas especies botánicas se están aproximando o se encuentran actualmente en peligro de extinción, circunstancia que se ve agravada por la sobreexplotación de las especies en peligro que poseen alguna esencia de importancia.

Aunque se pueden obtener las fragancias y sabores por medio de la transformación química de las sustancias naturales, el producto final no puede considerarse legalmente como natural. Además, los métodos químicos pueden carecer de una especificidad de sustrato, lo que resulta en bajo rendimiento y baja pureza del producto, generalmente dando lugar a mezclas racémicas, lo cual es significativo cuando la estereoquímica de la molécula en cuestión significa una gran diferencia en el aroma percibido. Estas desventajas de la extracción y las rutas sintéticas convierten a los procesos biotecnológicos como alternativas atractivas.

Las células y las enzimas son elementos claves en los procesos biotecnológicos porque estos biocatalizadores pueden llevar a cabo una amplia variedad de reacciones específicas bajo condiciones moderadas. Un prerrequisito esencial para la generación óptima de aromas utilizando microorganismos y enzimas es el conocimiento detallado de la composición y disponibilidad de los sustratos / precursores que se requieren. El conocimiento adquirido acerca de los precursores disponibles en ciertas frutas, junto con la posibilidad que ofrece el uso de enzimas, así como el diseño de biocatalizadores específicos, provee nuevas dimensiones para promover la liberación de aromas glicoconjugados (Engel y Roling, 1996).

## 2.1) Utilización de microorganismos en la obtención de productos naturales con aroma

Las rutas convencionales para la síntesis química o para el aislamiento de aromas a partir de plantas aún son viables. Sin embargo, la generación biotecnológica de tales compuestos se está volviendo sumamente atractiva. Los aromas son sustancias bioactivas, y los efectos de la quiralidad sobre la percepción del olor, sugieren el uso de biocatalizadores. El duplicar el metabolismo secundario de las plantas en sistemas microbianos ("procesos fermentativos") conduce a la obtención de aromas que se clasifican como naturales por las legislaciones mundiales más importantes, lo cual representa una ventaja de mercado sumamente importante (Krings y Berger, 1998). Muchos de los compuestos con aroma de importancia industrial, han sido identificados en diversos cultivos microbianos y, además, se ha constatado que son estructuralmente idénticos a los que se obtienen de otras fuentes naturales como las plantas (Krings y Berger, 1998) (Tabla 1).

**Tabla 1**  
**Compuestos importantes con aroma generados por microorganismos**

Compuesto de importancia	Especie que la produce
Hongos	
Vainillina	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>
Benzaldehído	<i>Ischnoderma benzoinum</i>
Salicilato de metilo	<i>Phenillus sp.</i>
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 sp.</i>
Levaduras	
Furaneol	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Lactonas macrolíticas	<i>Torulopsis bombicola</i>
Feniletanol y ésteres	<i>Kluyveromuces sp.</i>
Bacterias	
Diacetilo	<i>Lactobacillus lactis</i>
Metil cetonas	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Geosmina	<i>Streptomyces citreus</i>
Pirazinas	<i>Bacillus sp.</i>
2-Acetil-1-pirrolina	<i>Bacillus cereus</i>
Borneol, isoborneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>

Tradicionalmente, los procesos microbianos han jugado un papel integral e importante en la generación de compuestos con sabor y aroma desde el descubrimiento de la cerveza, el queso y la salsa de soya hace miles de años. Hoy en día, las técnicas microbiológicas modernas han sido aplicadas para aumentar la eficiencia de muchos de estos biocatalizadores microbianos para producir compuestos específicos poseedores tanto de sabores como de aromas (Hagedorn y Kaphammer, 1994).

En reactores altamente controlados que contienen estos catalizadores, se pueden producir compuestos de forma consistente y predecible durante todo el año. Más aún, existe un potencial para incrementar tanto la pureza como el rendimiento de los compuestos utilizando manipulación genética de los biocatalizadores para facilitar la recuperación de los productos y reducir los costos. Un atributo importante de los biocatalizadores microbianos es su habilidad para sintetizar productos *de novo* a partir de nutrientes relativamente baratos. Además, los microorganismos pueden llevar a cabo transformaciones de varios pasos sobre los sustratos adicionados. Por otra parte, las enzimas en su forma purificada o presentes en células permeabilizadas pueden transformar sustratos presentes en concentraciones muy altas (no fisiológicas). Lo más importante en ambos casos es que los productos obtenidos pueden etiquetarse como naturales si derivan de sustratos naturales (Armstrong y Yamazaki, 1986).

La mayoría de los compuestos con características organolépticas (de aroma y sabor) que se obtienen a partir de microorganismos son metabolitos secundarios. Frecuentemente, los compuestos químicos con aroma que se producen vía biocatálisis no son asimilados en el metabolismo primario del organismo productor sino que son transformados mediante procesos metabólicos diferentes que, en la mayoría de los casos, se encuentran poco estudiados (Hagedorn y Kaphammer, 1994). Estos compuestos poseen umbrales tanto de sabor como de aroma muy bajos y se pueden detectar al nivel de partes por millón. Los principales obstáculos para la producción microbiana de aromas son la concentración de producto tan baja que se obtiene, así como el costo relativamente alto de su recuperación. Hoy en día, la producción industrial ya sea de un sabor o un aroma mediante el uso de microorganismos sólo se vuelve costeable si el compuesto en cuestión tiene un valor en el mercado de USD \$200 – USD \$500/kg (Sprecher, 1985).

La eficiencia de la síntesis microbiana *de novo* de compuestos con aroma puede ser aumentada al ofrecer precursores adecuados que sirvan como puntos de inicio para las biotransformaciones (reacciones de un solo paso) o bioconversiones (reacciones de múltiples pasos) que nos dan el producto deseado. Las fuentes naturales que contengan los precursores requeridos en altas cantidades pueden ser utilizadas directamente como sustratos.

Los microorganismos pueden ser manipulados fisiológica y genéticamente para que sobreproduzcan ciertos productos valiosos. Los métodos modernos de manipulación genética y control fisiológico hacen de la biogeneración de aromas un área importante de la investigación en productos naturales. Hoy en día, se trabaja más sobre la obtención de un conocimiento fisiológico y bioquímico del organismo productor, así como en la elucidación de las rutas metabólicas y las enzimas involucradas en la producción de los compuestos con aroma. Cuando se hayan logrado estos objetivos, se podrá pensar en una manipulación genética y/o fisiológica para lograr la sobreproducción de los compuestos de interés (Welsh, *et al.* 1989).

Los procesos microbianos también pueden utilizarse para biotransformaciones a gran escala de compuestos precursores de los aromas naturales. El microorganismo elegido se cultiva bajo condiciones que favorezcan la síntesis de una enzima o ruta enzimática determinada. Las células son recolectadas y se resuspenden en una gran densidad celular en un ambiente que limite su posterior crecimiento. La biotransformación del precursor añadido puede entonces llevarse a cabo con eficiencias hasta del 100%. Los problemas de velocidades de reacción muy bajas y de baja concentración de producto se resuelven con la alta concentración celular empleada (Welsh, *et al.*, 1989).

Las biotransformaciones / bioconversiones microbianas ofrecen una alternativa efectiva a los procesos químicos y enzimáticos convencionales. Muchas células poseen tanto el sistema redox requerido para la reacción (ejemplo: conversión de una cetona a un alcohol) y el sistema o sistemas que se requieren para la regeneración de los cofactores. De esta manera, el uso de sistemas microbianos evita algunos de los problemas que se asocian con el uso de sistemas enzimáticos redox a gran escala. Dichos problemas incluyen la inestabilidad inherente de las enzimas redox y sus cofactores en presencia de oxígeno, metales traza, temperatura y uso de solventes orgánicos (que pueden requerirse

para solubilizar los reactivos orgánicos a ser tratados), y por supuesto, la necesidad de una regeneración de los cofactores (Welsh, *et al.*, 1989). No obstante, aun deben superarse algunas desventajas, que incluyen el hecho de que las reacciones a menudo involucran el uso de sustratos a concentraciones molares muy pequeñas (frecuentemente a nivel milimolar), y que los rendimientos de reacción y las velocidades de generación de los productos son a menudo muy bajas.

Los microorganismos pueden catabolizar carbohidratos, grasas y proteínas, y son capaces de convertir los productos de dicho catabolismo en compuestos con aroma más complejos, lo cual es una propiedad que se utiliza durante la producción de alimentos fermentados, los cuales poseen un espectro de compuestos con aroma impresionante. Por ejemplo, los microorganismos productores de ácido láctico contribuyen al sabor y aroma de los lácteos. Además del ácido láctico, producen pequeñas cantidades de otros compuestos con aroma y sabor químicamente muy distintos del ácido láctico, como alcoholes de cadena corta, aldehídos, cetonas, metilcetonas y ácidos, así como pirazinas, lactonas y tioles (Cogan, 1995).

Otros precursores de bajo costo, de fácil disposición y renovables, como los ácidos grasos y los aminoácidos, pueden ser convertidos a compuestos con sabor y aroma de un mayor valor agregado. La biocatálisis compite muy bien con la catálisis química en los siguientes tipos de reacciones:

- Introducción de quiralidad
- Funcionalización de carbonos químicamente inertes
- Modificaciones selectivas de un grupo funcional en moléculas multifuncionales
- Resolución de mezclas racémicas

## **2.2) Utilización de enzimas en la obtención de productos naturales con aroma**

El uso de enzimas es una parte integral de muchos procesos importantes en la producción de alimentos. Se utilizan en la fabricación de queso, en la industria de la panificación, de elaboración de cerveza y del vino. Existen múltiples ejemplos del uso de



enzimas a gran escala para la producción de edulcorantes y de modificación de sabores y aromas. Las enzimas más utilizadas en una escala industrial, son las hidrolíticas, principalmente porque no se requiere la regeneración de cofactores redox, la cual es muy costosa, en contraste con las oxidorreductasas. Las síntesis que involucran reacciones enzimáticas se llevan a cabo a temperaturas, presiones y valores de pH moderados, lo que las diferencia de su contraparte química debido principalmente a la cinética enzimática. Los procesos biocatalíticos difieren de los procesos químicos convencionales, Las síntesis enzimáticas poseen una enantio y regio-especificidad remarcable, y existen ciertos compuestos que solamente pueden ser producidos a través de la síntesis enzimática. Sin embargo, algunas desventajas que tiene el uso de enzimas pueden ser que algunas veces la enzima puede ser inestable o requerir de cofactores redox, los rendimientos de producto pueden ser bajos y la enzima en sí y/o sus cofactores pueden tener un alto costo (Schmid, *et al.*, 2001).

Se han descrito más de 3000 enzimas en la literatura, pero probablemente sólo existen unos cientos disponibles en forma comercial, y de ellas, solamente 20 se encuentran disponibles en cantidades adecuadas para ser utilizadas en procesos industriales (Armstrong y Brown, 1994). Aún así, se han desarrollado procesos enzimáticos para la producción de ciertos compuestos saborizantes y aromatizantes como las pirazinas y otros compuestos heterocíclicos poco convencionales que son de interés en la industria de los aditivos. Muchos de estos procesos pueden optimizarse mediante el uso de medios de reacción no acuosos o bifásicos (Welsh *et al.*, 1989). Los sistemas no acuosos se utilizan debido a que se resuelven los problemas de solubilidad de todos los componentes de la reacción y contribuyen a la estabilidad de las enzimas.

En la industria se utilizan varias enzimas, como la xilosa isomerasa, que cataliza la isomerización de la D-glucosa a D-fructosa, empleada para producir jarabe de alta fructosa y la penicilina amidasa, que se utiliza para producir penicilinas semisintéticas. Hoy en día, la catálisis selectiva se está volviendo un requerimiento de la industria química, y los avances recientes en catálisis enzimática se han extendido hacia la síntesis de químicos y polímeros muy especializados. Por ejemplo, las peroxidasas se utilizan industrialmente para catalizar la síntesis de resinas fenólicas que se utilizan como reemplazo de los formaldehídos fenólicos, y la nitrilo hidratasa que se usa para catalizar la hidratación del acetonitrilo en acrilamida (Nagasawa y Yamada, 1990). La mayoría de los

procesos enzimáticos convencionales comparten varios atributos, incluyendo altas concentraciones de producto formadas (altas productividades), el que no se generan subproductos indeseables, y el uso de enzimas que no requieren cofactores costosos.

Las lipasas, esterasas, proteasas, nucleasas y varias glicosidasas se utilizan en los procesos de extracción de sabores y aromas, produciendo importantes moléculas con aroma a partir de otras moléculas más grandes. Entre las más utilizadas para generar compuestos con aroma, se encuentran las lipasas, las cuales se utilizan en sistemas no acuosos para llevar a cabo reacciones de esterificación mediante la llamada lipólisis reversa (Gatfield, 1992).

### **2.2.1) Utilización de oxidorreductasas en la producción de compuestos naturales con aroma**

Las oxidorreductasas comprenden la clase más grande de enzimas que catalizan reacciones biológicas de oxidación /reducción. Debido a que muchas transformaciones químicas y bioquímicas involucran procesos redox, la idea de desarrollar aplicaciones biocatalíticas prácticas para las oxidorreductasas ha sido una meta atractiva para la biotecnología. Las aplicaciones para estas enzimas han incluido la oxifuncionalización de esteroides y otros fármacos, síntesis y modificación de polímeros, degradación oxidativa de contaminantes, oxifuncionalización de hidrocarburos así como la construcción de biosensores para una amplia variedad de aplicaciones analíticas y clínicas (May, 1999).

Se han desarrollado novedosas metodologías para reciclar eficiente y económicamente las coenzimas que son esenciales para la actividad catalítica de muchas oxidorreductasas. Éstas comprenden la regeneración enzimática, química o electroquímica de la coenzima reducida u oxidada que está siendo consumida por la reacción de interés. Por ejemplo, De Felipe *et al.*, (1998) construyeron cepas de *Lactococcus lactis* sobreproductoras de NADH oxidasa, al clonar el gen *nox2* de *Streptococcus mutans*, que codifica para una NADH oxidasa. Este sistema permitió la sobreproducción de la NADH oxidasa en las células de *L. lactis*, lo que resultó en una relación mayor NADH : NAD<sup>+</sup>, y un consecuente cambio de fermentación homoláctica a fermentación ácido-mixta durante el catabolismo aerobio de la glucosa. Este trabajo da



un ejemplo de cómo la modulación del reciclado de las coenzimas puede utilizarse para alterar la distribución de los productos de la biocatálisis redox aun en sistemas microbianos.

Tayhas *et al.* (1998) reportaron la construcción de una celda biocombustible de metanol / oxígeno que utiliza una regeneración de coenzima catalizada por la diaforasa en el ánodo. La diaforasa cataliza la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> por el benzilviológeno, y esta reacción se utilizó para regenerar el NAD<sup>+</sup> requerido por las deshidrogenadas NAD<sup>+</sup>-dependientes para oxidar el metanol a CO<sub>2</sub> en el compartimiento del ánodo. Este sistema ya se aplica en la combustión de automóviles de Fórmula 1 que utilizan metanol en Brasil.

Aún falta mucha investigación por hacer en el campo de la aplicación industrial de las oxidorreductasas. Aunque todavía no se utilizan a nivel industrial para la producción de compuestos con aroma, múltiples procesos redox tienen lugar en la biotransformación/ bioconversión de compuestos hasta productos con aroma, por lo que es de esperarse que en un futuro se desarrollen metodologías que conduzcan a la aplicación de estas enzimas en procesos industriales.

### 3) Carotenoides

Los carotenoides son los pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Prácticamente pueden encontrarse en casi todos los animales y las plantas (Goodwin, 1992). Se sabe que son parte indispensable de las células de microorganismos, algas, plantas, animales superiores e incluso el hombre en donde actúan como precursores de vitamina A y como antioxidantes (Karnaukhov, 1990).

A pesar de su amplia distribución, los carotenoides sólo se sintetizan *de novo* en las plantas superiores y algunos microorganismos. Son producidos por las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, por las cianobacterias fotosintéticas oxigénicas y por algunas bacterias no fotosintéticas (Sánchez *et al.*, 1999). Muchos organismos eucariontes también los producen, incluyendo algas, plantas y algunos hongos. A pesar de que forman parte importante de los animales, éstos solamente pueden obtener los carotenoides a partir de la dieta, esto es, al consumir organismos carotenogénicos.

Los carotenoides son tetraterpenos, derivados del isopreno, compuestos de 40 átomos de carbono. Pueden ser de dos clases, los carotenos, los cuales son compuestos hidrocarbonados y las xantofilas, las cuales son derivados oxigenados de los carotenos. Son moléculas hidrofóbicas, muy poco o nada solubles en agua. Por esto se localizan en regiones celulares de composición hidrofóbica. Los carotenoides poseen en su estructura una gran cantidad de dobles enlaces conjugados, mismos que conforman un cromóforo largo y permiten que estos compuestos sean capaces de absorber luz en la región visible, lo cual hace que tengan colores que van del amarillo al rojo, incluyendo el naranja (Sánchez *et al.*, 1999).

Muchas de las funciones de los carotenoides están relacionadas con su capacidad para absorber la luz. Su papel principal en la naturaleza es el de proporcionar color, actuando en las plantas como pigmentos fotosintéticos accesorios. Sin embargo, también se conoce su capacidad como antioxidantes, tanto en organismos fotosintéticos como no fotosintéticos, al participar en la inactivación de los radicales libres que se generan durante el metabolismo celular. Se ha demostrado que son capaces de inactivar a las especies de oxígeno reactivas, del tipo del oxígeno en singulete, ion hidroxilo y ion superóxido, que son capaces de provocar daño tanto a las proteínas como al DNA de las células (Cooper, 2004; Krinsky, 2003).

#### **4) Aromas a partir de carotenoides**

Como ya se mencionó, los carotenoides representan una de las clases de pigmentos naturales más ampliamente distribuidos en la naturaleza y son poseedores de una importante diversidad estructural. Además de las funciones cruciales en la fotosíntesis, fotoprotección y nutrición, los carotenoides son considerados como importantes precursores de aromas.

Entre los aromas derivados de carotenoides que poseen mayor importancia, se encuentran la  $\beta$ -ionona y la  $\beta$ -damascenona, compuestos muy apreciados en perfumería por su bajo umbral de aroma (0.007 y 0.002 ppb, respectivamente). Estructuralmente, ambos compuestos poseen un esqueleto de megastigmano, diferenciándose únicamente en la posición de la función oxigenada, que se localiza en el carbono 9 en la familia de las

iononas y en el carbono 7 en la familia de las damasconas [Fig. 1] (Winterhalter y Rouseff, 2002).

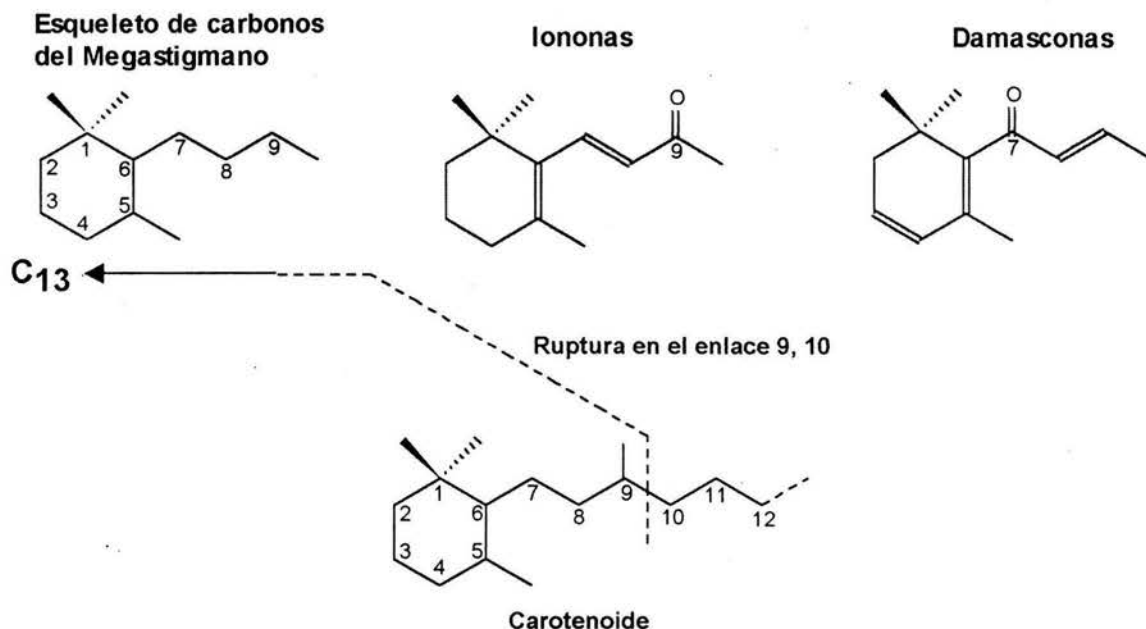


Fig. 1: Principales compuestos norisoprenoides C<sub>13</sub> derivados de los carotenoides a partir de la ruptura en el enlace 9, 10

Los compuestos con aroma derivados de carotenoides no sólo se han encontrado en productos que provienen de hojas como es el caso del tabaco, el té o la hierba mate, sino en múltiples aceites esenciales, en frutas (uvas, fruta de la pasión, carambola, membrillo, manzana y nectarina), vegetales (jitomate, espinaca), especias (azafrán, pimienta roja), además de fuentes adicionales como vino, café, ron, madera roble, miel, rosas, entre otros.

Se piensa que la generación de aromas a partir de carotenoides ocurre tanto mediante mecanismos enzimáticos, como no enzimáticos. La ruptura no enzimática incluye procesos de fotooxigenación, de (auto)oxidación, así como de degradación térmica (Winterhalter y Rouseff, 2002).

Se considera que la biodegradación de carotenoides es llevada a cabo por dioxigenasas. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de las rutas metabólicas que

conducen a la formación de los compuestos con aroma. En general, se requieren tres pasos para generar un compuesto con aroma a partir de un carotenoide de origen [Fig. 2]

- 1) Ruptura inicial por la dioxigenasa para generar lo que se conoce como producto primario de degradación.
- 2) Transformaciones enzimáticas subsecuentes del producto primario de degradación, lo que da lugar a intermediarios polares.
- 3) Conversiones catalizadas por ácidos o bases de los precursores no volátiles en la forma activa del aroma.

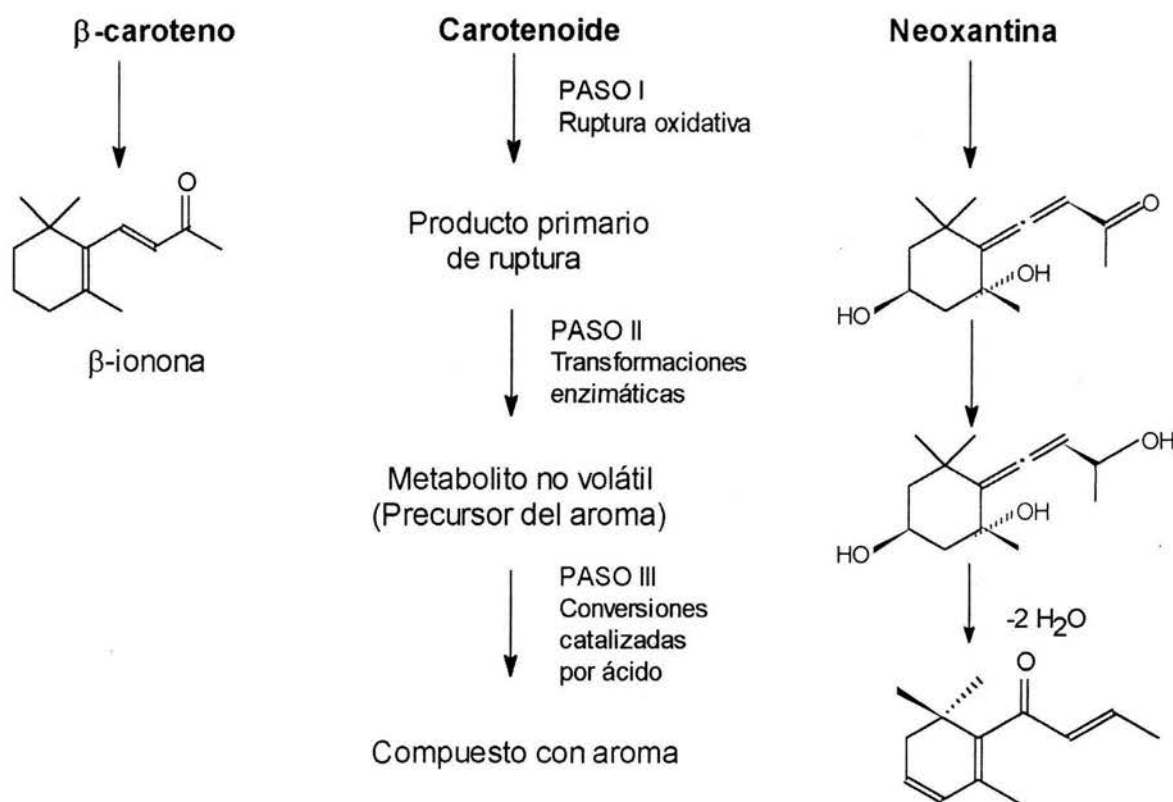
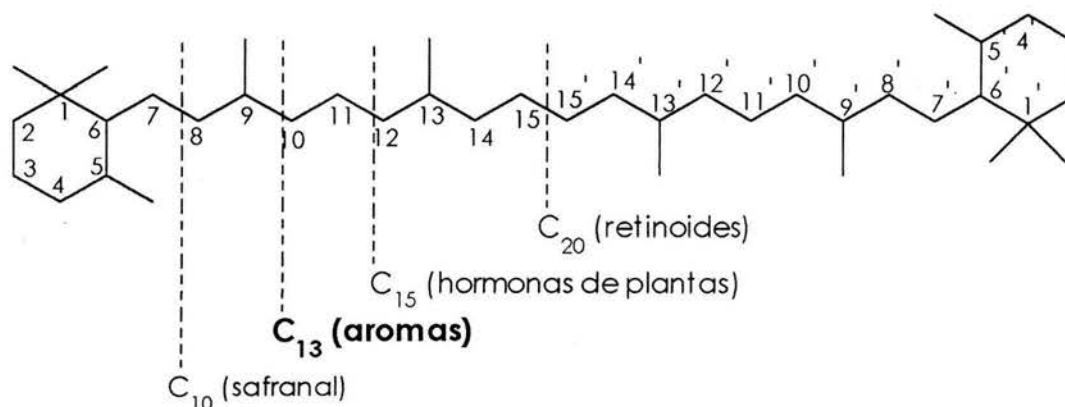


Figura 2: Pasos generales para la conversión de carotenoides en compuestos con aroma, y –como ejemplos- la formación de β-ionona y β-damascenona a partir de β-caroteno y neoxantina respectivamente

Los primeros dos pasos de la generación de aromas son muy poco conocidos. Se tiene algún conocimiento acerca de la enantioselectividad de la conversión enzimática de los productos primarios de degradación, lo cual se ha logrado a través de la determinación quiral de norisoprenoides en sustratos naturales. De cualquier manera, se tiene muy poca información sobre los sistemas de dioxigenasas que se presume existen. Únicamente se ha caracterizado el sistema que posee el alga *Microcystis* (Winterhalter, 1997).

Todos los dobles enlaces de la cadena central de los carotenoides son susceptibles al ataque enzimático, lo que resulta en la formación de varios compuestos que tienen 10, 13, 15 ó 20 átomos de carbono. En tejidos de frutas, se ha visto que el ataque oxidativo del doble enlace localizado en la posición 9,10 (9',10') parece ser el preferido (Winterhalter, 1997) [Fig. 3].



**Figura 3**  
Principales clases de fragmentos provenientes de la degradación de carotenoides mediante la acción de dioxigenasas.

Las reacciones de ruptura bio-oxidativa que involucran una 9,10 (9',10')-dioxigenasa son plausibles para la formación de compuestos norisoprenoides con 13 carbonos. 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 (Enzell y Wahlberg, 1987).
- 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 (Sanderson, 1971; Kosteridis, 2000).
- 3) Identificación de otros fragmentos provenientes del carotenoide: además de los compuestos de 13 C, se han encontrado en los tejidos de frutas, fragmentos de 14 ó 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 (Eugster y Märki-Fischer, 1991). 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.

#### **4.1) Producción biotecnológica de compuestos con aroma derivados de carotenoides**

Como los norisoprenoides de 13 C están presentes en aromas que poseen gran importancia para la industria, tanto de aditivos como de perfumería, se han buscado alternativas para disminuir los costos de producción de los mismos. La biotecnología ha surgido como una alternativa interesante, ya que abarata los costos de producción, y el producto que se obtiene se considera como natural por las principales legislaciones del mundo, lo cual le confiere un valor extra en el mercado. En general, tres métodos biotecnológicos principales pueden ser aplicados para la obtención biotecnológica de compuestos con aroma. Éstos son el uso de enzimas, de tejidos de plantas y de cultivos celulares vegetales, así como el uso de microorganismos.

Los norisoprenoides se encuentran predominantemente en las plantas como glicoconjugados. Esto representa un potencial para el uso de glicosidasas y/u otras hidrolasas (Winterhalter, 1997). Otra aproximación utilizando enzimas para la producción

biotecnológica de compuestos norisoprenoides utiliza directamente la fracción de carotenoides de las plantas. En este caso, la ruptura de la cadena del carotenoide se lleva a cabo mediante una co-oxidación utilizando a la lipoxigenasa u otros sistemas de oxidasas como la fenoloxidasa, lactoperoxidasa o xantina oxidasa (Bossler, 1995). Para la conversión subsecuente de los productos de co-oxidación, se pueden utilizar los tejidos celulares y los microorganismos.

#### **4.2) Aromas derivados de los carotenoides presentes en el tabaco**

A finales de los años 1960's se empezó a estudiar el origen de los principales compuestos con aroma presentes en las hojas de tabaco, utilizando principalmente a la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Los resultados obtenidos revelaron que las fracciones con aromas volátiles derivadas del tabaco son mezclas complejas de compuestos que provienen no solamente de la degradación de carotenoides, sino también de la degradación de otros isoprenoides, mono y sesquiterpenoides, de metabolitos de los ácidos grasos, metabolitos de la fenilalanina, metabolitos alcaloides y productos de las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos (reacción de Maillard). Los productos que provenían de la degradación de los carotenoides recibieron una atención particular, debido a su importancia como notas esenciales para el perfil del aroma (Wahlberg, 2002).

Se han encontrado e identificado más de 100 compuestos derivados de los carotenoides en las hojas del tabaco. Estos compuestos incluyen apocarotenoides que estructuralmente poseen 15, 13, 12, 11, 10 ó 9 átomos de carbono [Fig. 4] (Wahlberg, 2002). La mayor diversidad estructural se encuentra entre los apocarotenoides con 13 átomos de carbono (C<sub>13</sub>). En conjunto, representan alrededor de 60 compuestos y varían con respecto al grado y patrón de oxigenación e insaturación. La mayoría han sido encontrados en muchas otras especies vegetales pero algunos son típicos de la planta del tabaco. En la figura 4, podemos ver a los apocarotenoides C<sub>13</sub> más representativos en el tabaco, entre los cuales se encuentra la  $\beta$ -ionona y algunos de sus derivados (Enzell y Wahlberg, 1987).

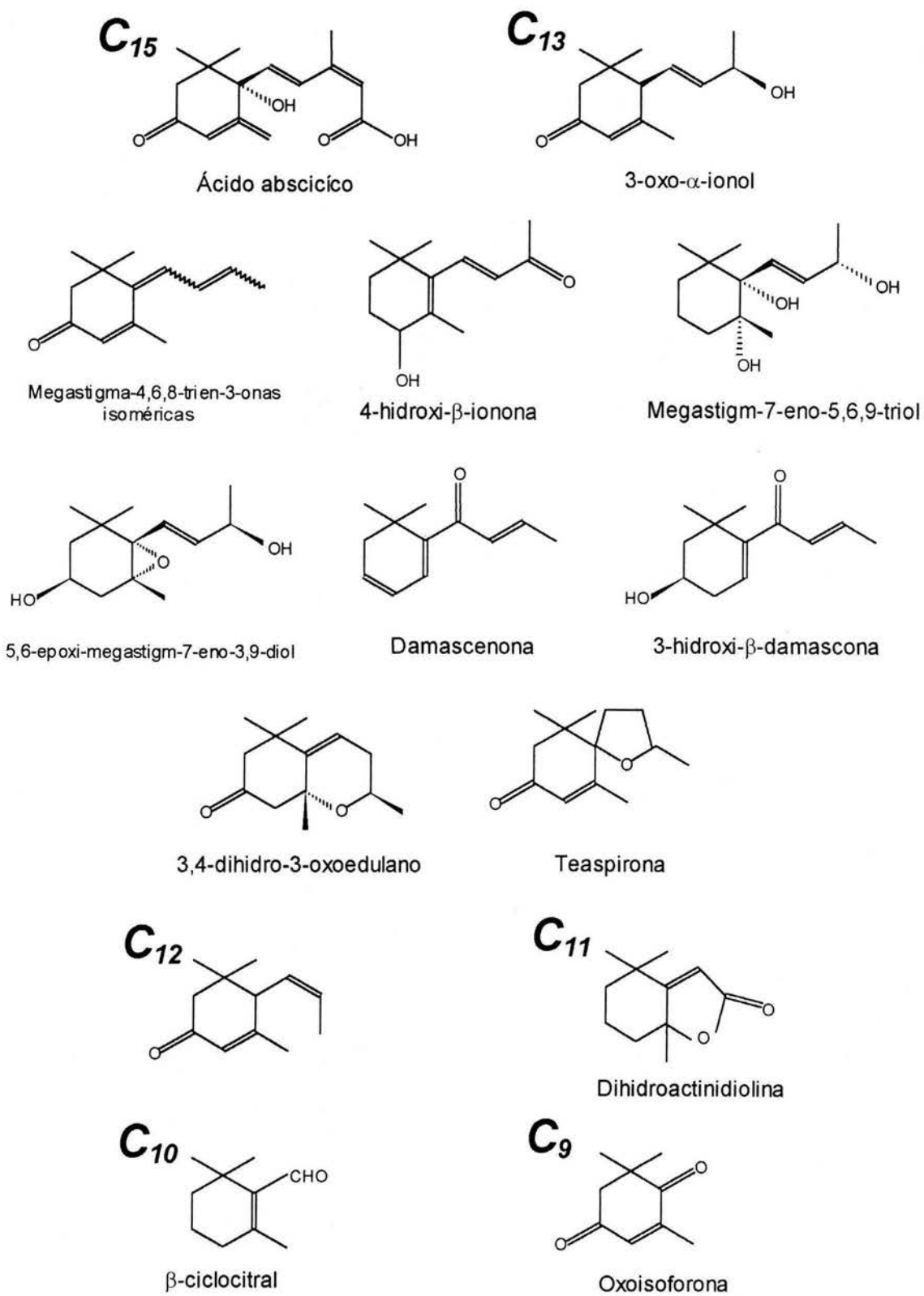


Fig. 4. Ejemplos de apocarotenoides presentes en el tabaco

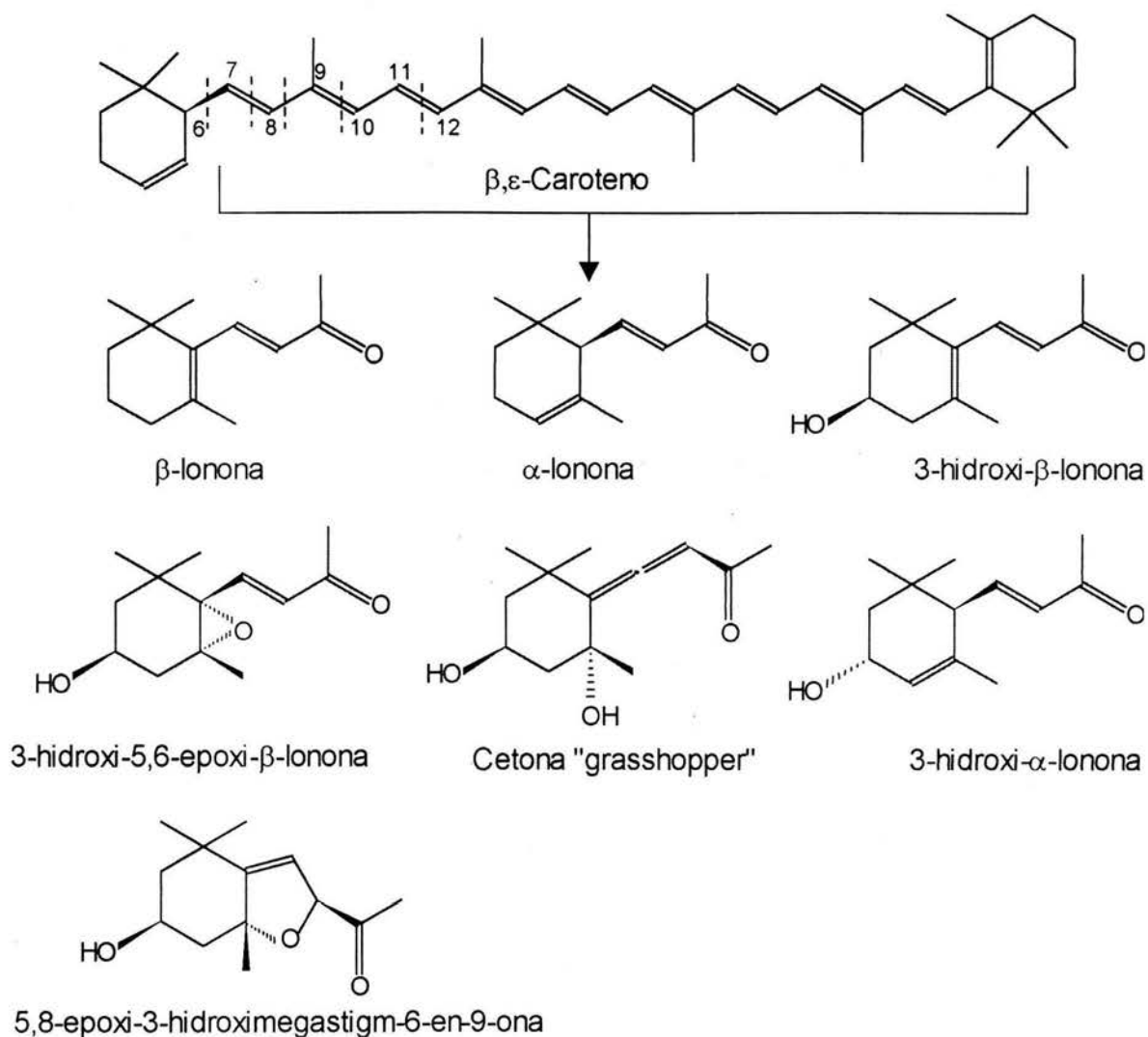


Los principales carotenoides presentes en las hojas verdes del tabaco son, en primer lugar, la luteína, que es el carotenoide más abundante, además de  $\beta,\beta$ -caroteno, neoxantina y violaxantina. Las cantidades absolutas y concentraciones relativas de estos compuestos varían con factores tales como el tipo de tabaco y la posición de la hoja en la planta (Wahlberg, 2002).

Se ha demostrado que los carotenoides sufren una degradación durante el crecimiento de la planta y durante el proceso del curado de las hojas. Así, el tabaco Burley es degradado lentamente durante la senescencia y el curado al aire de las hojas. El nivel de luteína desciende de 1.22 hasta 0.75 mg/ g durante las primeras 4 semanas desde la aparición de las flores hasta el tiempo de la cosecha de las hojas. Un posterior decremento hasta 0.22 mg/ g se observa durante los 90 días que dura el curado al aire. Un proceso similar se observa para los otros carotenoides presentes en la hoja (Burton y Kasperbauer, 1985).

La degradación de los carotenoides viene acompañada por un incremento en el nivel de los apocarotenoides presentes en el tabaco. Esto se demostró por Wahlberg *et al.* (1977). Se analizaron fracciones obtenidas de hojas de tabaco Virginia, verdes, marchitas y recién curadas al aire, además de otras curadas al aire, pero que fueron almacenadas durante 6, 12 y 24 meses. Estas fracciones fueron comparadas entre sí para ver su contenido de componentes volátiles. En conjunto se identificaron 19 carotenoides degradados. La mayoría estaban presentes en las hojas verdes, pero el curado y el añejamiento resultaron en un incremento en las concentraciones hasta los niveles típicamente observados en el tabaco procesado, de ng/ g hasta  $\mu\text{g/ g}$  (Wahlberg *et al.*, 1977).

Los carotenoides presentes en el tabaco podrían dar lugar a los apocarotenoides  $\text{C}_{13}$  presentes en la figura 5 [Fig. 5] (Wahlberg, 2002). Es interesante hacer notar que 3 de ellos,  $\beta$ -ionona, 3-hidroxi- $\beta$ -ionona y 3-hidroxi-5,6-epoxi- $\beta$ -ionona, han sido encontrados de forma abundante en el tabaco.



**Fig. 5: Biogénesis propuesta de productos primarios de degradación en el tabaco a partir del  $\beta$ -caroteno.**

Se ha propuesto que los productos primarios de degradación sufren una transformación posterior que involucra oxidación, reducción, deshidratación y rearrreglos moleculares que conllevan hasta otros productos que tienen una nota más importante dentro del perfil general del aroma del tabaco curado.

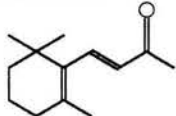
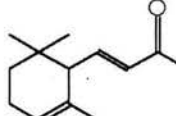
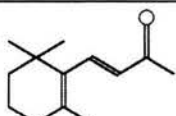
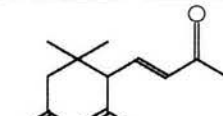
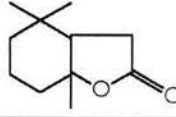
### III. Antecedentes

---

#### 1) Producción microbiana de derivados de la $\beta$ -ionona

Las iononas y sus derivados son intermediarios importantes en el metabolismo de los terpenoides, que poseen un anillo trimetilciclohexano en su estructura. A partir del tabaco curado al aire, se han aislado múltiples compuestos que poseen en su estructura un anillo trimetilciclohexano (Tabla 2). Este tipo de compuestos constituyen elementos de aroma esenciales en muchos aceites vegetales y por esto han atraído la atención de la industria de los sabores y los aromas (Krasnobajew, 1984).

Tabla 2: Ejemplos de derivados de la  $\beta$ -ionona que se encuentran presentes en el tabaco

NOMBRE	ESTRUCTURA	AROMA
$\beta$ -ionona		Madera, violetas, frutal
$\alpha$ -ionona		Madera, tono a violeta
4-oxo- $\beta$ -ionona		Rico en notas dulces
3-oxo- $\alpha$ -ionona		Dulce, floral
Dihidroactinidiolina		Muy ligero y fresco

Los compuestos antes mencionados tienen la característica de poseer umbrales de aroma muy bajos y se ha visto que son componentes clave en los aceites esenciales de los tabacos curados al aire. Por este motivo, se han llevado a cabo múltiples investigaciones con la intención de obtener aromas de tabaco a partir de la transformación ya sea de los carotenoides o de las iononas, que son consideradas intermediarios claves de los carotenoides y se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza (Larroche y Gros, 1997).

Uno de los primeros intentos de llevar a cabo la biotransformación de la  $\beta$ -ionona, se llevó a cabo utilizando células del hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Lo que se logró fue obtener a partir de la oxidación de la  $\beta$ -ionona un aceite esencial presente en el tabaco Burley (Krasnobajew y Helming, 1982). Mientras tanto, en la compañía suiza Givaudan, especializada en aditivos de sabor y aroma, se utilizaron células en reposo de *L. theobromae* ATCC 28570 para la conversión de la  $\beta$ -ionona y se generó una patente en donde indicaban que lograban convertir más de 10 g de  $\beta$ -ionona/ L de medio de cultivo, con una eficiencia del 90%, generando  $\beta$ -ciclohomogeraniol como producto principal (Krasnobajew, 1982). Posteriormente, se empezaron a llevar a cabo estudios en donde se utilizaba a *Aspergillus niger*, ya que se sabe que posee una gran capacidad de hidroxilación sobre terpenos y terpenoides. Cabe mencionar que este microorganismo ha sido ampliamente utilizado para producir los derivados hidroxilados de la  $\beta$ -ionona. En este último caso, los productos principales fueron 4-hidroxi- $\beta$ -ionona, 2-hidroxi- $\beta$ -ionona, 2-oxo- $\beta$ -ionona y 4-oxo- $\beta$ -ionona en orden de cantidades decrecientes [Fig. 6]. La ruta sugerida para esta transformación fue la hidroxilación enantioselectiva en las posiciones 2 ó 4 de la  $\beta$ -ionona, seguida por una posterior oxidación y deshidratación o acetilación (Mikami *et al.*, 1981). Sin embargo, la producción obtenida resultó ser muy pobre.

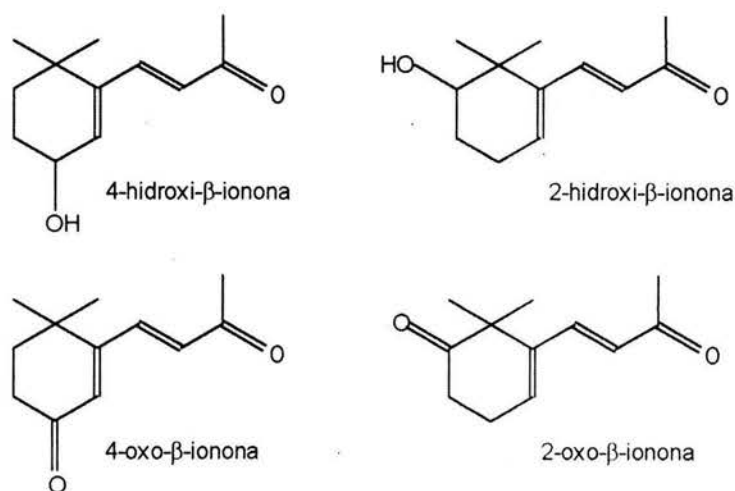


Fig. 6 Productos de biotransformación de  $\beta$ -ionona por *Aspergillus niger*

De un total de más de 1000 microorganismos probados por Mikami *et al.* (1981), las bacterias y las levaduras resultaron ser incapaces de acumular cantidades significativas de productos con aroma y sólo convirtieron una pequeña porción de las iononas. Esta habilidad sólo fue observada en cepas de los hongos *Aspergillus* y *Rhizopus*. Finalmente, utilizando una cepa no comercial de *A. niger* (*Aspergillus niger* JTS 191), lograron aumentar la producción de la 4- y 2-hidroxi- $\beta$ -ionona y de la 4- y 2-oxo- $\beta$ -ionona.

Larroche *et al.* (1995) utilizaron una cepa comercial de *A. niger* (*A. niger* IFO 8541), la cual también acumulaba los mismos productos derivados de la  $\beta$ -ionona. Sin embargo, la concentración tolerada de sustrato era menor 1.5 g/ L. La resistencia de *A. niger* fue incrementada al utilizar micelio atrapado en cubos hidrofóbicos de poliuretano, así como añadiendo un solvente orgánico, en este caso isooctano, al medio de reacción (Sode *et al.*, 1989). Otro trabajo basado en cultivo por lotes, utilizó células inmovilizadas de *A. niger* IFO 8541 inmovilizadas en cuentas de alginato de calcio, lo que permitió aumentar la producción de los derivados oxigenados de la  $\beta$ -ionona en cantidades cercanas a los 4 g/ L (Larroche *et al.*, 1995). Posteriormente, se establecieron modelos matemáticos para explicar la transformación de la  $\beta$ -ionona, que se llevaba a cabo en un sistema bifásico, al ser este compuesto pobremente soluble en agua, obteniendo valores de rendimiento de las reacciones de transformación de la  $\beta$ -ionona, cercanos a la unidad,

aun utilizando el sistema de células inmovilizadas de *A. niger* en alginato de calcio (Grivel *et al.*, 1999; Grivel y Larroche, 2001).

Hasta hace poco tiempo, solamente se habían utilizado hongos para lograr la biotransformación de la  $\beta$ -ionona en sus derivados hidroxilados. Sin embargo se sabe que muchas especies de actinomicetos pueden llevar a cabo un amplio espectro de transformaciones xenobióticas. Se han estudiado múltiples monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 que han sido obtenidas a partir de cepas del género *Streptomyces*, y se ha visto que son capaces de catalizar la hidroxilación de múltiples sustratos, lo que hace que tengan un amplio potencial como biocatalizadores (O'Keefe y Harder, 1991).

Con estos antecedentes, Lutz-Wahl *et al.* (1998), probaron 215 cepas del género *Streptomyces* y seleccionaron algunas por su capacidad de hidroxilar estereoselectivamente la  $\beta$ -ionona a sus respectivos derivados 3- y 4-hidroxi- $\beta$ -ionona. En un medio adicionado con  $\beta$ -ionona como sustrato, 15 cepas mostraron una pequeña conversión de la  $\beta$ -ionona hasta la 4-hidroxi- $\beta$ -ionona y ninguna cepa produjo el derivado 3-hidroxi- $\beta$ -ionona. En este estudio se demostró que estas bacterias, en especial *S. antibioticus* y *S. arenae*, fueron capaces de transformar a la  $\beta$ -ionona en un solo derivado. Y además, que la hidroxilación de la  $\beta$ -ionona en la posición 3 es muy difícil, debido a razones estereoquímicas y de densidad electrónica, por la posición del carbono 3 dentro de la molécula de  $\beta$ -ionona, razón por la cual siempre se obtienen los derivados 2- y 4-hidroxi- $\beta$ -ionona y nunca la 3-hidroxi- $\beta$ -ionona.

## **2) Enzimas involucradas en la transformación de $\beta$ -ionona y otros terpenoides de estructura similar**

Los terpenoides son un grupo de sustancias presentes en casi cualquier alimento natural. Existen entre 15 y 20 mil estructuras reconocidas de estos compuestos. Se distinguen de otros metabolitos secundarios por su origen común de mevalonato e isopentenilpirofosfato y por la naturaleza hidrofílica de sus estructuras. Generalmente son hidrocarburos cíclicos insaturados con diferentes grados de oxigenación en los grupos constituyentes unidos al

esqueleto básico de isopreno. Entre los terpenoides tenemos a los monoterpenos (limoneno, carvona, geraniol), los diterpenos (retinoides) y los tetraterpenos (carotenoides) [Fig. 7]. Están implicados en casi cualquier interacción planta-animal, planta-planta o planta-microorganismo, además de que son consumidos por los humanos en su dieta normal en distintas mezclas y en distintas funciones en el cuerpo (Wagner, 2003). Entre los terpenoides, los monoterpenos juegan un papel importante en la química de las plantas, donde actúan como atrayentes, feromonas sexuales, feromonas de alerta o forman parte de sistemas de defensa contra predadores (van der Werf, 2000).

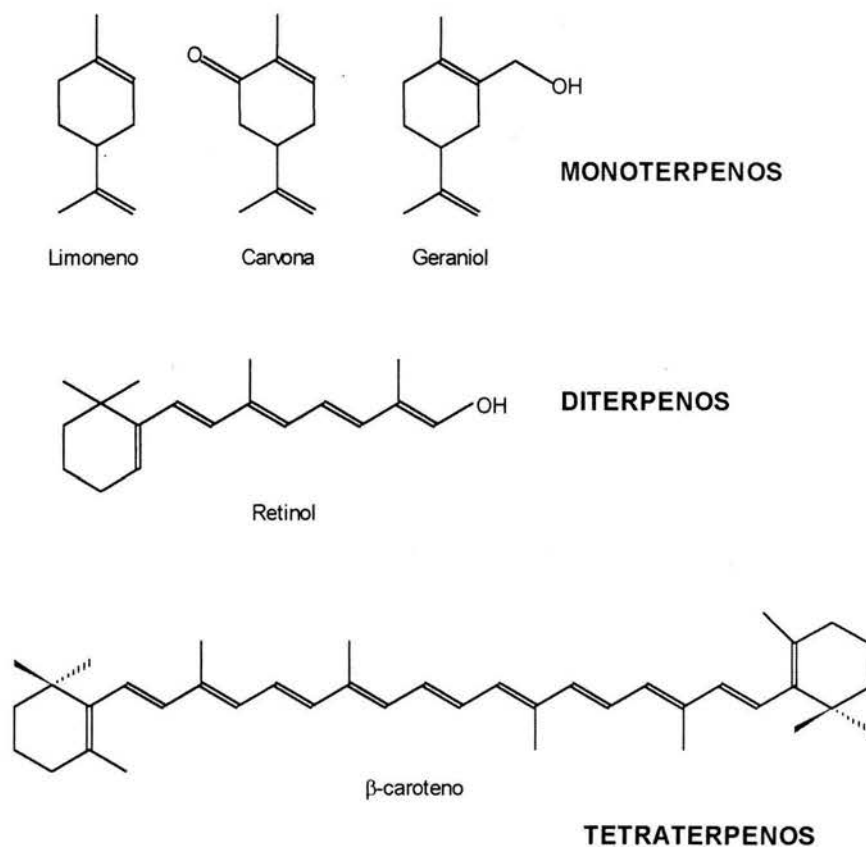
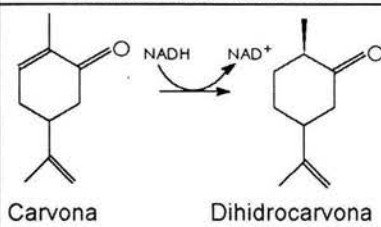
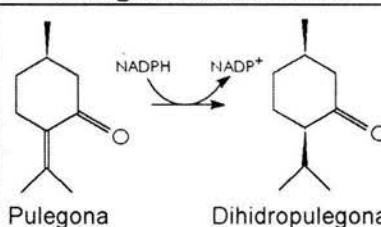


Fig. 7: Ejemplos de la estructura de algunos terpenoides

Los primeros reportes sobre transformación de monoterpenos datan de principios de los años 1980's. Las enona reductasas que reducen cetonas  $\alpha$ - $\beta$  insaturadas a sus correspondientes cetonas saturadas, se encuentran bastante diseminadas en plantas. Hirata *et al.* (1982), observaron que células en suspensión de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*), podían transformar al monoterpenoide carvona en dihidrocarvona y

neodihidrocarveol, aunque no se profundizó en el estudio de la ruta de biotransformación. Tang y Suga (1992) trabajaron con células inmobilizadas de la planta de *N. tabacum*, y observaron que eran capaces de reducir tanto el doble enlace endocíclico como el doble enlace exocíclico adyacente al grupo carbonilo de enonas como la (4R)-(-)-carvona y la (1R)-(+)-pulegona. A partir de este hecho, purificaron a dos enona reductasas denominadas I y II que podían reducir dobles enlaces tanto de la carvona como de la pulegona. Las características de dichas enzimas se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3**  
**Características de las reductasas purificadas a partir de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum***

	<b>REDUCTASA I Carvona Reductasa</b>	<b>REDUCTASA II Pulegona Reductasa</b>
<b>Reacción que cataliza</b>	 <p>Carvona → Dihidrocarvona</p>	 <p>Pulegona → Dihidropulegona</p>
<b>Coenzima requerida</b>	NADH	NADPH
<b>pH óptimo</b>	7.7	6.5
<b>Temperatura óptima</b>	30-35°C	30-35°C
<b>No. de subunidades</b>	4 subunidades idénticas de 22 kDa c/u	2 subunidades de 22 kDa c/u y 2 subunidades de 45 kDa c/u

Posteriormente, al incubar a la  $\beta$ -ionona con las células inmobilizadas de *N. tabacum*, observaron que se lograba la producción de 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol [Fig. 8]. Cuando se llevó a cabo el experimento con  $\alpha$ -ionona, ésta también se transformó en 7,8-dihidro- $\alpha$ -ionona y 7,8-dihidro- $\alpha$ -ionona. Ambas enzimas aisladas anteriormente (carvona reductasa y pulegona reductasa) se pusieron a actuar sobre  $\alpha$ - y  $\beta$ -ionona. Únicamente en presencia de carvona reductasa y NADH se obtuvo un 27% de transformación hasta 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\alpha$ -ionona, según el sustrato de partida (Tang y Suga, 1994).



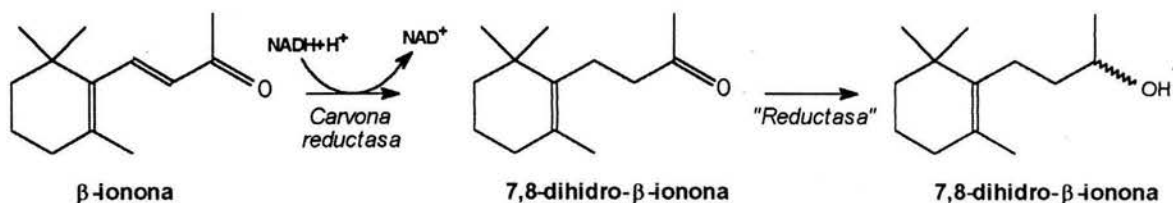


Fig. 8 Productos generados por las células inmobilizadas de *N. tabacum* al actuar sobre  $\beta$ -ionona.

Por otro lado, a partir del alga *Astasia longa*, se aislaron dos reductasas (denominadas también como I y II), las cuales redujeron el doble enlace adyacente al carbonilo de la carvona para dar dihidrocarvona y neodihidrocarveol [Fig. 9]. Se encontró además, que dichas enzimas eran bastante estereoespecíficas, mucho más que las encontradas en la planta del tabaco. Resultaron ser muy similares en cuanto a peso molecular y pH óptimo, y sólo difirieron en el mecanismo de la reacción que catalizan, esto es, en la forma como añaden los hidrógenos a la molécula de carvona para reducir su doble enlace (Shimoda y Hirata, 2000). Existe otro reporte donde también se menciona que el alga *Euglena gracilis* Z, puede reducir estereoespecíficamente el doble enlace C-C de las enonas y posee una enona reductasa, de peso molecular 55 kDa, capaz de reducir el doble enlace endocíclico de la carvona (Noma y Asakawa, 1992).

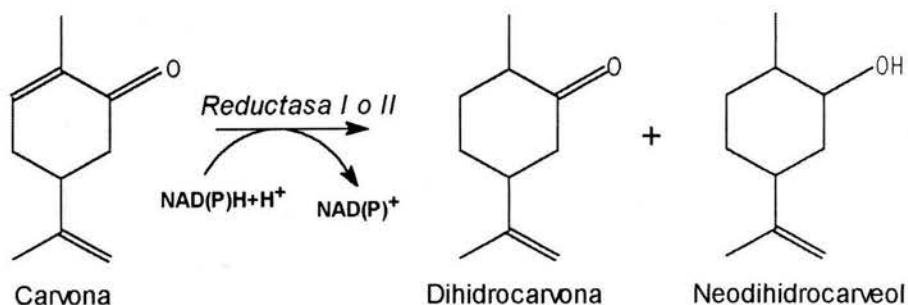


Fig. 9 Biotransformación de carvona por células de *Astasia longa*

Como ya se mencionó anteriormente, los monoterpenoides son compuestos muy importantes para la industria de aromas y sabores, principalmente la carvona y el mentol.

Sus propiedades organolépticas están determinadas por su estereoquímica. Su reducción estereoselectiva puede dar lugar a los monoterpenos deseados, como por ejemplo la reducción de la (-)-mentona da lugar al (-)-mentol.

Se sabe que algunas levaduras, entre ellas *Saccharomyces cerevisiae*, pueden ser capaces de reducir grupos carbonilos, así como dobles enlaces C=C, que no posean un alcohol alílico, un grupo carbonilo u otro sustituyente activador, los cuales raramente son reducidos por microorganismos. van Dyk *et al.*, (1998) probaron varios hongos unicelulares de los géneros *Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Homonema*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Lipomyces*, *Kluyveromyces* y *Trichosporon* para ver si eran capaces de reducir tanto a la (+)- como a la (-)-carvona. Únicamente *Lipomyces starkeyi* no llevó a cabo la reducción de la carvona. Todas las demás levaduras probadas pudieron reducir el doble enlace endocíclico de la carvona, así como el grupo carbonilo de la molécula. En un primer paso, se produjo (+)- o (-)-dihidrocarvona y, posteriormente, este compuesto fue transformado hasta (+)- o (-)-dihidrocarveol según el sustrato de partida ((+)- o (-)-carvona) [Fig. 10]. Por otro lado, al probar otros monoterpenos, se observó que células de *Trichosporon* sp. UOFS Y-2041 y *Homonema* sp. fueron capaces de reducir a la molécula de mentona, y producir mentol. *Homonema* sp. también pudo reducir a la pulegona y producir neomentol (van Dyk, *et al.*, 1998). Cabe mencionar que en este trabajo, no se aislaron las enzimas responsables del proceso de biotransformación.

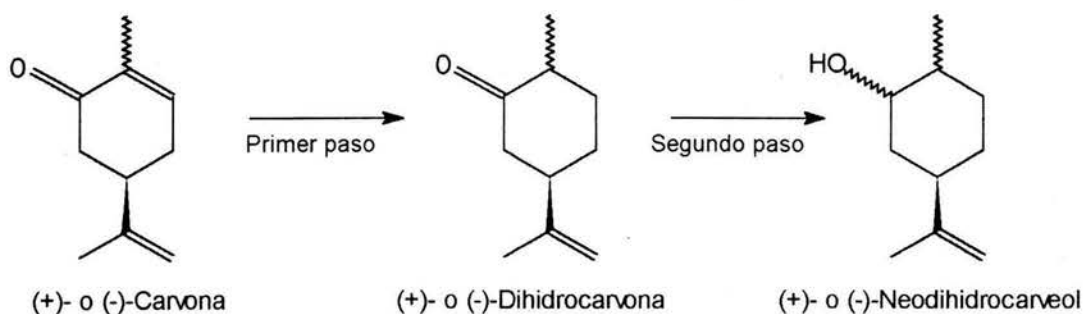


Fig. 10 Productos de biotransformación de carvona, utilizando diferentes cepas de levaduras

También existen reportes en la literatura sobre la biotransformación del limoneno que involucran bacterias, donde se reportan enzimas del tipo de la carvona reductasa encontrada en plantas.

El limoneno es el más abundante de los monoterpenos, el cual es producido por más de 300 plantas y es el responsable del olor a "hierba". Previene la deshidratación de las plantas e inhibe el crecimiento microbiano especialmente de hongos y levaduras (Duetz, 2001). Es un compuesto muy importante en la industria porque es precursor de aromas importantes (sus derivados oxigenados) como el  $\alpha$ -terpineol, alcohol perilílico, carveol, carvona y mentol, motivo por el cual, las rutas de biotransformación de limoneno están muy estudiadas. van der Werf *et al.* (1999), aislaron una cepa de *Rhodococcus erythropolis* a la cual llamaron DCL14, la cual era capaz de crecer en limoneno y no utilizaba la ruta tradicional, para degradar al mismo, por lo que resultó de gran interés. Dicha cepa fue aislada a partir de una muestra de sedimento que fue obtenida de un dique en Holanda, utilizando dihidrocarveol como fuente de carbono y energía. En esta bacteria Gram positiva de alto contenido de G+C, se identificó una actividad de carvona reductasa.

En un trabajo posterior, se estudió más a fondo esta novedosa ruta de biotransformación de limoneno, enfocándose ahora en el papel de la carvona reductasa de *R. erythropolis* (van der Werf *et al.*, 2000). Esta enzima actuaba mejor en anaerobiosis transformando la carvona en dihidrocarvona, resultando ser independiente de NAD(P)H. Por otro lado, se encontró que requería un cofactor que luego de muchas pruebas, resultó no ser NADP(H), FAD, FMN, NAD(P)<sup>+</sup>, ZnSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ni NH<sub>4</sub>Cl, y que, además, al ser dializado el extracto en donde se localizaba la enzima, se perdía. Sin embargo, al añadir la fracción del dializado, la actividad se restablecía. Dicha fracción podía ser sometida a ebullición durante 10 minutos y seguía funcionando adecuadamente, por lo que se descartó la posibilidad de que fuera una proteína, además de que por sí misma, no fue capaz de catalizar la transformación.

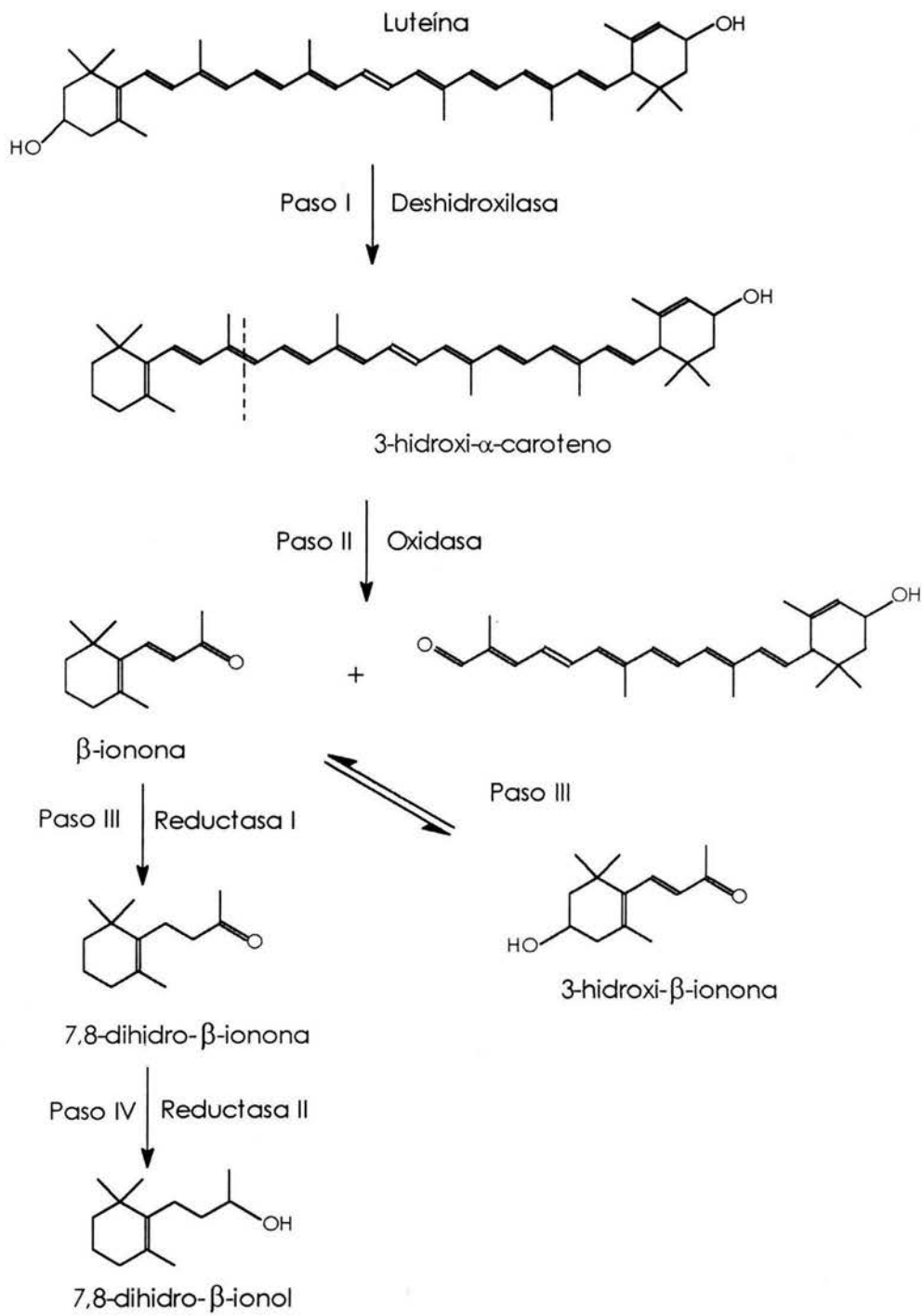
Cabe mencionar que en la literatura no existen reportes de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C que hagan este tipo de transformaciones sobre dobles enlaces de enonas, por lo que el presente trabajo resulta muy interesante.

### 3) Biotransformación de luteína hasta compuestos con aroma presentes en el perfil del aroma a tabaco

En el Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, se aislaron dos microorganismos, una bacteria y una levadura, por su capacidad de crecer en un medio de cultivo adicionado con el oxicarotenoide luteína como fuente de carbono. Ambos microorganismos crecían juntos en una colonia, y, además de ser capaces de degradar a la luteína presente en el medio de cultivo, generaban compuestos que proporcionaban una interesante nota a tabaco (Sánchez-Contreras *et al.*, 2001). Estos microorganismos se aislaron a partir de una muestra de un lodo residual proveniente del proceso del secado de la flor del cempasúchitl para producir un extracto oleo de la flor. Dicho extracto tiene un alto contenido en luteína (~90%) y se emplea como aditivo en alimento para pollos. Al consumirlo, tanto la piel como la yema de sus huevos adquieren un color amarillo brillante, que los hace mucho más atractivos para el consumidor final.

Posteriormente, los microorganismos fueron identificados en el cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el M. en B. Marco Antonio Ortiz. Utilizando técnicas moleculares (gen del rRNA 16S o 5S según fuera el caso) y pruebas bioquímicas, se llegó a la conclusión de que la bacteria en cuestión resultó ser *Paenibacillus amylolyticus*, y la levadura fue identificada como *Trichosporon asahii* (Shida *et al.*, 1997; Sugita *et al.*, 1998).

Actuando en conjunto, estos dos microorganismos fueron capaces de degradar a la luteína, presente en el extracto oleo de flor de cempasúchitl, rompiendo a la luteína en el enlace 9,10, para dar lugar al producto primario de degradación,  $\beta$ -ionona. Este compuesto sufre posteriores transformaciones. Un análisis de los volátiles presentes luego de 96 horas de fermentación, indicó la presencia de 3-hidroxi- $\beta$ -ionona, 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol, en proporciones de 2.9, 3.5 y 84.2% respectivamente. A partir de estos y otros datos, se propuso la siguiente ruta para la bioconversión de la luteína en compuestos con aroma [Fig. 11] (Sánchez-Contreras, *et al.*, 2001).



**Fig. 11 Ruta de biotransformación de luteína en compuestos con aroma a tabaco (Sánchez-Contreras, *et al.*, 2000)**

#### 4) Caracterización del sistema responsable de la transformación de la luteína en compuestos con aroma a tabaco

Una vez que se propuso la ruta metabólica para el proceso de la biotransformación de la luteína, se procedió a estudiar el papel de cada uno de los microorganismos en dicho proceso metabólico.

Partiendo de un medio de cultivo adicionado con luteína como fuente de carbono, se observó que forzosamente se requería de la presencia simultánea de *P. amylolyticus* y *T. asahii* para que se generaran los compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco. Al trabajar con los microorganismos por separado, utilizando el mismo medio de cultivo adicionado con luteína, se observó que ambos microorganismos eran capaces de crecer en dicho medio y además de degradar a la luteína presente en el mismo. Sin embargo, únicamente *T. asahii* fue capaz de generar  $\beta$ -ionona a partir de la luteína (Maldonado-Robledo, *et al.*, 2003). *P. amylolyticus* también puede degradar a la luteína, sin embargo, lo hace de manera inespecífica. Los carotenoides poseen múltiples dobles enlaces en su molécula y cada uno de ellos puede ser atacado por oxidasas inespecíficas. En este caso, *T. asahii* fue el microorganismo que presentó la oxidasa específica para cortar a la molécula en el enlace 9,10 y generar la  $\beta$ -ionona, precursora de los otros compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco.

La  $\beta$ -ionona es un compuesto que resulta tóxico para la mayoría de los microorganismos, especialmente para aquellos que tienen un metabolismo aerobio estricto, como el caso de *T. asahii* (Larroche, *et al.*, 1995). Es una molécula que posee en su estructura dobles enlaces conjugados y esto le da la propiedad de tener una reactividad muy alta. En este caso, la  $\beta$ -ionona es capaz de atrapar electrones de la cadena respiratoria, inhibiendo a la misma y matando de esta forma al microorganismo. *T. asahii* es un microorganismo muy susceptible a la  $\beta$ -ionona. Cuando fue cultivado en el medio con luteína como fuente de carbono, la  $\beta$ -ionona comenzó a acumularse en el medio de cultivo lo que causó la inhibición de su crecimiento.

Posteriormente, se procedió a trabajar con *P. amylolyticus*, para estudiar su capacidad de crecer en un medio adicionado con  $\beta$ -ionona. Se observó que esta bacteria fue capaz de crecer en un medio con una baja concentración de  $\beta$ -ionona (4 mg/ L)

además de transformarla en los otros derivados reducidos presentes en el perfil del aroma a tabaco. (Maldonado-Robledo, *et al.*, 2003)

Entonces, se llegó a la conclusión de que ambos microorganismos crecen juntos en una simbiosis. *T. asahii* es capaz de degradar a la luteína y convertirla en  $\beta$ -ionona; sin embargo, este compuesto le resulta tóxico. Sin embargo, al estar presente *P. amylolyticus*, esta bacteria se encarga de reducir a la  $\beta$ -ionona, lo que hace que pierda sus dobles enlaces conjugados y por ende su capacidad de atrapar electrones de la cadena respiratoria. Esto destoxifica el medio, permitiendo así el crecimiento de *T. asahii* y la producción de los compuestos con aroma (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003).

*Paenibacillus amylolyticus* puede llevar a cabo la reducción de la  $\beta$ -ionona. En extractos proteicos de esta bacteria, se identificó una actividad enzimática de reductasa de  $\beta$ -ionona, la cual resultó ser dependiente de NADPH. Esto fue lo que permitió determinarla espectrofotométricamente al medir la desaparición del NADPH a una longitud de onda de 340 nm en la región UV, que es la longitud a la que absorbe esta coenzima [Fig. 12].

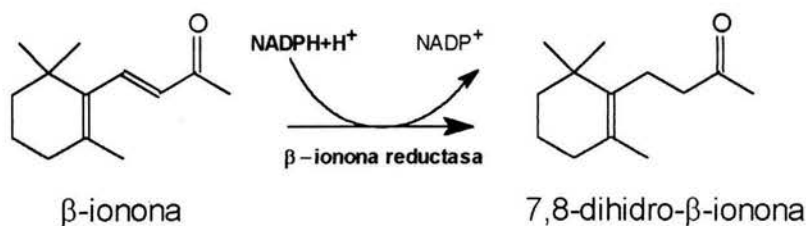


Fig. 12: Reacción catalizada por la  $\beta$ -ionona reductasa



## IV. Justificación

---

La biotransformación de la  $\beta$ -ionona es un proceso que ha sido estudiado en hongos filamentosos, principalmente en cepas de *Aspergillus niger* en donde se ha logrado obtener un buen rendimiento de los derivados 2 y 4 oxo- $\beta$ -ionona y 2 y 4-hidroxi- $\beta$ -ionona. Hasta hace poco se creía que únicamente *A. niger* y algunas cepas de *Rhizopus* y *Lasiodiplodia theobromae*, eran capaces de llevar a cabo este tipo de transformaciones, obteniéndose siempre los mismos productos. Sin embargo, algunas cepas del género *Streptomyces* (bacterias Gram positivas de alto contenido de G+C), pueden llevar a cabo la transformación de la  $\beta$ -ionona en 4-hidroxi- $\beta$ -ionona, solo que con un rendimiento mucho menor.

A pesar de que se han descrito varios sistemas microbianos capaces de transformar a la  $\beta$ -ionona, en ningún trabajo se describe bioquímicamente como es que estas transformaciones se llevan a cabo. Hasta ahora, no se han descrito rutas metabólicas que expliquen la bioconversión de la  $\beta$ -ionona en sus derivados, y mucho menos se han purificado las posibles enzimas que pudieran estar interviniendo en dicho proceso. En este trabajo, se utilizó una cepa de *Paenibacillus amylolyticus*, bacteria Gram positiva de bajo contenido en G+C, que posee toda una maquinaria enzimática que se encarga de la transformación de la  $\beta$ -ionona en sus derivados reducidos 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8 dihidro- $\beta$ -ionol, compuestos que nunca antes se habían reportado en ningún microorganismo. Se purificó y caracterizó a la  $\beta$ -ionona-reductasa de *Paenibacillus amylolyticus* con el fin de comprender más a fondo el proceso bioquímico de obtención de los derivados reducidos de la  $\beta$ -ionona

La actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa de *P. amylolyticus* es muy importante dentro de la ruta de biotransformación de luteína en compuestos con aroma a tabaco. Esto se debe a que, gracias a su presencia, pueden actuar en conjunto dos microorganismos y llevar a cabo el proceso, lo que resulta en una asociación ventajosa, sobre todo para *T. asahii*. En el momento en que *P. amylolyticus* reduce a la  $\beta$ -ionona, ésta deja de ser tóxica para la levadura y puede continuar creciendo. Por otro lado, es importante la purificación de esta enzima, porque se desea saber si reduce el doble enlace carbono-carbono generando 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona o si lo que hace es reducir el grupo carbonilo

hasta un alcohol, produciendo el  $\beta$ -ionol, con lo que tendríamos a la segunda reductasa implicada en la ruta de biotransformación. También, se puede saber si la transformación de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona no es producto de la acción enzimática, sino de las condiciones del medio en el que ésta es producida (es decir, que sea resultado del pH, contenido de oxígeno, luz, etc., que están presentes en el medio de reacción). Además, se quiere saber si *P. amylolyticus* es capaz de crecer en  $\beta$ -ionona como única fuente de carbono y energía, ya que, al ser capaz de transformarla, es probable, que pueda incorporarla en su metabolismo primario. Esto es importante, ya que, hasta el momento, no existen reportes de bacterias Gram positivas de bajo contenido de G+C, que puedan crecer en norisoprenoides con 13 átomos de carbono en su estructura.

## V. Objetivos Generales

---

El objetivo del presente trabajo es el purificar la  $\beta$ -ionona reductasa de *Paenibacillus amylolyticus* para, de esta manera, poder determinar algunas de sus características bioquímicas y conocer de qué manera participa en la biotransformación de la  $\beta$ -ionona. Así mismo, se desea conocer si *P. amylolyticus* puede o no utilizar a la  $\beta$ -ionona como fuente de carbono y energía.

## VI. Objetivos Particulares

---

- Diseñar un esquema de purificación para la  $\beta$ -ionona reductasa
- Obtener los parámetros bioquímicos más relevantes de la enzima pura
- Conocer la participación de la  $\beta$ -ionona reductasa en la ruta de biotransformación de luteína para lo cual se aislará e identificará al(los) producto(s) de la reacción enzimática llevada a cabo.
- Determinar si *P. amylolyticus* puede o no asimilar a la  $\beta$ -ionona como única fuente de carbono y energía.

## VII. Estrategia General

---

1. Cultivar a *P. amylolyticus* en un medio mínimo adecuado para su crecimiento, adicionado con  $\beta$ -ionona.
  - 1.1 Determinar el consumo de  $\beta$ -ionona
2. Aislar e identificar los productos de transformación de la  $\beta$ -ionona
  - 2.1 Determinar la ubicación de la enzima:
  - 2.2 Encontrar el mejor método de ruptura celular
  - 2.3 Determinar si se trata de una enzima membranal, citosólica o extracelular
3. Diseñar un esquema de purificación
4. Caracterizar bioquímicamente a la enzima
  - 4.1 Obtener los parámetros bioquímicos más relevantes (pH y temperatura óptima, peso molecular,  $K_m$ ,  $V_{max}$ , pI)
  - 4.2 Secuenciar el extremo amino y/o el extremo carboxilo terminal
  - 4.3 Comparar las secuencias obtenidas en una base de datos
  - 4.4 Proponer que tipo de enzima se tiene
5. Aislar e identificar el producto de reacción de la enzima utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## VIII. Materiales y Métodos

---

### 1) Microorganismo y condiciones de cultivo utilizadas

*Paenibacillus amylolyticus* cepa BM-B-340 se encuentra preservado en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM-48, México, D.F...

#### 1.1) Conservación de la cepa

Para la preservación de la cepa, se utilizaron placas de agar YTN (Extracto de levadura 1%, triptona 1%, NaCl 3%, glucosa 0.1%, elementos traza 0.1%). Se sembró por extensión al microorganismo y las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h. Después de transcurrido el tiempo de incubación, las cajas se rasparon utilizando un asa bacteriológica, traspasando los microorganismos a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, conteniendo 5 mL de medio YTN + 40% de glicerol. Tras la homogeneización perfecta del medio, éste se distribuyó en tubos para micro centrifuga de 1.5-mL, en alícuotas de 1 mL. Este medio se almacenó en congelación a -70°C.

#### 1.2) Preinóculo e Inóculo

El preinóculo se obtuvo a partir del medio de conservación del cual se tomó una alícuota de 0.1 mL, misma que se sembró por extensión en placas de agar YTN, las cuales se incubaron a 37°C, durante 24-48 h, hasta alcanzar un buen crecimiento.

En el caso del inóculo, se preparó una suspensión basal del microorganismo a partir del preinóculo. Utilizando un asa bacteriológica, se raspó al microorganismo de las placas y el raspado obtenido 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, misma que fue determinada en un espectrofotómetro Spectronic 21-D.

De esta suspensión basal, se sembraron 2 mL en matraces Erlenmeyer de 250-mL con deflectores basales, que contenían 50 mL de medio YTN líquido. Los matraces fueron incubados a una temperatura de 37°C con una agitación de 180 rpm, durante 24 h.

### 1.3) Fermentación y Obtención del extracto libre de células

Transcurridas las 24 h, se adicionó al medio la  $\beta$ -ionona (Sigma ~95% pureza) hasta una concentración de 4 mg/ L, la cual previamente se esterilizó por filtración (en filtros Millipore 0.45  $\mu$ m) y se dejó crecer al cultivo durante 24 h más en las mismas condiciones. Enseguida, las células se separaron del medio por centrifugación (10,000 rpm, 4°C, 15 min) y se lavaron dos veces con solución salina (0.85 p/ v), para luego ser resuspendidas en 10 mL de amortiguador de fosfato de potasio 120 mM, pH 7.2, hasta tener una suspensión homogénea de células. Al amortiguador de fosfatos se le adicionó PMSF 0.1 mM y EDTA 0.1 mM como inhibidores de proteasas. Estos inhibidores se añadieron a la proteína después de cada paso de purificación en la misma concentración. Dicha suspensión se separó en alícuotas de 1 mL, las cuales fueron sometidas a sonicación (Sonicador Vibra Cell, Sonios) durante 15 seg., dando pulsos de 5 segundos de sonicación por 20 de reposo en hielo. Todo el proceso para romper a las células se llevó a cabo en frío. Se separó el extracto intracelular de los restos celulares mediante centrifugación (12,000 x g, 4°C, 15 min).

Por otro lado, se probó la ruptura de las células con una solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 5 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>). El paquete celular obtenido luego de la centrifugación fue resuspendido en 10 mL de la solución de lisis, adicionado con los inhibidores de proteasas antes mencionados. Las células se mezclaron con el amortiguador de lisis mediante agitación vigorosa, hasta tener una suspensión homogénea. Dicha suspensión se separó en alícuotas de 1.5 mL, que fueron incubadas a 4°C, durante 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se separó el extracto intracelular de los restos celulares mediante centrifugación (12,000 x g, 4°C, 15 min).

### 1.4) Determinación de crecimiento en medio mínimo y consumo de $\beta$ -ionona

El crecimiento en medio mínimo se empleó para determinar la inducibilidad de la enzima y si la  $\beta$ -ionona podía ser utilizada por el microorganismo como fuente de carbono. Se utilizó un medio mínimo sugerido para el crecimiento de *Bacillus* sp. (Harwood *et al.*, 1990). El medio mínimo más empleado para propósitos generales es el formulado por

Spizizen, en 1958, universalmente referido como Medio Mínimo de Spizizen (MMS, cuya composición en g /L es de: Sulfato de amonio, 2; Fosfato monobásico de potasio, 6; Fosfato dibásico de potasio, 14; Sulfato de magnesio, 0.2; D-glucosa, 5; Citrato de sodio, 1; L-Triptofano, 0.05) (Spizizen, 1958) con la particularidad que se modificó su composición. Este medio fue modificado, al eliminar de su composición original, el citrato y el L-triptofano. Cuando se utilizó  $\beta$ -ionona en el medio, se eliminó la D-glucosa del medio (fuente de carbono principal), sustituyéndola por  $\beta$ -ionona (0.04 mg/ L), previamente esterilizada en filtros Millipore de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro.

Las células se sembraron en placas de medio YTN, y a partir de estas placas, se preparó una suspensión basal, al igual que cuando se llevó a cabo la fermentación. Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250-mL con deflectores basales, que contenían 50 mL de MMS estéril. Los matraces se incubaron a 37°C, con agitación rotatoria de 180 rpm, durante 98 h, tomando muestras de 1 mL por triplicado cada 12 h. A partir de estas muestras se determinó tanto el crecimiento como el consumo de  $\beta$ -ionona.

El crecimiento se determinó por densidad óptica a 600 nm. Un mL del cultivo se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se separó para cuantificar la  $\beta$ -ionona presente. El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de solución salina isotónica (0.85% p/ v) y centrifugado una vez más para lavar las células. Este sobrenadante fue desechado y el paquete celular resuspendido nuevamente en solución salina isotónica. A esta suspensión se le determinó la D.O. a 600 nm, tomando como referencia, la solución salina isotónica.

Para determinar la  $\beta$ -ionona residual, ésta se extrajo a partir del medio de cultivo libre de células con 1 mL de una mezcla éter etílico anhidro: éter de petróleo (50:50), agitando vigorosamente durante 1 minuto. Posteriormente se sometió a centrifugación a 3000 rpm por 3 minutos para separar las fases. La fase orgánica fue extraída y los disolventes se eliminaron con una corriente suave de nitrógeno. Las muestras fueron analizadas por cromatografía en capa fina en placas de Sílica gel de 20x10 cm 60 F<sub>254</sub>, Merck, las cuales fueron eluidas en una mezcla hexano: ácido acético: acetato de etilo (90:5:5), con un estándar de  $\beta$ -ionona (Sigma, ~95% de pureza). Las placas se analizaron en un densitómetro CAMAG, leyéndolas a 270 nm bajo luz UV. A partir de este análisis se determinó la concentración de  $\beta$ -ionona presente.

Para la determinación de inducibilidad de la enzima, se utilizaron cultivos de *P. amylolyticus* sembrados en matraces con 50 mL de MMS modificado, los cuales se dejaron incubar durante 48 h. Se probaron 3 condiciones, una sin glucosa, pero con  $\beta$ -ionona estéril (0.04 mg/ L), otra con glucosa y  $\beta$ -ionona estéril (0.04 mg/ mL) y otra con glucosa pero sin  $\beta$ -ionona. A partir de estos cultivos, se obtuvieron extractos libres de células como previamente fue descrito y a estos extractos se les determinó la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa como a continuación se describe.

## **2) Determinación del crecimiento y de la cantidad de proteína**

El crecimiento microbiano y la cantidad de proteína se determinaron al medir el contenido de proteína total utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 15,300 x g, 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 10,000 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  $\mu$ L a las cuales se les determinó la cantidad de proteína mediante el método de BCA, utilizando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) de 0, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL. La determinación se hizo por triplicado, leyendo las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm.



### 3) Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa se determinó en el extracto libre de células, midiendo espectrofotométricamente la oxidación del NADPH a una longitud de onda de 340 nm. El sistema de reacción contenía: 675  $\mu$ L de amortiguador de fosfato de potasio 120 mM, pH = 7.2, 25  $\mu$ L de  $\beta$ -ionona 0.04 mM, 25  $\mu$ L del extracto proteico y 12.5  $\mu$ L de NADPH 9.6 mM. La reacción se inició por adición del NADPH y se monitoreó la disminución de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 5 minutos. La actividad (z) de la  $\beta$ -ionona reductasa se calculó según la siguiente ecuación:

$$z = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times d \times v}$$

donde V es el volumen total del ensayo, v es el volumen del extracto enzimático, t el tiempo, A la absorbancia a 340 nm,  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar del NADPH ( $6.3 \text{ L mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y d es la longitud de la celda (1 cm). La actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa fue expresada en unidades, en donde una unidad se definió como  $\mu$ moles de  $\beta$ -ionona transformados por minuto bajo condiciones definidas de temperatura, pH, sistema amortiguador, concentración de sustrato y de cofactor.

### 4) Purificación de la $\beta$ -ionona reductasa

#### 4.1) Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

Partiendo del extracto crudo, se procedió a precipitar las proteínas utilizando sulfato de amonio. Se llevó a cabo una precipitación fraccionada, obteniéndose 3 fracciones: 0-30%, 30-60% y 60-100% de saturación.

Cada fracción se separó por centrifugación (27,200 x g, 4°C, 30 min), recuperando el sobrenadante, para precipitar la siguiente fracción. La proteína obtenida fue resuspendida en 1 mL de agua ultra pura (Milli Q) y sometida a diálisis durante toda una noche en agua desionizada para eliminar el sulfato de amonio. Al otro día, se determinó la cantidad de proteína y la actividad de cada fracción.

#### **4.2) Separación por electroenfoque en columna**

La fracción con mayor actividad se introdujo en una celda preparativa de isoelectroenfoque (Rotofor Cell, Biorad). Luego de la diálisis, la proteína estaba disuelta en aproximadamente 2.3 mL, a los cuales se agregaron 1 mL de glicerol, 1.2 mL de anfolinas (pH 3.5-9.5) y agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 55 mL. Cabe mencionar que estas anfolinas se utilizaron debido a que no se conocía el pI de la proteína, por lo que se trató de cubrir un amplio intervalo de pH. Una vez preparada la muestra, se inyectó en el aparato, y se dejó trabajar a 12 V durante 4 h a 3°C, tiempo después del cual se recolectaron las fracciones a las cuales se les midió pH, cantidad de proteína y actividad de  $\beta$ -ionona reductasa.

Las fracciones con mayor actividad fueron mezcladas, se aforó el volumen hasta 25 mL y fueron sometidas a recirculación en el Rotofor, sin una adición extra de anfolinas. Las condiciones de operación fueron las mismas, sólo que el tiempo de enfoque fue menor, esta vez de aproximadamente 1.5 h. Se colectaron las fracciones y se les determinó el pH, cantidad de proteína y actividad enzimática.

Nuevamente, se mezclaron las fracciones que presentaron mayor actividad, y se sometieron a diálisis, durante toda una noche, contra una solución 1M de NaCl para eliminar las anfolinas. Al día siguiente, las muestras se concentraron por ultra filtración, centrifugando la muestra 14,000 x g mediante un mecanismo de filtros para centrífuga, Microcon YM-3 (Amicon Bioseparations), con un límite de peso molecular de 3000.

#### **4.3) Separación por cromatografía de intercambio iónico en HPLC**

La fracción con mayor actividad fue sometida a separación por HPLC, utilizando una columna Bio-gel TSK SP-5-PW de 75 x 7.5 mm, con matriz de sulfopropilo en un equipo de HPLC (Gold System, Beckman). La columna se equilibró con regulador de fosfato de potasio 120 mM pH =7.0. Para la elución se utilizó un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M en el mismo regulador. La velocidad de flujo se ajustó a 0.7 mL/ min, detectándose las fracciones en un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm.

## 5) Determinación del peso molecular

El peso molecular de la enzima pura de *Paenibacillus amylolyticus* fue determinado por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro MALDI-TOF Omniflex de Brucker Daltonics. El equipo se encontraba acoplado a un equipo de electroforesis capilar. La muestra libre de sales es inyectada en este aparato, para separar cualquier impureza que pudiera tener. Una vez que detecta una señal de proteína que se encuentre por encima de la línea base, se pasa al equipo de masas. Un robot prepara la matriz, que en este caso fue de ácido sináptico y posteriormente es sometida al láser. La matriz tiene como función soportar a la proteína y además protegerla de la desnaturalización por calor. Cuando el pulso de láser incide sobre la muestra, se excita para que se forme un ion. En esta técnica la muestra no se fracciona en varios iones. Este ion pasa por un acelerador eléctrico y entra a la parte del tiempo de vuelo. El tiempo de vuelo se refiere al tiempo que le toma a la muestra pasar desde que se ioniza hasta el detector y depende de su relación carga/ masa. De esta manera se genera una señal, que se asocia con la masa de la proteína, haciendo una deconvolución. El aparato se calibra con proteínas de peso molecular conocido, que se inyectan cada 30 determinaciones. La determinación del peso molecular utilizando esta técnica es muy precisa, con una confiabilidad del 99.9% (Bank y Humena, 2001)

## 6) Análisis de los aminoácidos de los extremos amino- y carboxilo terminal

La secuenciación del extremo amino terminal de la  $\beta$ -ionona reductasa purificada se llevó a cabo en un secuenciador automático acoplado al equipo de masas. El secuenciador lleva a cabo la reacción de degradación de Edman y los fragmentos que van saliendo de la misma, se analizan en el espectrómetro MALDI-TOF. Los espectros de cada uno de los residuos se comparan con diferentes bases de datos para saber de que aminoácido se trata. Esta técnica tiene una confiabilidad del 97%. En este estudio, la secuenciación se comparó con la obtenida con un secuenciador automático convencional, que lleva a cabo la degradación de Edman como normalmente se hace. Ambos resultados de la secuencia se comparan, lo cual se hace con el objeto de validar la técnica de secuenciación utilizando el espectrómetro MALDI-TOF.

## **7) Determinación del pH de máxima actividad y de estabilidad a diferentes reguladores de pH**

El pH de máxima actividad fue determinado a 25°C, utilizando amortiguador de citratos 120 mM para el pH de 5.0, amortiguador de fosfato de potasio 120 mM para los valores de pH de 6.0, 7.0, 7.2, 7.6, 7.8, 8.0, amortiguador Tris-HCl 120 mM para los valores de pH de 7.0, 7.2, 8.0, 8.5 y 9.0 y amortiguador de boratos 120 mM para los valores de pH de 8.0 y 9.0.

La determinación del pH de máxima actividad se llevó a cabo cambiando el amortiguador de reacción según el pH al cual se quisiera medir la actividad. La estabilidad a diferentes reguladores de pH se llevó a cabo utilizando diferentes sistemas reguladores para un mismo valor de pH, como es el caso de pH 7.0 en donde la reacción se llevó a cabo tanto con amortiguador de fosfato de potasio como con amortiguador de Tris-HCl, esto para ver si algún componente del sistema regulador no afectaba la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa.

## **8) Determinación de la temperatura de máxima actividad**

La temperatura de máxima actividad fue determinada llevando a cabo la reacción enzimática a diferentes temperaturas en un intervalo entre 10 y 55°C, en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu U-160. La temperatura se mantuvo constante en el espectrofotómetro utilizando un baño de agua regulador de la temperatura. Las reacciones fueron realizadas a pH de 7.2 (pH al que se encontró la máxima actividad), utilizando amortiguador de fosfato de potasio 120 mM, e incubadas durante 2 minutos a la temperatura de reacción. La reacción se inició con la adición del NADPH. El avance de la reacción se determinó a una longitud de onda de 340 nm, en una celda de cuarzo con capacidad de 750- $\mu$ L y se monitoreó durante 1 minuto, tomando lecturas de la disminución de la absorbancia cada 15 segundos.

## 9) Determinación del punto isoelectrónico

El punto isoelectrónico de la  $\beta$ -ionona reductasa se determinó con el equipo Phastsystem (Pharmacia), utilizando geles de isoelectroenfoque con un gradiente de pH de 3-9. Se cargaron 3.4  $\mu$ L de muestra. El gel se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente se analizó por densitometría en un equipo GS-690 Imaging Densitometer (Biorad).

## 10) Estudios cinéticos

La reducción del NADPH se cuantificó a 340 nm a 40°C (temperatura donde se encontró la máxima actividad) utilizando un espectrofotómetro Shimadzu con temperatura controlada por medio de un baño de agua. La actividad se determinó variando las concentraciones de  $\beta$ -ionona desde 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 mM. Para determinar los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  para la  $\beta$ -ionona, los datos se ajustaron a la ecuación de Lineweaver y Burk, en donde la ecuación de Michaelis-Menten se reorganiza de forma lineal.

## 11) Determinación del producto de reacción

Se llevó a cabo la reacción enzimática en un matraz Erlenmeyer de 10-mL. Se utilizó el extracto obtenido luego de la recirculación en el Rotofor. Se reescaló la reacción *in vitro*, a un volumen de 5 mL, utilizando las mismas concentraciones de reactivos que en la reacción en la celda de cuarzo. La reacción se inició por adición del NADPH. Los ingredientes se agitaron vigorosamente para permitir la formación de una emulsión y el matraz de reacción se cubrió con papel aluminio y parafilm, para proteger de la luz y el aire. Se incubó a temperatura ambiente con agitación rotatoria de 40 rpm. Los tiempos de incubación fueron de 5 ó 45 minutos, según fuera el caso. En el caso de la extracción inmediata, la reacción se realizó en un tubo de ensayo con tapón de rosca, con capacidad de 20-mL y la extracción de los productos se llevó a cabo inmediatamente después de mezclar los reactivos. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la extracción de los productos, para lo cual se utilizó una mezcla de extracción éter etílico: éter de

petróleo (50:50). La extracción se realizó en un tubo de ensaye con tapón de rosca con un volumen de 25 mL. Se recuperó la fase orgánica y la mezcla de solventes se eliminó utilizando una corriente suave de nitrógeno. El producto extraído resultó ser líquido y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con la base de datos del equipo para obtener la estructura.

## 12) Purificación de la 7,8 dihidro- $\beta$ -ionona

Uno de los compuestos obtenidos de la reacción de identificación de los productos fue identificado como 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, la cual fue necesario purificar para llevar a cabo otras reacciones. Para lograr lo anterior, la separación se llevó a cabo en una cromatoplaca preparativa de 20 x 20 cm de sílica gel de 6.02 mm de espesor (Merck). Aproximadamente 1 mL de la mezcla de productos se cargó en la cromatoplaca, misma que se eluyó con una mezcla hexano: ácido acético: acetato de etilo (90:5:5), hasta un cm del final. Los extremos de la placa fueron revelados por aspersion con revelador de sulfato cérico y calor. La 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona se identificó por ser el producto más abundante, y se procedió a raspar el segmento de sílica correspondiente. La sílica gel conteniendo a la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, se sometió a extracción con 250 mL de la mezcla de éter etílico: éter de petróleo, en un vaso de precipitados de 500-mL con agitación magnética vigorosa, durante 15 minutos. Posteriormente, se transfirió la mezcla a un matraz bola de 500-mL y se eliminó la mezcla de solventes utilizando un rotavapor, con agua a 40°C y rotación moderada para evitar la descomposición del producto.

La muestra líquida obtenida se sometió a separación en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 serie II), equipado con una columna capilar de 30m Carbowax 20M, a 50°C por 5 min, utilizando un programa de temperaturas de 4°C/ min durante 25 min. Los compuestos separados mediante esta técnica se identificaron por espectrometría de masas en un equipo acoplado (Hewlett Packard modelo 5945A), utilizando la técnica de impacto electrónico (EI<sup>+</sup>) y se compararon con estándares contenidos en la base de datos de espectros de masas del NIST/ EPA/ NIH (1998).



## IX. Resultados

### 1) Ruptura del microorganismo

Se compararon dos métodos de desintegración celular: por sonicación de las células y por desintegración utilizando una solución amortiguadora de lisis. Se determinó la cantidad de proteína liberada en ambos casos, así como la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa. Se monitoreó la ruptura de las células observando una preparación fresca teñida con safranina, en el microscopio óptico, para asegurar que los métodos de ruptura estuvieran funcionando adecuadamente. Luego de 60 seg. no se observaron más células enteras al microscopio, por lo que puede pensarse que se han roto todas las células. La proteína que se liberó cuando el paquete celular se incubó con la solución de lisis fue mayor a la que se obtuvo mediante la sonicación [Fig. 13 A y B]. Sin embargo, cabe mencionar que esto se debió a que el regulador de lisis disuelve la pared y la membrana celular de la bacteria, por lo que también se extrajeron las proteínas membranales (Rosenberg, 1996).

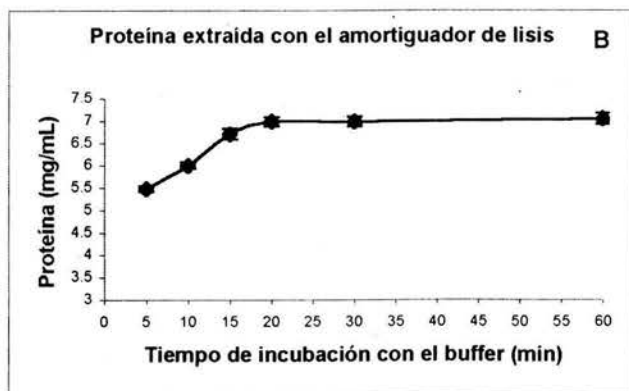
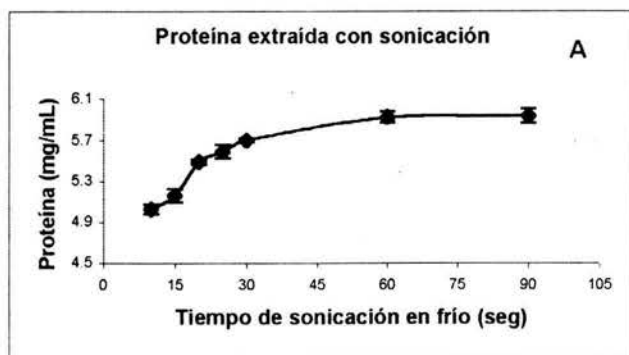


Fig. 13 Cantidad de proteína liberada luego de someter al paquete celular a sonicación (A) o a incubación en solución de lisis (B). La cantidad de proteína se determinó mediante la técnica de BCA.



En cuanto a la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa, se obtuvo la máxima actividad cuando se sonicó el paquete celular durante 15 seg [Fig. 14]. . Esto podría deberse a que se afectó a la enzima debido al aumento de temperatura generado por el proceso de sonicación, a pesar de que éste se llevó a cabo en frío. En el control sin sustrato, no se observó actividad, lo que sugiere que la enzima es inducible. Cuando se utilizó la solución de lisis como método de ruptura, la mayor cantidad de proteína se obtuvo al incubar las células durante 20 minutos [Fig. 15]. La actividad volumétrica resultó ser 1.3 veces mayor al utilizar la solución de lisis para romper a las células; sin embargo, la actividad específica casi no presentó diferencias, por lo que se prefirió la sonicación como método de ruptura, ya que es un método mucho más rápido y no involucra la adición de ningún componente extra (sales, detergentes), que pudieran afectar algún paso posterior de la purificación, sobre todo la separación por cromatografía en columna.

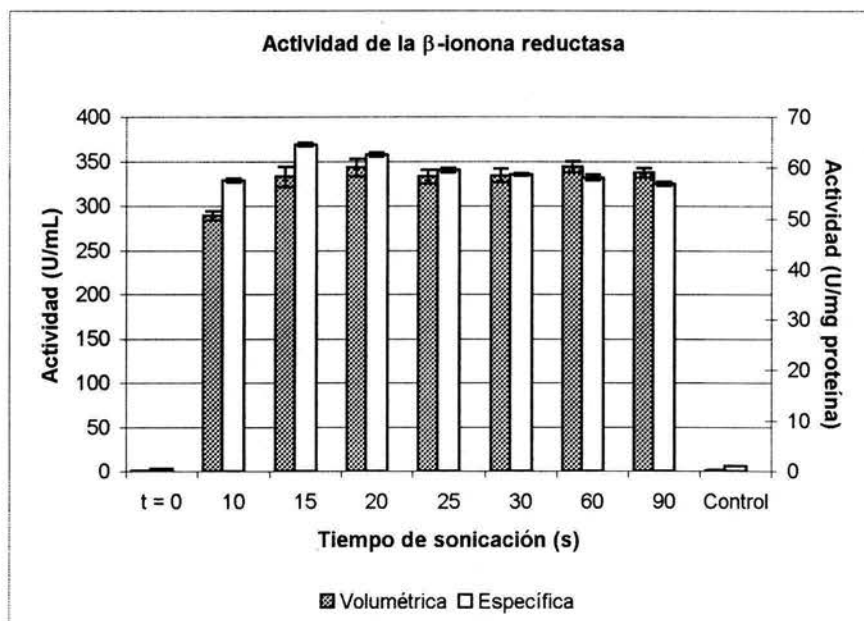


Fig. 14 Actividad de  $\beta$ -ionona reductasa encontrada en el extracto intracelular de células rotas utilizando sonicación. El control se refiere a un medio sin sustrato.

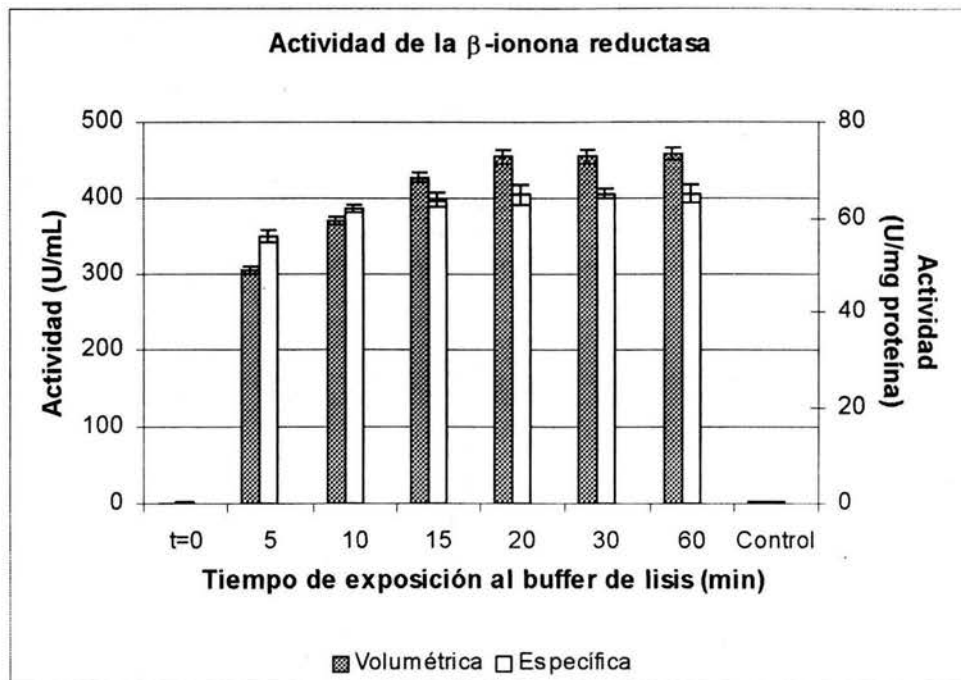


Fig. 15 Actividad de  $\beta$ -ionona reductasa en células sometidas a ruptura utilizando solución de lisis. La condición control se refiere a un medio sin sustrato.

## 2) Ubicación de la enzima dentro de la célula

Para determinar la ubicación de la  $\beta$ -ionona reductasa, se llevó a cabo lo siguiente: el paquete celular obtenido listo para ser sometido a ruptura, fue sonificado durante 15 segundos liberando de esta forma la proteína intracelular (pero no las proteínas de membrana). Los restos celulares obtenidos mediante centrifugación, fueron posteriormente tratados con la solución de lisis durante 20 min, extrayendo con esto las proteínas de la fracción membranal y rompiendo las células que no se rompieron con la sonicación [Fig. 16]. A los extractos proteicos obtenidos, se les determinó la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa, y se encontró que la mayor cantidad de la actividad estaba en el extracto intracelular (83%), por lo que se sugiere que la  $\beta$ -ionona reductasa es una enzima citosólica [Fig. 16].

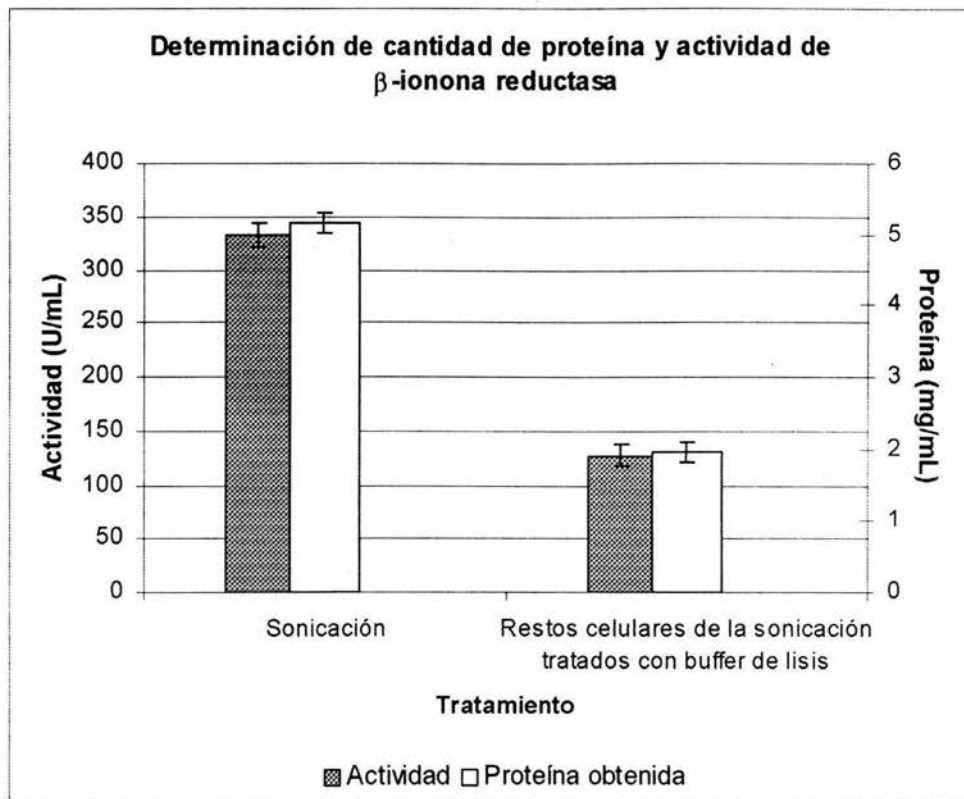


Fig. 16 Determinación de la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa y de la cantidad de proteína obtenida en el extracto citosólico obtenido por sonicación, y en la fracción membranal obtenida por incubación con solución de lisis, de los restos celulares obtenidos después de ser sometidas las células a sonicación

### 3) Crecimiento de *Paenibacillus amylolyticus* en MMS adicionado con $\beta$ -ionona como única fuente de carbono y energía

Podemos observar que *Paenibacillus amylolyticus* pudo crecer cuando fue cultivado en un medio mínimo, en este caso el MMS modificado, con D-glucosa como fuente de carbono y energía. Por otro lado, al utilizar el mismo medio mínimo y sustituir la fuente de carbono por  $\beta$ -ionona, el microorganismo no fue capaz de crecer, al contrario, las células comenzaron a sufrir lisis, lo que se muestra como una disminución en la D.O. medida a 600 nm [Fig. 17]. Sin embargo, al utilizar el MMS modificado, con D-glucosa y adicionado con  $\beta$ -ionona, el crecimiento fue similar.

En cuanto a la  $\beta$ -ionona presente en el medio de cultivo, se monitoreó su desaparición [Fig. 18]. Como puede verse, la cantidad de  $\beta$ -ionona en el medio permanece prácticamente constante, al igual que en el control de medio sin inóculo, por lo

que no está siendo consumida. Por otro lado, cuando se utilizó medio mínimo adicionado con D-glucosa y además con  $\beta$ -ionona, ésta sí fue transformada por el microorganismo, por lo que consume la glucosa, y además transforma a la  $\beta$ -ionona, pero no la utiliza para crecer.

Al ser determinada la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa en los extractos obtenidos a partir de las células de *P. amylolyticus* cultivadas en las diferentes condiciones en el MMS modificado, se observa que es necesaria la presencia de la  $\beta$ -ionona en el medio de cultivo para que se presente la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa [Fig. 19]. En el caso del medio en el cual se eliminó la glucosa y se añadió  $\beta$ -ionona, encontramos que *P. amylolyticus* no crece, sino más bien muere y las células que permanecen en el medio, no presentan actividad alguna de  $\beta$ -ionona reductasa. Cuando el medio tiene glucosa, sin  $\beta$ -ionona, *P. amylolyticus* puede crecer muy bien, pero en las células no puede encontrarse actividad de  $\beta$ -ionona reductasa.

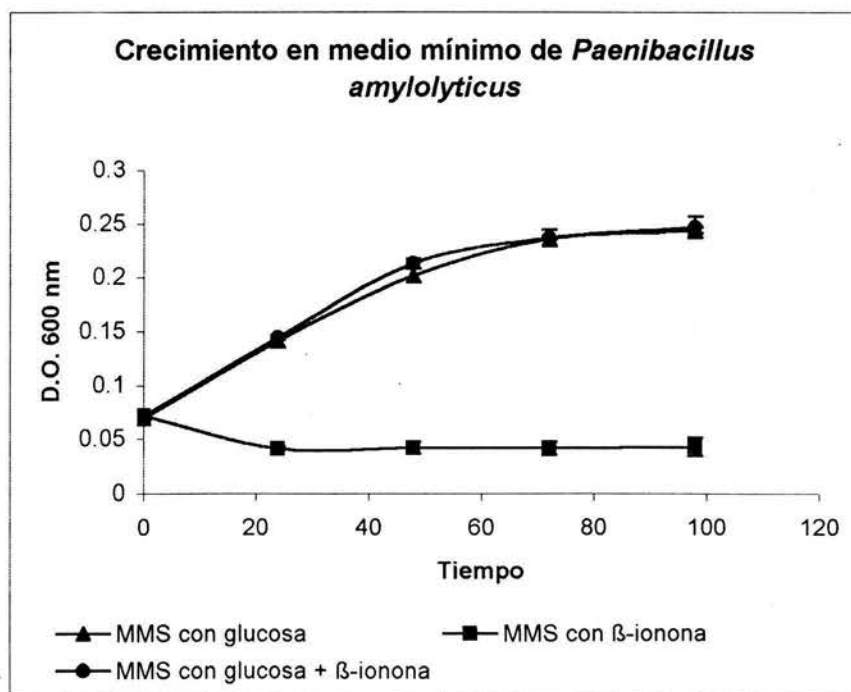


Fig. 17 Crecimiento de *Paenibacillus amylolyticus* en Medio Mínimo de Spizizen modificado, MMS modificado +  $\beta$ -ionona y MMS modificado sin glucosa +  $\beta$ -ionona. La determinación de crecimiento se llevó a cabo por espectrofotometría.

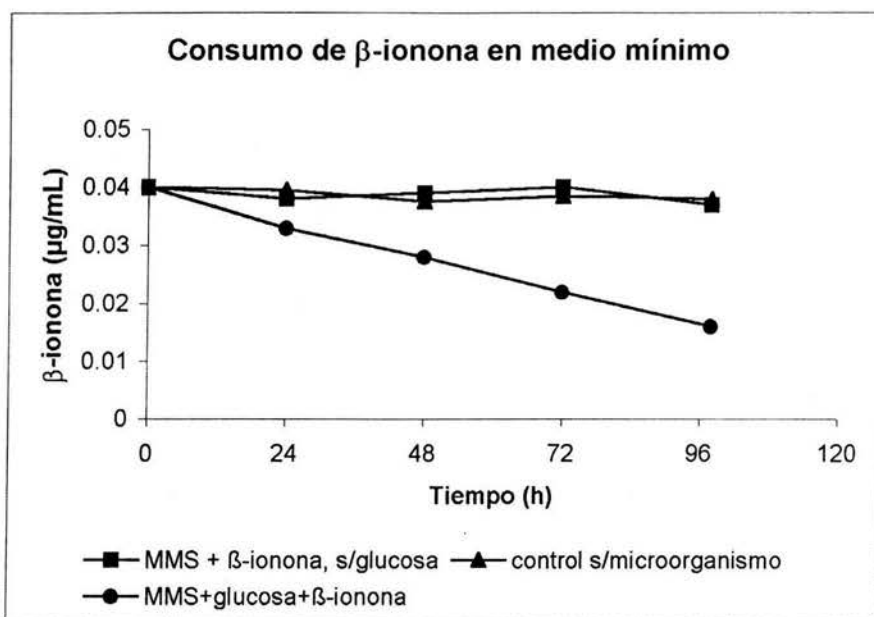


Fig. 18 Consumo de  $\beta$ -ionona por *P. amylolyticus* cultivado en las tres condiciones antes mencionadas del Medio Mínimo de Spizizen modificado. La determinación de la cantidad de  $\beta$ -ionona se llevó a cabo por cromatografía en capa fina. Se utilizó un control sin inóculo para monitorear el estado de la  $\beta$ -ionona debido a las condiciones de incubación.

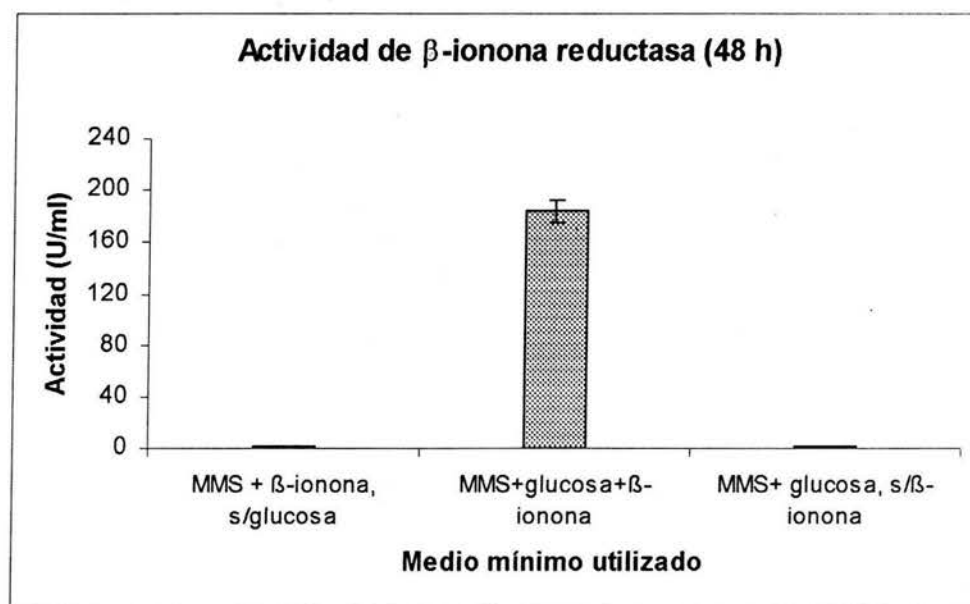


Fig. 19 Actividad de  $\beta$ -ionona reductasa encontrada al cultivar a *P. amylolyticus* en MMS modificado. En el primer caso, se añadió  $\beta$ -ionona y se eliminó la glucosa del medio. En el segundo caso al MMS modificado se le añadió  $\beta$ -ionona y en el tercer caso, solamente se utilizó el MMS modificado. Las determinaciones se llevaron a cabo después de dejar crecer al microorganismo durante 48 h, a 37°C, con agitación rotatoria de 180 rpm.

#### 4) Purificación de la $\beta$ -ionona reductasa

##### 4.1) Precipitación fraccionada con sulfato de amonio

La precipitación fraccionada con sulfato de amonio se llevó a cabo como se menciona en el capítulo de metodologías. La mayor cantidad de proteína se obtuvo en la fracción que precipitó entre el 30 y el 60% de saturación con sulfato de amonio, como puede verse en la Fig. 20. También se determinó la cantidad de proteína total del extracto intracelular antes de ser sometido a precipitación. Si se suma la cantidad de proteína obtenida en cada fracción, se obtiene la proteína total de partida, lo que indica que se ha precipitado toda la proteína existente en dicho extracto. En cuanto a la fracción que presentó mayor actividad de  $\beta$ -ionona reductasa, ésta resultó ser la que precipitó entre 60 y 100% de saturación con sulfato de amonio [Fig. 21]. Esta fracción se sometió a diálisis para eliminar la sal y proceder con los pasos de purificación.

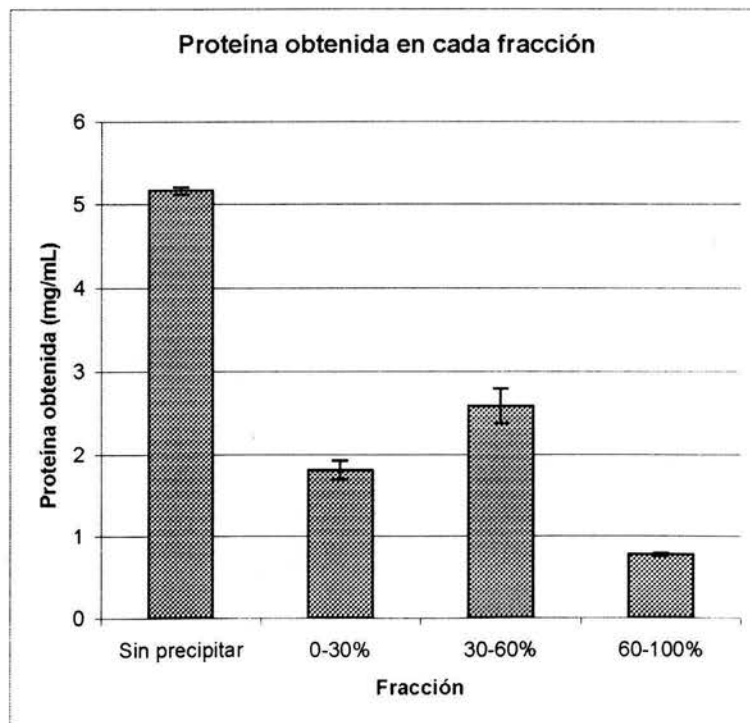


Fig. 20 Precipitación fraccionada del extracto proteico intracelular.

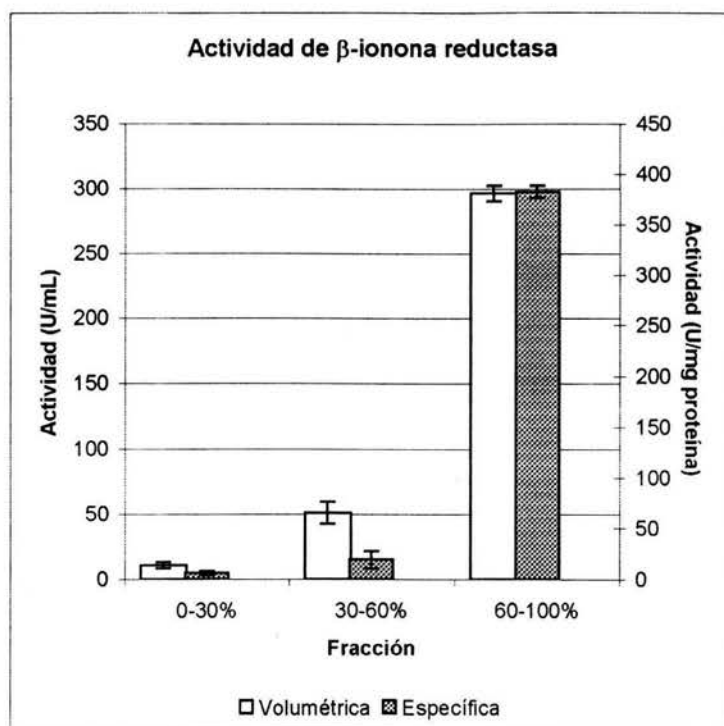


Fig. 21 Actividad de  $\beta$ -ionona reductasa contenida en cada una de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

#### 4.2) Separación por electroenfoque en columna

La fracción que presentó mayor actividad fue sometida a separación por enfoque isoeléctrico en la celda Rotofor (Biorad). Se midió el pH de las fracciones obtenidas luego de 4 horas, observándose que se formó un gradiente de pH [Fig. 22]. Cabe mencionar que algunas fracciones no se obtuvieron debido a que el vacío aplicado para recuperar las muestras no era uniforme, y algunas fracciones se mezclaron; sin embargo, la separación fue buena. En la figura 23 puede observarse la cantidad de proteína obtenida en cada fracción separada, siendo la fracción 4 la que tenía la mayor cantidad de proteína. Coincidentemente, esta fracción resultó poseer la mayor actividad [Fig. 24]. Las fracciones con mayor actividad presentaban un valor de pH en el intervalo entre 3.1 y 5.2, por lo que el pI de la  $\beta$ -ionona reductasa debe encontrarse dentro de estos valores de pH.



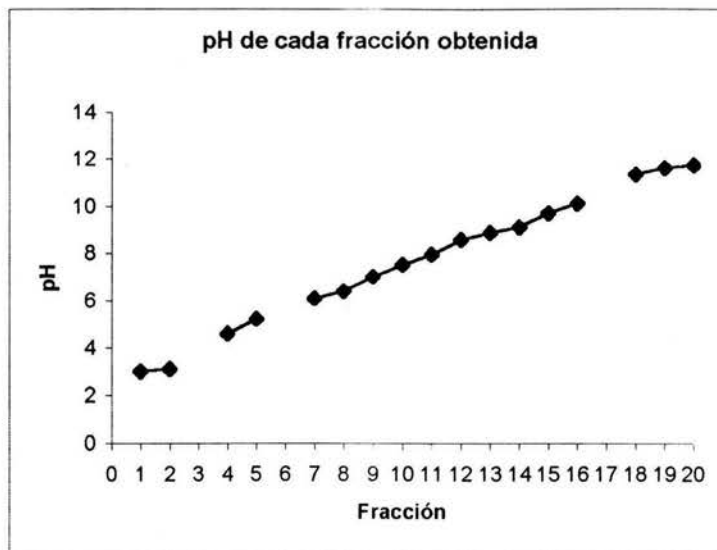


Fig. 22 Gradiente de pH formado luego de someter a isoelectroenfoque la fracción del extracto intracelular que precipitó entre el 60 y el 100% de saturación con sulfato de amonio.

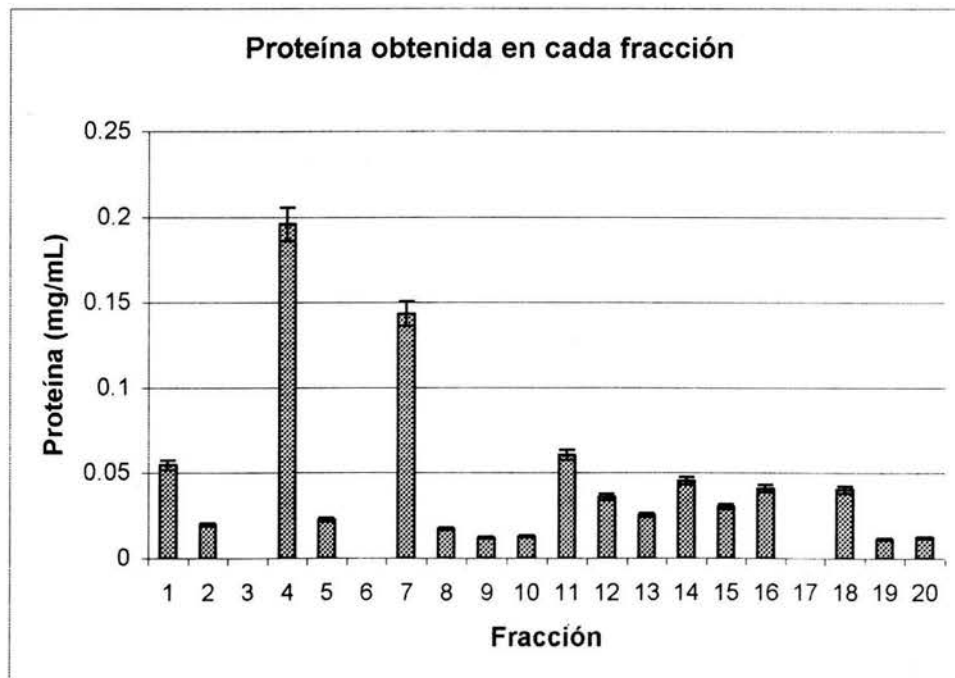


Fig. 23 Cantidad de proteína obtenida en cada una de las fracciones recuperadas luego de la separación por electroenfoque en columna.

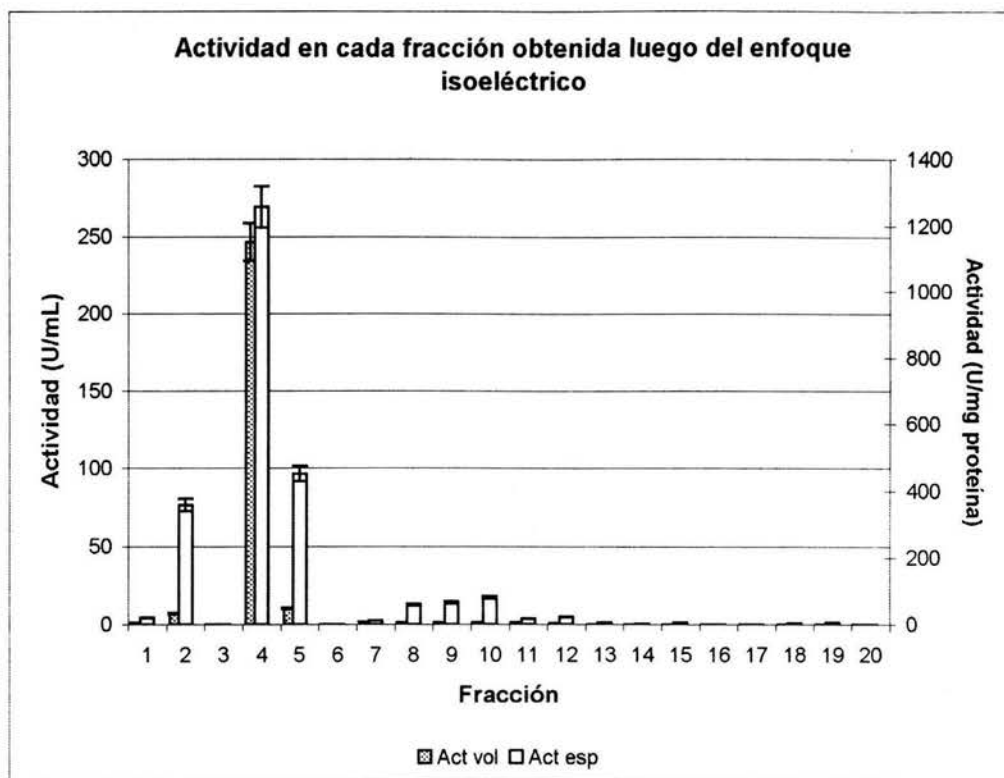


Fig. 24 Actividad de  $\beta$ -ionona reductasa encontrada en cada una de las fracciones obtenidas luego del electroenfoque en columna.

Las fracciones con mayor reductasa fueron mezcladas y sometidas a recirculación en el Rotofor, con el fin de obtener una mayor separación. De nueva cuenta, se formó un gradiente de pH, como lo muestra la figura 25. La fracción con mayor cantidad de proteína y mayor reductasa de  $\beta$ -ionona reductasa resultó ser la fracción 4, con un pH de 3.95 [Figs. 26 y 27]. Como la reductasa de las otras fracciones es muy pobre, se considera que el pl de la  $\beta$ -ionona reductasa está ubicado en un pH reductasa de 3.95, lo que reductasa lo que posteriormente se corroboró mediante un gel de enfoque isoeléctrico.

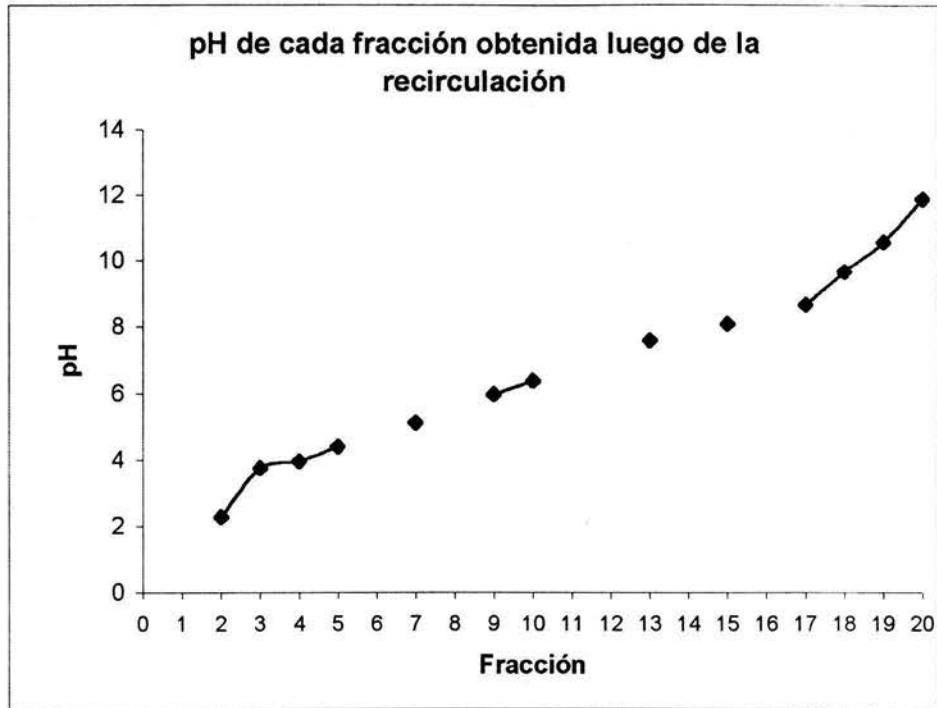


Fig. 25 Gradiente de pH obtenido luego de la recirculación en la celda de isoelectroenfoque Rotofor de las fracciones con mayor reductasa de  $\beta$ -ionona reductasa.

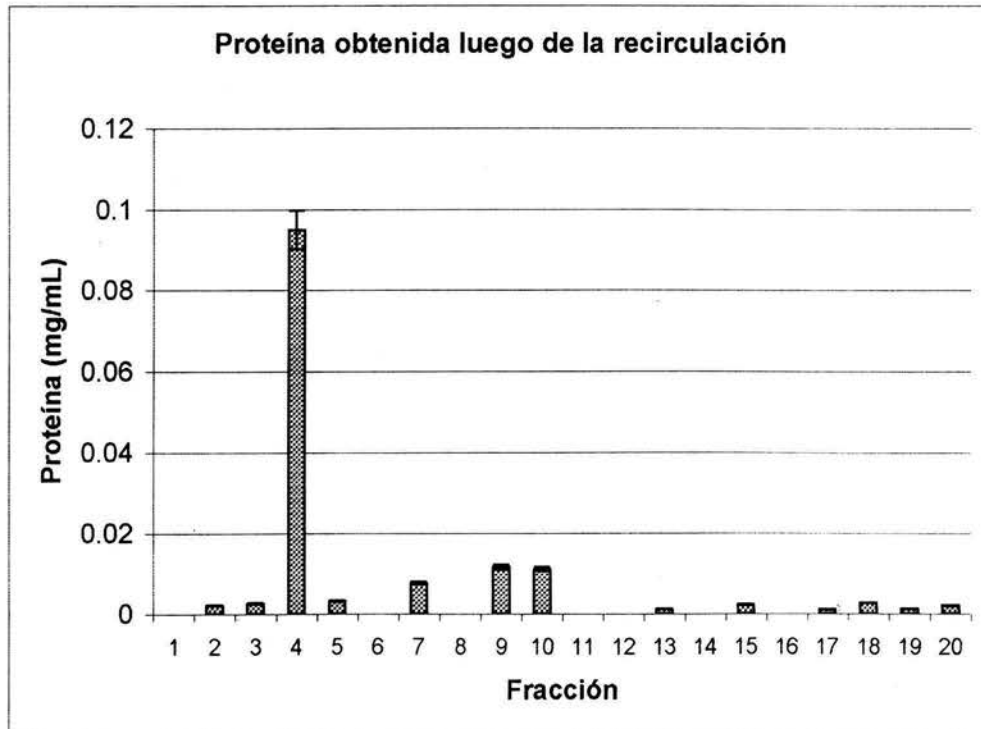


Fig. 26 Determinación de la cantidad de proteína obtenida en cada fracción luego de la recirculación en la celda Rotofor

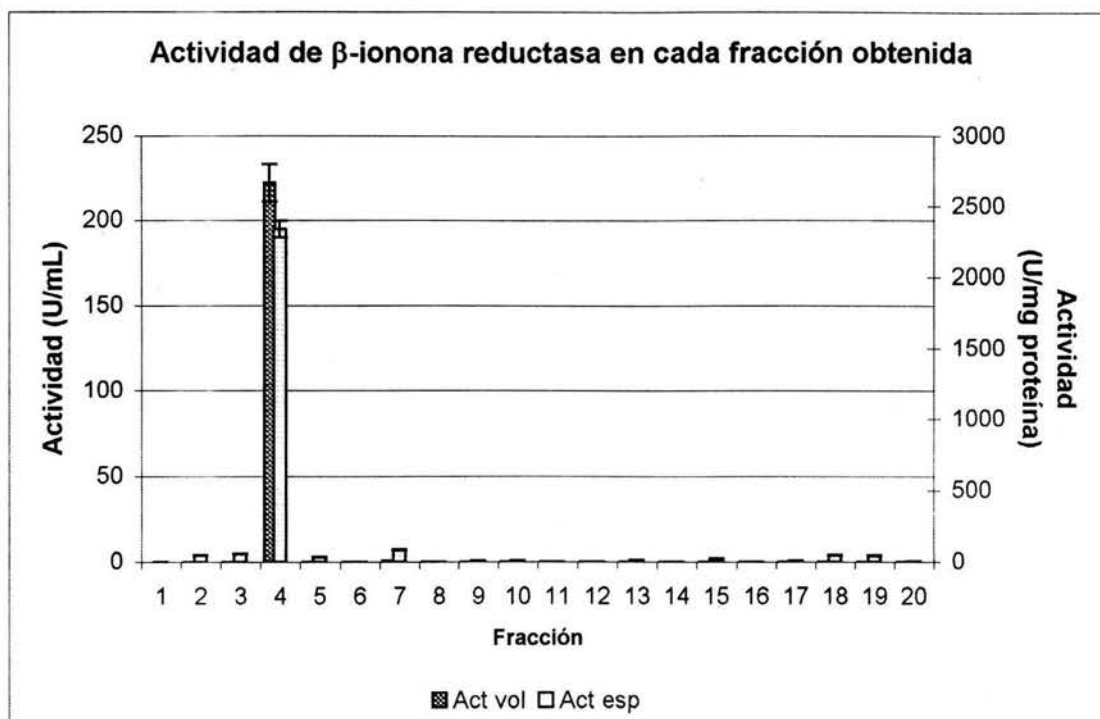


Fig. 27 Actividad de β-ionona reductasa en las fracciones obtenidas luego de la recirculación en la celda Rotofor.

#### 4.3) Separación por Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia (HPLC), utilizando una columna de intercambio catiónico

Luego de eliminar las anfolinas por diálisis, y de concentrar la muestra, ésta se sometió a separación por HPLC en una columna de sulfopropilo. Se utilizó regulador de fosfatos pH =7 para llevar a cabo la elución. Como el pI de la β-ionona reductasa está cercano a 4, al utilizar un regulador pH =7, la proteína estará cargada negativamente, igual que la columna (intercambio catiónico), por lo que no se va a retener y se espera que eluya en los primeros tiempos. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 28.

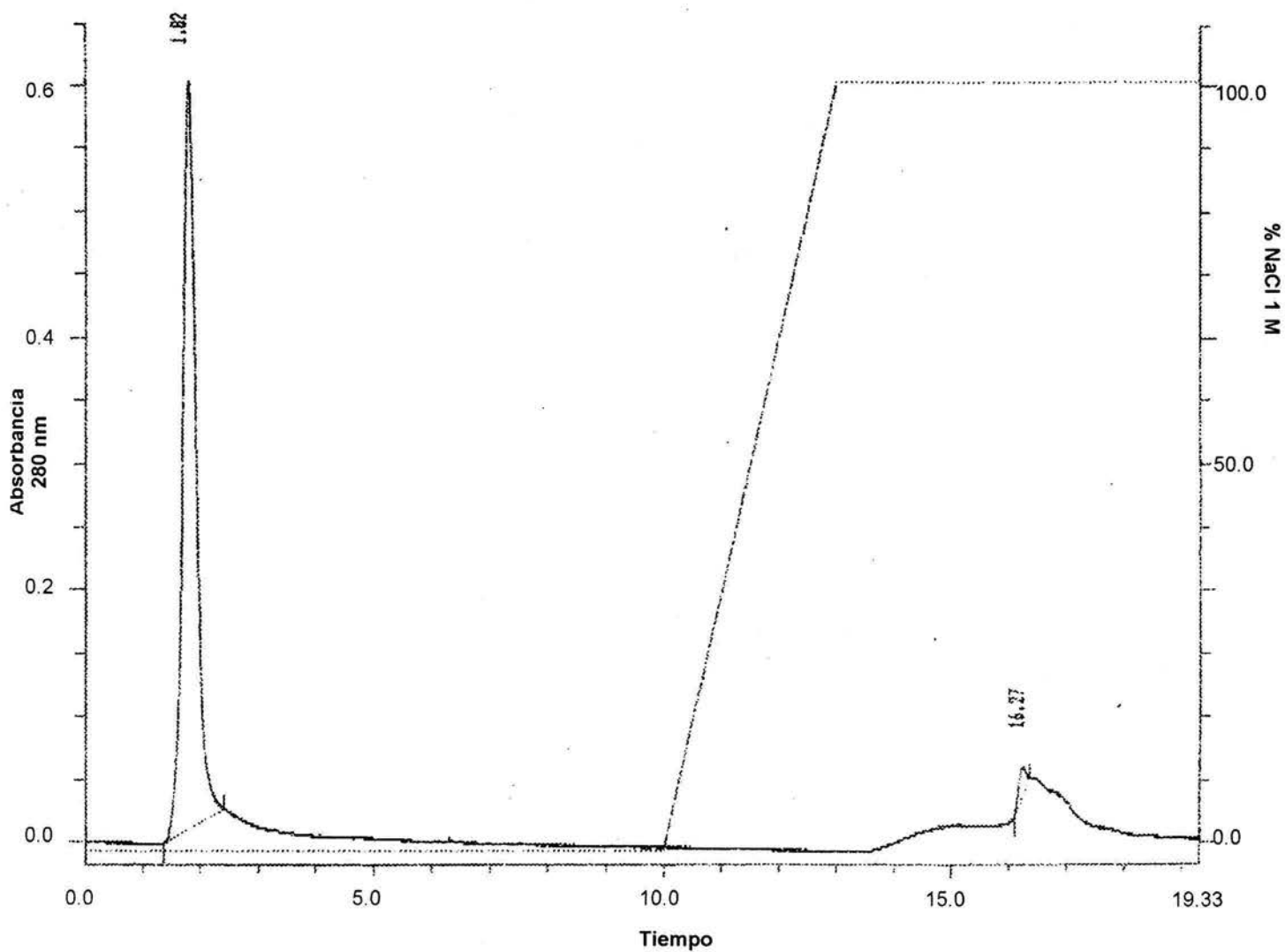


Fig. 28 Cromatograma obtenido después de la separación de la  $\beta$ -ionona reductasa en una columna de intercambio catiónico (sulfopropilo) por HPLC

Se observa un pico con un tiempo de retención de 1.82 minutos, que posee una actividad de  $\beta$ -ionona reductasa de alrededor de 23,000 U/ mg proteína.

#### 4.4) Resumen de la purificación

La  $\beta$ -ionona reductasa de *Paenibacillus amylolyticus* fue purificada 356 veces, bajo el esquema que a continuación se resume [Tabla 4].

Tabla 4: Resumen de la purificación de la  $\beta$ -ionona reductasa

Paso de purificación	Proteína (mg/mL)	Actividad Volumétrica U/ mL	Actividad Específica U/ mg prot.	Factor de purificación	Rendimiento (%)
<i>Extracto crudo</i>	5.1612	332.812	64.48	1.00	100.00
<i>Precipitación por salado</i>	0.7761	296.281	382.44	5.93	89.02
<i>Rotofor</i>	0.19600	246.36	1256.94	19.49	74.024
<i>Recirculación Rotofor</i>	0.09500	222.077	2337.65	36.25	66.73
<i>HPLC Columna Bio-gel TSK SP-5-PW</i>	0.0033	75.85	22984.84	356.46	23.07

##### 1) Determinación del punto isoelectrónico

La  $\beta$ -ionona reductasa pura se sometió a electroforesis en un gel con un gradiente de pH entre 3 y 9 (gel de isoelectroenfoque, PhastSystem, Pharmacia). Se obtuvo una sola banda, la cual se enfocó en un pH de 4.1, analizado por densitometría [Fig. 29]. Se puede decir entonces que el pI de la  $\beta$ -ionona reductasa es de 4.1.

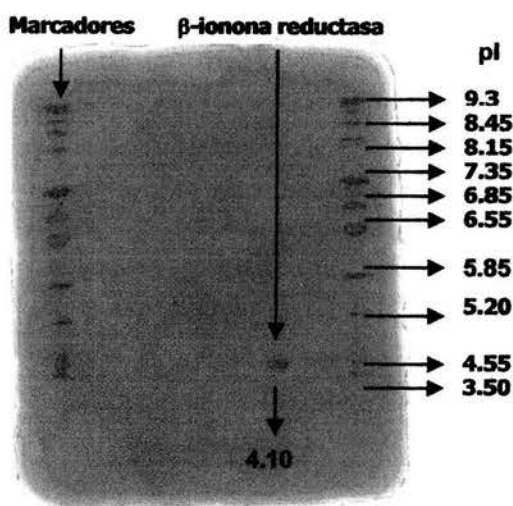


Fig. 29 Gel de isoelectroenfoque de la  $\beta$ -ionona reductasa. Puede observarse una sola banda, la cual, luego del análisis por densitometría, tiene un punto isoelectrónico de 4.10.

## 2) Determinación del peso molecular

El peso molecular determinado por electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (con SDS) fue de 58 kDa [Fig. 30].

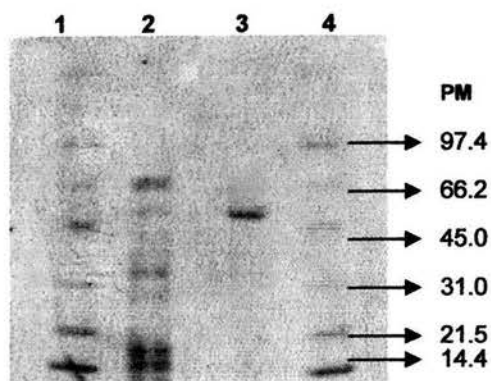


Fig. 30

Gel SDS-PAGE de la  $\beta$ -ionona reductasa purificada.

Carril 1 y 4: Marcadores de peso molecular

Carril 2: Extracto crudo del que se partió.

Carril 3:  $\beta$ -ionona reductasa pura.

El peso exacto de la  $\beta$ -ionona reductasa determinado por espectrometría de masas, (MALDI-TOF) fue de  $57,823 \pm 1.5$  Da.

## 3) Análisis de la secuencia de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal de la $\beta$ -ionona reductasa

Se determinó la siguiente secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal (los primeros 17 residuos):

$\beta$ -ionona reductasa:  $\text{NH}_3^+$ , L P S R A T V N Q F A P C M L K R

La secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal (los últimos 12 residuos) resultó ser:

$\beta$ -ionona reductasa: L V I G A L N Y L I R N,  $\text{COO}^-$

Comparando las dos secuencias de aminoácidos obtenidas con la base de datos BLAST, se observó que el extremo amino terminal no presenta un parecido específico con otras proteínas. Sin embargo, el extremo carboxilo terminal de la  $\beta$ -ionona reductasa



tiene parecido con alquilhidroperóxido reductasas (AHR), NADH oxidasas y NADH deshidrogenasas de origen bacteriano:

L V I G A L N Y L I R N, COO <sup>-</sup>	$\beta$ -ionona reductasa	<i>P. amylolyticus</i>
T A A I G A F D Y L I R, COO <sup>-</sup>	NADH oxidasa	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Smooth <i>et al.</i> , 2002)
T A A I G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	NADH deshidrogenasa	<i>Bacillus alcalophilus</i> (Xu <i>et al.</i> , 1991)
T A A L G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	NADH oxidasa	<i>Streptococcus mutans</i> (Higuchi <i>et al.</i> , 2000)
T A A L G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	AHR	<i>Bacillus subtilis</i> (Hartford <i>et al.</i> 1994)
N A A L G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	AHR subunidad F	<i>Bacillus cereus</i> (Ivanova <i>et al.</i> , 2003)
N A A L G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	AHR subunidad F	<i>Bacillus anthracis</i> (Read <i>et al.</i> , 2003)
T A S L G A F D Y L I R N, COO <sup>-</sup>	NADH deshidrogenasa	<i>Lactococcus lactis</i> (Bolotin <i>et al.</i> , 2001)

### 8) Determinación del pH de máxima actividad y efecto de la composición del amortiguador sobre la actividad de la $\beta$ -ionona reductasa

La máxima actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa de *P. amylolyticus* se encontró a un pH de 7.2 [Fig. 31]. Esta determinación se llevó a cabo utilizando amortiguadores con diferente pH para medir la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa. Para saber si algunas de las sales que forman parte de los amortiguadores afectan a la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa, para cada valor de pH entre 7 y 9, se probaron diferentes reguladores, todos a una concentración de 120 mM. En la figura 32, se puede observar que no existe diferencia entre determinar la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa a valores de pH de 7 y 7.2 si se utiliza amortiguador de fosfatos o de Tris-HCl. Por otro lado, la actividad es 1.2 veces mayor cuando se utiliza amortiguador Tris-HCl para determinar la actividad a los valores de pH de 8, 8.5 y 9, que cuando se utiliza amortiguador de boratos para medir la actividad.

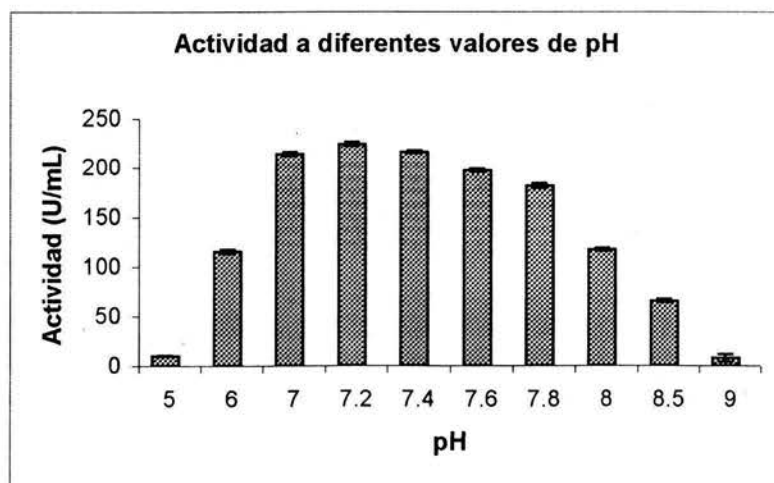


Fig. 31 Determinación del pH de máxima actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa

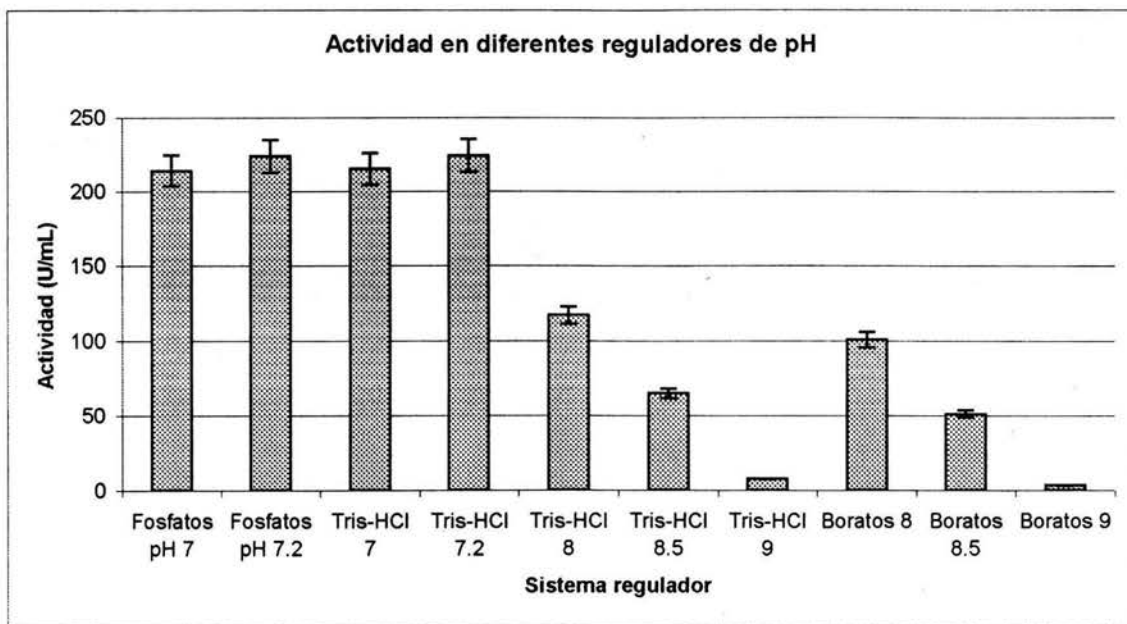


Fig. 32 Efecto de la composición del sistema regulador sobre la actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa.

### 9) Determinación de la temperatura de máxima actividad de la $\beta$ -ionona reductasa

Como puede verse en la figura 33, la máxima actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa se registra a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . A temperaturas superiores, la actividad empieza a decaer, lo que indica que por encima de  $40^{\circ}\text{C}$ , la enzima sufre un proceso de desnaturalización.

Se calculó la energía de activación de la enzima utilizando la ecuación de Arrhenius (inserto figura 33). El valor de la  $E_a$ , resultó ser de  $15.05 \text{ kcal/mol}$ .

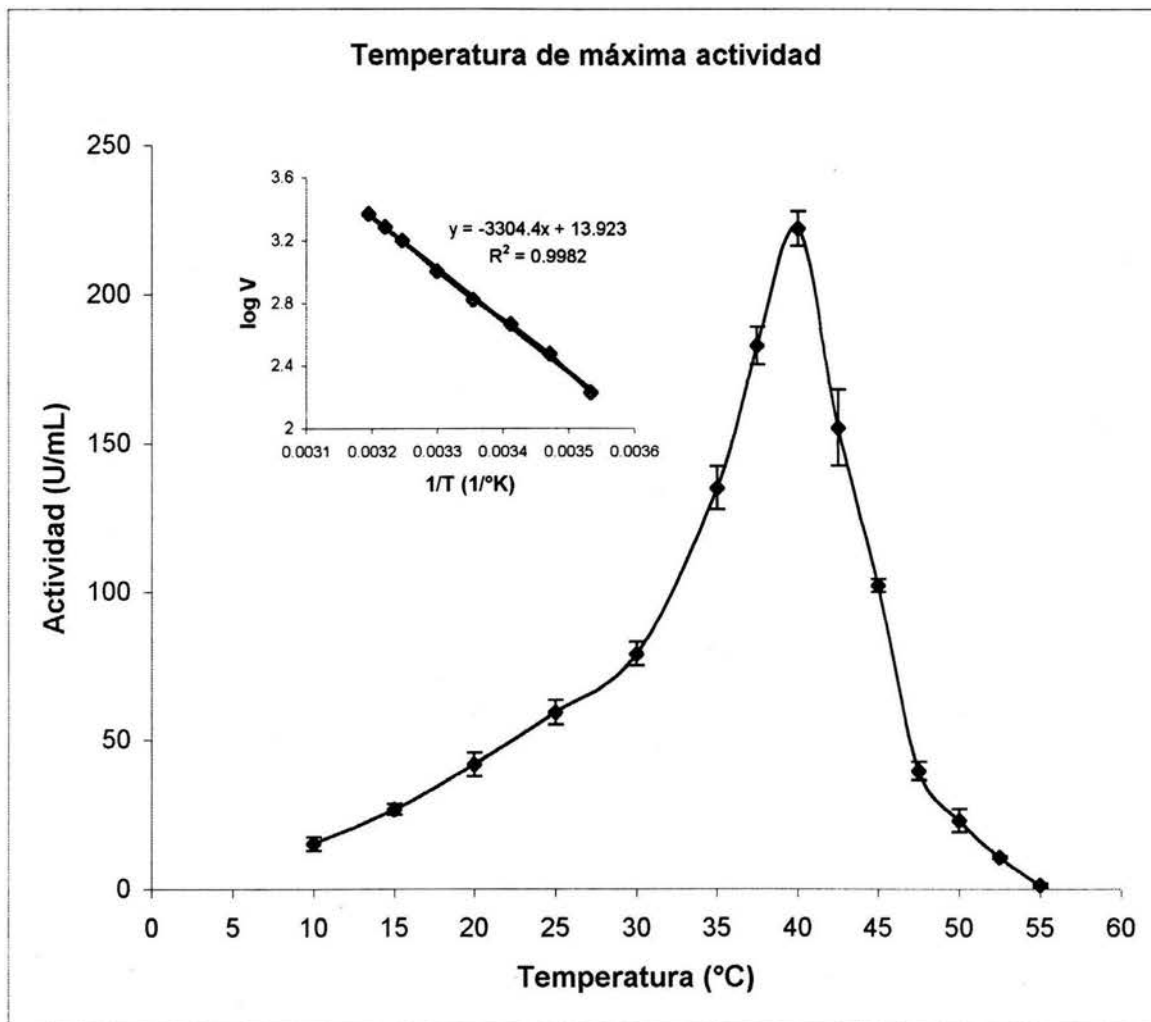


Fig. 33 Determinación de la temperatura de actividad máxima de la  $\beta$ -ionona reductasa. En el inserto se muestra la gráfica de Arrhenius de los valores de 10 a 40°C para el cálculo de la  $E_a$ .

## 10) Estudios cinéticos

Al graficar la velocidad inicial de la reacción vs. la concentración de sustrato, se obtuvo un comportamiento de Michaelis-Menten [Fig. 34].

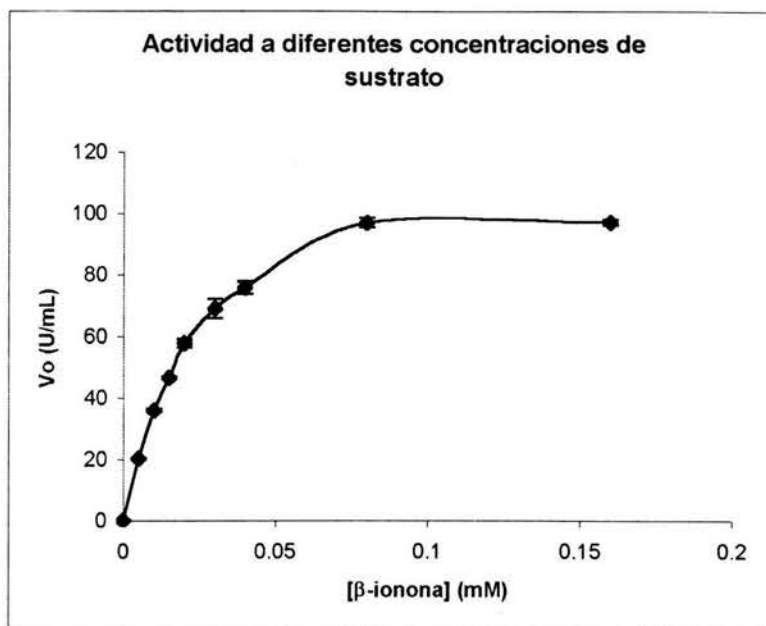


Fig. 34 Determinación de la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa a diferentes concentraciones de sustrato ( $\beta$ -ionona). La reacción se llevó a cabo en las condiciones óptimas de pH y temperatura, previamente determinadas.

Para conocer los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , se hizo el regráfico de Lineweaver-Burk, que se basa en el rearrreglo de la ecuación de Michaelis-Menten en una forma lineal [Fig. 35].

$$1 / V_o = (K_m / (V_{max}[S])) + (1 / V_{m\acute{a}x}) \quad \text{Ecuación Lineweaver-Burk}$$

A partir de este rearrreglo matemático, se calcularon los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la  $\beta$ -ionona reductasa. La  $K_m$  resultó ser de  $0.02788 \pm 0.0009$  mM de  $\beta$ -ionona, mientras que la  $V_{max}$  obtenida fue de  $40426.2 \pm 767$  U/ mL. Cabe mencionar que también se probaron otros regráficos de la ecuación de Michaelis-Menten (Eadie-Scatchard, Hanes-Woolf, Woolf-Augustinsson-Hofstee), para buscar el mejor ajuste de los datos (datos no mostrados). El mejor ajuste se observó con el regráfico de Lineweaver-Burk donde se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.9986, lo que indica que los

datos se ajustaron mejor a este modelo que a los otros, que tuvieron un coeficiente de correlación lineal de alrededor de 0.98.

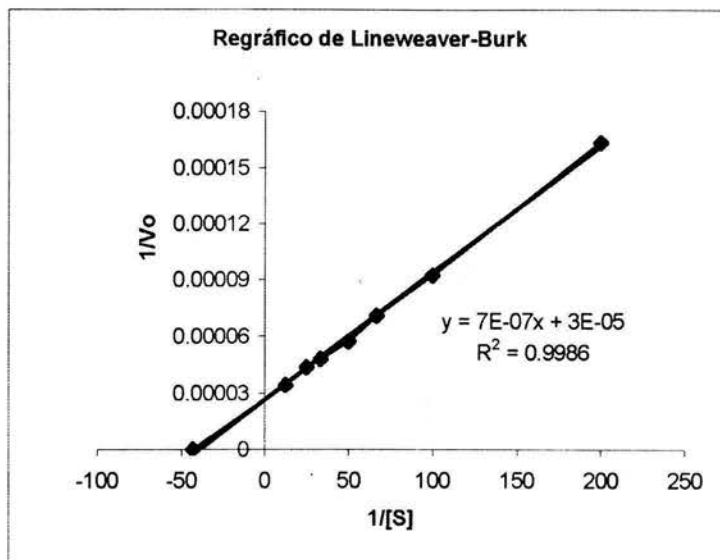


Fig.35 Determinación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de la  $\beta$ -ionona reductasa, utilizando el regráfico de la ecuación de Michaelis-Menten, según el modelo de Lineweaver-Burk

## 11) Aislamiento e identificación del producto de reacción de la $\beta$ -ionona

### a) REACCIÓN LUEGO DE 5 MINUTOS

Para poder identificar al producto de reacción generado por la  $\beta$ -ionona reductasa sobre la  $\beta$ -ionona, y poder tenerlo en cantidad suficiente, se llevó a cabo una reacción enzimática similar a la llevada a cabo en la celda de cuarzo, reescalándola a un volumen de 5 mL. La primera reacción se dejó incubar durante 5 minutos, tiempo calculado tomando en cuenta la cantidad de enzima utilizada y su actividad (cuantas milimoles de  $\beta$ -ionona transforma por minuto, por gramo de proteína). En el cromatograma [Fig. 36] pueden observarse 7 picos principales. Los primeros 4 corresponden a los disolventes con los que se extrajo, el producto de reacción, los cuales no se eliminaron del todo. Los siguientes tres picos, con un tiempo de retención de 20.24, 20.74 y 24.6 min,

corresponden a productos que, según los espectros de masas obtenidos, son tienen un peso molecular de 194, 192 y alrededor de 198 respectivamente. (Anexo). Al comparar con la base de datos del equipo, el espectro del pico 5 corresponde al de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, el del pico 6 a la  $\beta$ -ionona y el del pico 7 no corresponde a ningún compuesto del tipo de lo esperado. De hecho no corresponde al segundo compuesto que se obtiene en la ruta de biotransformación de la  $\beta$ -ionona, esto es, al 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol, ya que el patrón de fragmentación que se obtiene por espectrometría de masas es totalmente diferente. Aunque podría pensarse en algún tipo de compuesto derivado de las iononas, que esté ciclado o tenga un epóxido. La proporción obtenida de cada uno de los compuestos identificados luego de la reacción, tomando en cuenta las áreas de los picos en el cromatograma de gases (sin contar las áreas correspondientes a los picos de los disolventes), fue: 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, 81.87%;  $\beta$ -ionona, 2.67% y producto "no identificado", 15.46%.

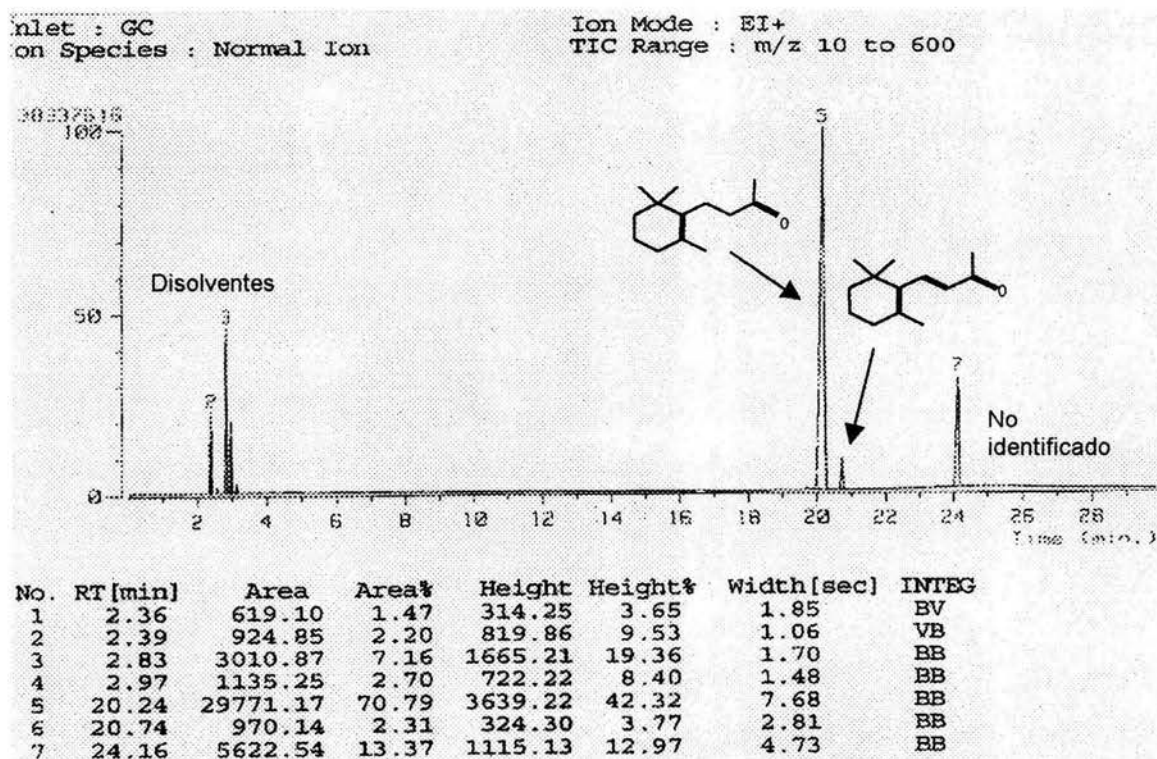


Fig. 36 Cromatograma de gases de los productos de la reacción de la  $\beta$ -ionona utilizando  $\beta$ -ionona como sustrato. La extracción se llevó a cabo luego de incubar el sistema de reacción a temperatura ambiente luego de 5 minutos.

## b) REACCIÓN LUEGO DE 45 MINUTOS

Para saber si el producto no identificado se generaba luego de un tiempo, a partir del producto principal, esto es, que después de cierto tiempo, la cantidad de producto principal disminuyera y la de producto no identificado se elevara, se llevó a cabo una reacción durante 45 minutos. El cromatograma que se obtuvo muestra 3 picos [Fig. 37]. En este caso se eliminaron los picos correspondientes a la mezcla de disolventes utilizados para la extracción de los aromas. Debido a esto, los tiempos de retención se ven un poco recorridos. Los picos que se obtienen corresponden de nuevo a los mismos compuestos que se obtuvieron luego de 5 minutos de reacción, incluso la proporción resulta ser muy parecida. El pico mayoritario corresponde a la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, presente en un 81.6%, el menos abundante a la  $\beta$ -ionona, presente en un 3.11%, y uno de abundancia intermedia que corresponde al compuesto no identificado, presente en un 15.3%. Esto nos puede indicar que la reacción alcanza cierto equilibrio que no se modifica con el tiempo, por lo que luego de 5 minutos, se ha completado la misma. Aun no se puede decir de dónde proviene el producto no identificado que se genera durante la reacción. La reacción podría darse por efecto de la enzima o por las condiciones del medio.

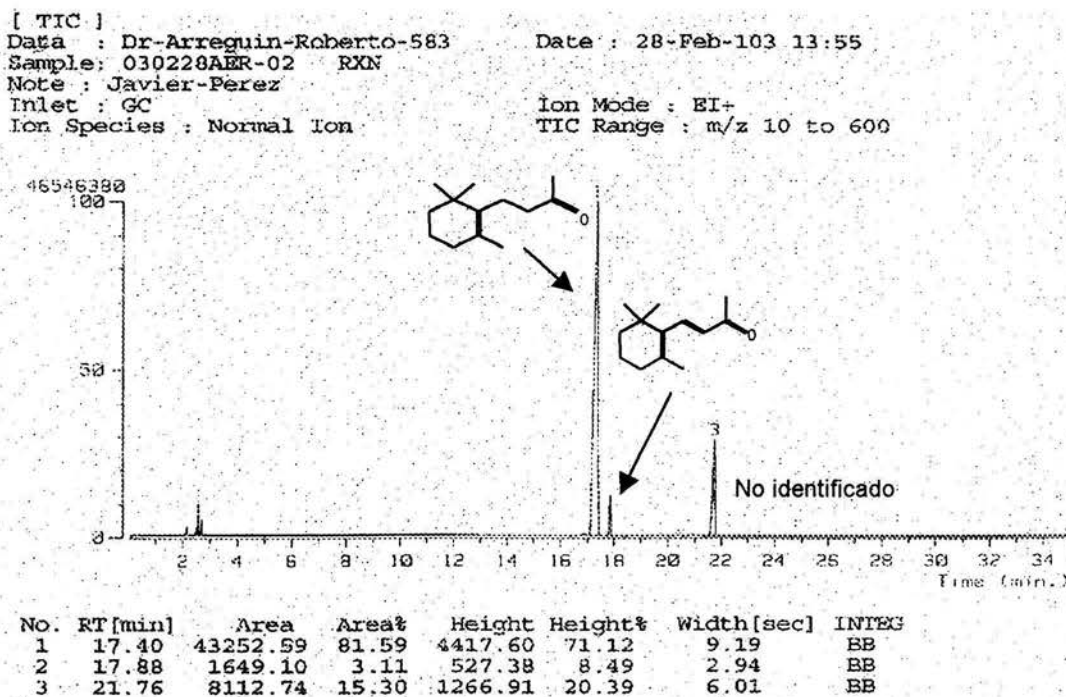


Fig. 37 Cromatograma de gases de los productos obtenidos a partir de la reacción de la  $\beta$ -ionona reductasa, utilizando  $\beta$ -ionona como sustrato. La extracción se realizó luego de incubar el sistema de reacción durante 45 minutos a temperatura ambiente.



### c) REACCIÓN SIN ENZIMA

Se realizó una reacción control sin extracto enzimático, para saber si las condiciones del medio de reacción son las que dan lugar al compuesto no identificado, a partir del sustrato,  $\beta$ -ionona. Esta reacción se incubó durante 45 minutos en las mismas condiciones de la reacción b). En este caso, el cromatograma muestra que solamente se obtuvo un pico, que resultó correspondiente a la  $\beta$ -ionona, por lo que se puede descartar que las condiciones del medio estén transformando a la  $\beta$ -ionona tanto en la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, como en el compuesto no identificado [Fig. 38]. Esto sugiere que la generación del producto no identificado pudiera darse a partir de un proceso enzimático a partir del producto.

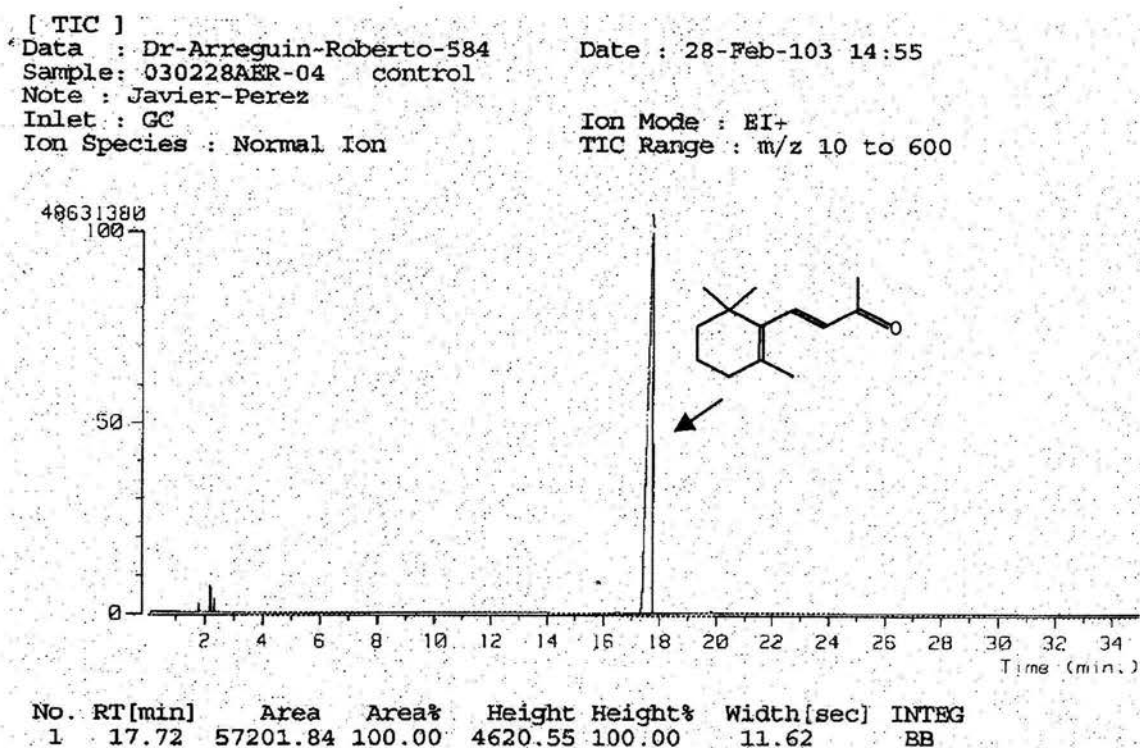


Fig. 38 Cromatograma de gases obtenido a partir de la reacción control sin adición de  $\beta$ -ionona reductasa, utilizando  $\beta$ -ionona como sustrato. La extracción se llevó a cabo luego de incubar el sistema de reacción durante 45 minutos.

#### d) REACCIÓN SIN SUSTRATO

Se realizó otro experimento control, esta vez sin añadir  $\beta$ -ionona a la reacción. El análisis de CG/MS realizado al extracto obtenido no mostró la presencia de ningún compuesto.

#### e) EXTRACCIÓN DEL PRODUCTO A TIEMPO = 0

Este experimento se llevó a cabo con el fin de conocer si el producto no identificado se generaba desde el principio de la reacción, o si se generaba después de cierto tiempo de incubación a temperatura ambiente. Esta vez se trabajó en el cuarto frío, para evitar el problema de la temperatura alta. Todos los componentes de la reacción se mezclaron e inmediatamente se añadió la mezcla de extracción. El análisis también se llevó a cabo de manera inmediata. El cromatograma obtenido, muestra solamente dos picos, el primero, corresponde a la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, presente en una proporción de 96.4% y el segundo corresponde a la  $\beta$ -ionona, que representa un porcentaje de 3.6% del total de los productos extraídos [Fig. 39]. En este caso, no se generó el producto no identificado, lo cual podría indicar que la temperatura o el tiempo de reacción pueden estar jugando un papel importante, al permitir que parte de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona sufra alguna transformación y forme el producto no identificado.

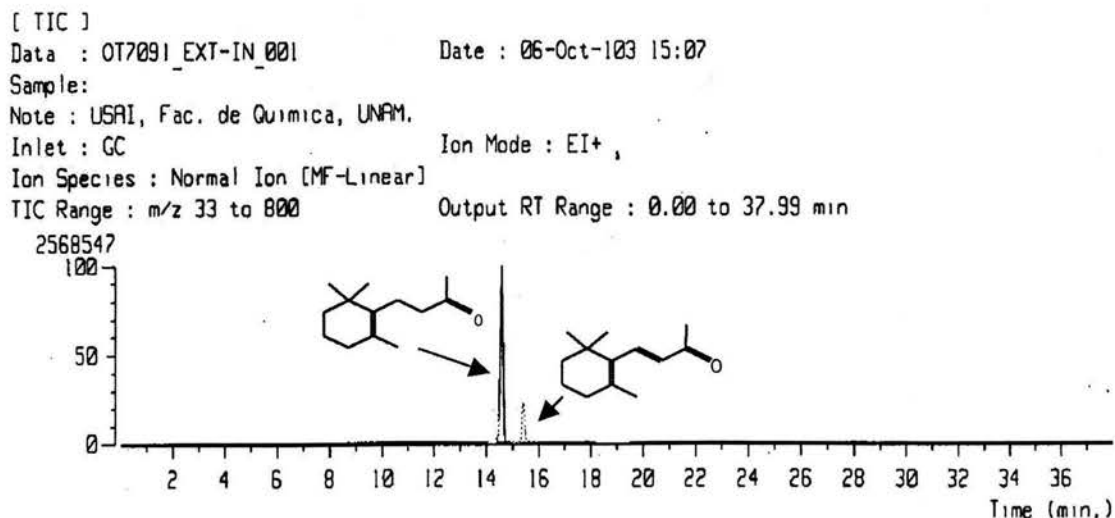


Fig. 39 Cromatograma de gases obtenido a partir de la reacción de la  $\beta$ -ionona reductasa, utilizando  $\beta$ -ionona como sustrato. La extracción se llevó a cabo inmediatamente después de mezclar los componentes de la reacción. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C

## f) REACCIÓN UTILIZANDO 7,8-DIHIDRO- $\beta$ -IONONA

La  $\beta$ -ionona reductasa se hizo reaccionar con el producto principal obtenido en las reacciones a) y b), la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, la cual fue previamente purificada como se indica en el capítulo de metodologías. Esto se hizo para saber si la enzima puede tener algún tipo de acción sobre el producto de reacción. En el cromatograma obtenido, pueden observarse 2 picos [Fig. 40]. El primero, corresponde a la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y el segundo, al producto no identificado. La proporción obtenida de cada uno de estos compuestos resultó de: 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, 86.3% y producto no identificado, 13.7%. La proporción obtenida de cada uno de estos productos es parecida a la obtenida anteriormente.

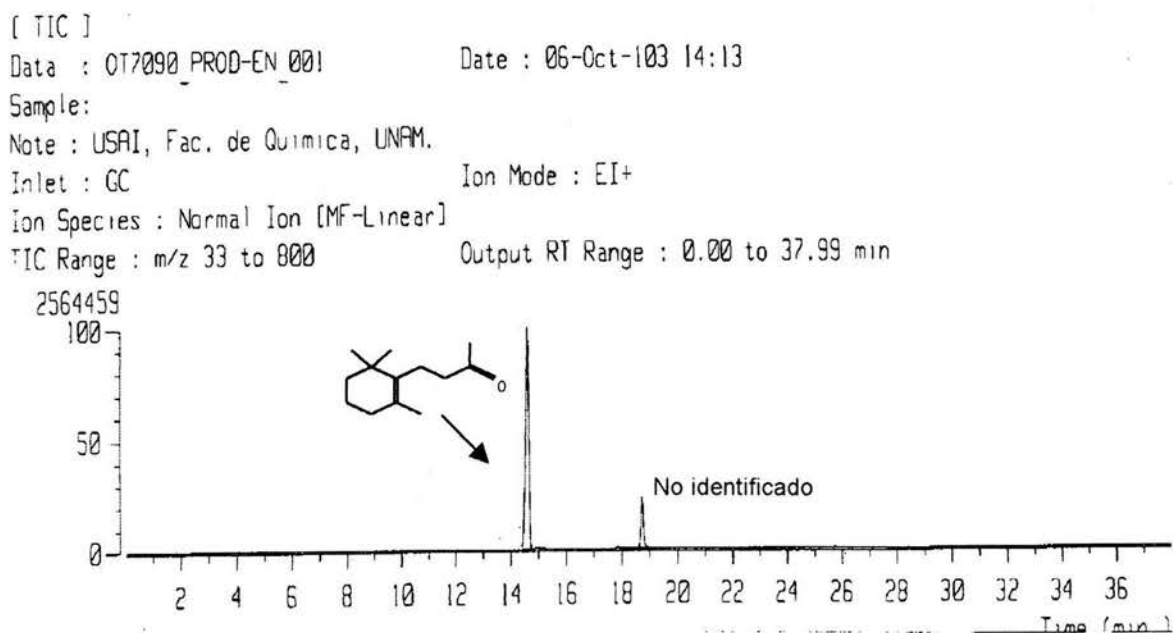
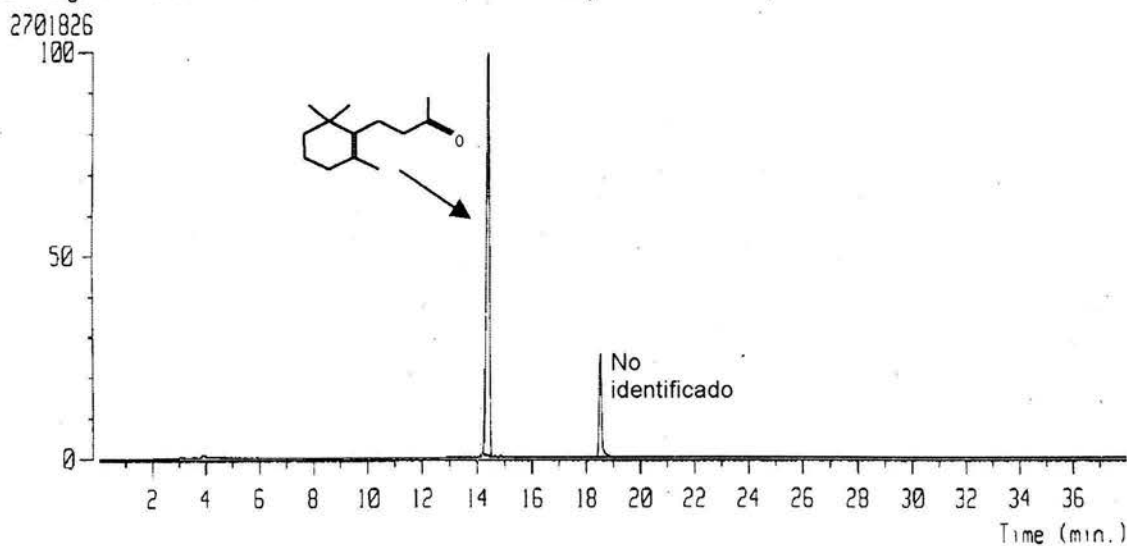


Fig. 40 Cromatograma de gases obtenido a partir de la reacción de la  $\beta$ -ionona reductasa, utilizando 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona como sustrato. La reacción se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

### g) REACCIÓN CONTROL DEL PRODUCTO SIN ENZIMA

Se volvió a trabajar con la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona pero sin añadir a la  $\beta$ -ionona reductasa. Esta vez se puso a incubar con el sistema de reacción, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Al analizar los productos extraídos, se obtuvieron los mismos que en la reacción f). El primer pico corresponde a la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, presente en este caso en una proporción del 86.8%, siendo el resto correspondiente al producto no identificado [Fig. 41]. Esto nos indica claramente que el producto no identificado, se genera a partir de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, por acción de las condiciones de incubación, y que se llega a cierto equilibrio, donde solamente una parte de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona se transforma.

[ TIC ]  
Data : OT7089\_PROD-SEN\_001      Date : 02-Oct-103 19:30  
Sample:  
Note : USAI, Fac. de Química, UNAM.  
Inlet : GC      Ion Mode : EI+  
Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]  
TIC Range : m/z 33 to 800      Output RT Range : 0.00 to 37.99 min



**Fig. 41** Cromatograma de gases obtenido a partir de la reacción control de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, sin enzima reductasa. El sistema solo contenía el amortiguador de fosfatos, el NADPH y la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona. La mezcla de reacción se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

## X. Discusión

---

En este trabajo se describen las características bioquímicas de la  $\beta$ -ionona reductasa de *Paenibacillus amylolyticus*, siendo la primera caracterización bioquímica reportada de una enzima de este tipo en una bacteria Gram positiva de bajo contenido de G+C.

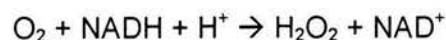
La enzima de este microorganismo se encuentra localizada en el citoplasma, lo cual indica que la transformación de este compuesto se lleva a cabo en este compartimiento. Previamente se demostró que, utilizando una concentración de  $\beta$ -ionona (en medio complejo) menor a 4 mg/L, casi el 70% de esta  $\beta$ -ionona fue incorporada a las células durante las primeras 12 h de fermentación. Bajo estas condiciones, la cantidad intracelular de  $\beta$ -ionona alcanzó una concentración máxima después de 12 h de incubación y después disminuyó linealmente hasta las 48 h de fermentación, tiempo al cual prácticamente se había consumido completamente. Esto indica que la  $\beta$ -ionona se transforma intracelularmente (Maldonado-Robledo, *et al.*, 2003).

Para fines de este estudio, la  $\beta$ -ionona reductasa fue purificada utilizando un esquema que comprendió varios pasos. Al principio, se utilizó la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, ya que es un método rápido por el cual se pueden separar a las proteínas de acuerdo a su grado de solubilidad. Posteriormente, se empleó el isoelectroenfoco, técnica muy sencilla y rápida, la cual, luego de llevar a cabo la recirculación, permitió recuperar una fracción con una actividad específica de  $\beta$ -ionona reductasa muy alta. Por último, la separación por HPLC de dicha fracción, utilizando una columna de intercambio catiónico (en este caso de sulfopropilo), permitió la purificación total de la  $\beta$ -ionona reductasa. Si bien se obtuvo una cantidad de enzima muy baja, su alta actividad específica permitió llevar a cabo las pruebas de caracterización bioquímica de la enzima utilizando poca cantidad de proteína. Sin embargo, para llevar a cabo otras pruebas, como dicroísmo circular o de dispersión dinámica de la luz (*light scattering*), la cantidad de proteína obtenida resultó ser insuficiente, por lo que en un futuro sería conveniente optimizar los procesos tanto de producción como de purificación de la  $\beta$ -ionona reductasa.

El proceso total de purificación se llevó a cabo en aproximadamente 36 h. Para evitar daños por proteasas, se adicionaron al extracto intracelular inhibidores de proteasas (PMSF que inactiva las serina proteasas y EDTA para inactivar a las metaloproteasas), además de que siempre se trabajó en frío (4°C).

Cuando se compararon las secuencias obtenidas de la  $\beta$ -ionona reductasa (extremos amino y carboxilo terminal), el extremo amino terminal no mostró semejanza con ninguna proteína de origen bacteriano. Sin embargo, el extremo carboxilo terminal se parece a enzimas alquilhidroperóxido reductasas de otras bacterias Gram positivas, incluyendo miembros del género *Bacillus*, del cual en algún momento se pensó que los miembros del ahora género *Paenibacillus* formaban parte (Nakamura, 1984).

Entre estas enzimas alquilhidroperóxido reductasas, la más estudiada es la NADH oxidasa de *Streptococcus mutans*, una de las bacterias causantes de la caries dental. Esta enzima provee a la cepa productora la capacidad de crecer en presencia de oxígeno, ya que carece de una cadena transportadora de electrones funcional así como de la enzima catalasa, por lo que la aerotolerancia de esta bacteria se correlaciona con su capacidad de inducir a la NADH oxidasa. Ésta es una flavoproteína que presenta un 73% de homología con la misma proteína de *Bacillus subtilis*, que tiene un peso molecular de 55 kDa. Es homóloga con un grupo de enzimas bacterianas, varias de las cuales han mostrado poseer actividad de NADH oxidasa formadora de peróxido de hidrógeno (Poole, et al., 2000). La reacción que estas enzimas catalizan es la siguiente:



Por otro lado, comparando la secuencia de los primeros 17 aminoácidos de la NADH oxidasa de *S. mutans* (Poole, et al, 2000) con la de la  $\beta$ -ionona reductasa de *P. amylolyticus* (este trabajo), se obtuvo lo siguiente:

NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , A L D A E I L E Q L G Q Y L K E L	NADH oxidasa	<i>S. mutans</i>
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , L P S R A T V N Q F A P C M L K R	$\beta$ -ionona reductasa	<i>P. amylolyticus</i>

No se obtiene ningún parecido entre los dos extremos amino terminales de las proteínas comparadas. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder saber si las proteínas tienen o no una alta identidad, debido a que aún se cuenta con una fracción muy pequeña de la secuencia (la secuencia del extremo amino terminal, representa el 3.2% del total de aminoácidos de la proteína, que en teoría es de aproximadamente 526 residuos). Se requiere tener más partes de la secuencia para hacer una comparación satisfactoria.

La única actividad enzimática reportada en la literatura, que tiene una función similar como reductasa de monoterpenos, en particular como carvona reductasa, se encontró intracelularmente en una bacteria Gram positiva de alto contenido de G+C, el actinomiceto *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 y se encuentra implicada en la ruta de biotransformación del limoneno (van der Werf, *et al.*, 2000). Sin embargo, esta enzima no ha sido purificada por lo que no hay reportes acerca de su secuencia, pero se reportan algunas de sus características bioquímicas:

- Es capaz de reducir el doble enlace adyacente al grupo carbonilo de la carvona
- Su máxima actividad se encontró a un pH de 8
- Requiere de un cofactor aún no identificado, pero no responde ni al NADH ni al NADPH.

La  $\beta$ -ionona reductasa de *P. amylolyticus* es dependiente de NADPH como cofactor, también reduce el doble enlace adyacente al grupo carbonilo de la  $\beta$ -ionona, trabajando mejor a pH's cercanos a la neutralidad.

Las demás enzimas reportadas en la literatura con actividad de enona reductasas pertenecen a plantas. La carvona reductasa de las células de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) puede reducir a la  $\beta$ -ionona en 7,8 dihidro- $\beta$ -ionona (Tang y Suga, 1994). Por otro lado, en el alga *Astasia longa*, también se ha reportado la existencia de enona reductasas con características similares a la de *N. tabacum*, a la que estos autores denominaron carvona reductasa, sólo que en este caso su estereoespecificidad es muy alta aunque ambas actúan sobre la carvona como sustrato (Shimoda e Hirata, 2000).



El pH óptimo de la  $\beta$ -ionona reductasa es de 7.2. El sitio activo de la enzima está compuesto frecuentemente por grupos ionizables que deben estar en la forma iónica propia de manera que puedan mantener la conformación del sitio activo, unir a los sustratos y catalizar la reacción. La estabilidad al pH de una enzima depende de muchos factores que incluyen la temperatura, la fuerza iónica, la naturaleza química del amortiguador, la concentración de varios conservadores, la concentración de iones metálicos contaminantes, concentración de sustratos o cofactores de la enzima y la concentración misma de la enzima. En este caso, se probó si la actividad de la enzima podía verse afectada por el sistema amortiguador empleado. Se encontró que la actividad no se vio afectada por las sales empleadas. Cabe mencionar que únicamente se probó el intervalo de pH en el cual la enzima presentó su actividad más alta (pH 7-9). La actividad de la enzima no presentó diferencia si se utilizaron amortiguadores de fosfato de potasio o de Tris-HCl para estudiar el intervalo de pH comprendido entre 7 y 8. Comparando el intervalo entre 8 y 9, se utilizó amortiguador de boratos y de Tris-HCl. La actividad resultó ser un poco menor cuando se utilizó el amortiguador de boratos que cuando se utilizó el de Tris-HCl. Al determinar su punto isoeléctrico, éste se determinó en 4.1, lo cual confirmó los resultados obtenidos durante la etapa de purificación donde se utilizó el isoelectroenfoque, donde la(s) fracción(es) con mayor actividad tenían un pH muy cercano al valor determinado en el gel.

La temperatura también acelera las reacciones enzimáticas. En este caso, la temperatura donde se encontró la máxima actividad de la  $\beta$ -ionona reductasa resultó ser de 40°C, lo que resulta curioso en una bacteria mesófila cuyo hábitat natural es el suelo. La actividad catalítica de una enzima resulta de una estructura terciaria altamente ordenada que combina grupos R de aminoácidos específicos de tal forma que se formen sitios de unión a sustrato estereoespecíficos. La estructura terciaria de una enzima se mantiene principalmente por un gran número de enlaces débiles no covalentes. Si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura terciaria se desordena y se dice que la enzima se ha desnaturizado, esto es, que ha perdido su capacidad catalítica. Así, a medida que la temperatura aumenta, el incremento esperado en la velocidad de catálisis, que resulta del incremento de colisiones E+S es abatido por el incremento en la velocidad de desnaturización, lo cual, en el caso de la  $\beta$ -ionona reductasa sucede a temperaturas por encima de los 40°C.

En cuanto a la caracterización cinética de la enzima, se puede observar que el valor obtenido para la  $K_m$  es bajo, lo que indica que la  $\beta$ -ionona reductasa tiene una alta afinidad por su sustrato, la  $\beta$ -ionona. La enzima sigue un comportamiento tipo Michaelis-Menten, el cual se ajustó satisfactoriamente a la ecuación de Lineweaver-Burk, modelo a partir del cual se obtuvieron sus parámetros cinéticos.

Todas las enzimas enona reductasas reportadas en la literatura tienen la capacidad de reducir dobles enlaces carbono-carbono, adyacentes a un grupo carbonilo, igual que la  $\beta$ -ionona reductasa, pero no actúan sobre un sustrato único sino que son capaces de llevar a cabo la reducción de los dobles enlaces de otras moléculas que lo tengan en el mismo arreglo molecular (Tang y Suga, 1992, 1994; Noma y Asakawa, 1992; van Dyk, *et al.*, 1999; van der Werf, 2000; Shimoda e Hirata, 2000). El sustrato probado en este estudio fue la  $\beta$ -ionona. Sin embargo, se piensa que la  $\beta$ -ionona reductasa pueda actuar más como una enona reductasa, que como una reductasa específica para un solo sustrato.

Cuando actúa sobre la  $\beta$ -ionona como sustrato, la  $\beta$ -ionona reductasa puede reducir el doble enlace adyacente al grupo carbonilo, transformándola en 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona. En el sistema de reacción probado en este estudio, apareció un producto de reacción que no fue identificado por la espectrometría de masas. Este producto siempre se obtuvo en una proporción similar, no importando el tiempo de incubación de la reacción, por lo que parece estar en equilibrio con la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona de la cual proviene. Se sabe que este tipo de compuestos norisoprenoides de 13 carbonos se ven afectados en mayor o menor manera por condiciones ambientales, como podrían ser aire, luz, temperatura (Winterhalter, 1996). El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente, protegido de la luz, pero no del aire. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la extracción inmediata de los productos de reacción y todo el proceso se llevó a cabo a 4°C, el producto no identificado, no apareció. Esto pudo deberse a que el producto generado no se vio afectado por las condiciones de temperatura, o a que no dio tiempo a que la reacción de transformación se llevara a cabo. Sin embargo, queda claro que este compuesto proviene de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona, ya que, cuando la  $\beta$ -ionona se sometió a las condiciones de reacción, sin adicionar enzima ésta no sufrió transformación alguna. Cuando se llevó a cabo este mismo experimento con 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona sin añadir enzima al medio de reacción, además de recuperar este compuesto, también se obtuvo el

compuesto no identificado, lo que sugiere que proviene de la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona. Por lo tanto, se sugiere que el único producto de reacción de la  $\beta$ -ionona reductasa, partiendo de  $\beta$ -ionona como sustrato, es la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona.

*Paenibacillus amylolyticus* es una bacteria con forma bacilar, cuyo hábitat natural es el suelo. Es Gram positiva y capaz de producir esporas elipsoidales. Puede crecer entre 10 y 40°C y en un intervalo de pH entre 4.5 y 9. Sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en 37°C a un pH de 7.0. Es una bacteria móvil, posee flagelos peritricos, no produce pigmento en medio sólido y es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa positiva y oxidasa negativa. Hidroliza varias proteínas, reduce nitratos y utiliza varios ácidos orgánicos como fuente de carbono (Shida, *et al.*, 1997). Puede crecer en el medio mínimo de Spizizen modificado. Este medio se modificó porque en su composición original tiene citrato y L-triptofano y se quería que no hubiese ningún compuesto capaz de actuar como fuente de carbono alterna. En este caso, se sabe que *P. amylolyticus* puede utilizar muy bien el citrato, por lo que se eliminó. Aun así, la bacteria pudo crecer en el MMS sin citrato y sin triptofano. Cuando se eliminó la glucosa del medio y se añadió  $\beta$ -ionona, las células inoculadas no fueron capaces de crecer, muy al contrario, se vieron afectadas por este compuesto y se lisaron. Sin embargo, al ser cultivadas en el medio mínimo, con glucosa y con  $\beta$ -ionona, su crecimiento fue muy similar al obtenido cuando solamente se tenía glucosa en el medio, lo cual indica que la  $\beta$ -ionona no es un compuesto que pueda ser utilizado por *P. amylolyticus* como fuente de carbono y energía. Al ser determinado el consumo de  $\beta$ -ionona en el medio, se observa que tanto en el control sin microorganismo, como en el medio donde se sustituyó la glucosa por  $\beta$ -ionona, la cantidad presente en el medio de cultivo permaneció prácticamente constante. Sin embargo, al estar presentes en el medio tanto la glucosa como la  $\beta$ -ionona, ésta última comenzó a ser transformada. En este caso, *P. amylolyticus* no utiliza a la  $\beta$ -ionona como fuente de carbono, y, cuando tiene una fuente de carbono disponible en el medio, en este caso la glucosa, puede transformar a la  $\beta$ -ionona en los compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco, lo que se puede pensar como un cometabolismo, el cual se define como la transformación de un compuesto por un microorganismo, el cual es incapaz de utilizarlo como fuente de energía o como sustrato para la biosíntesis (Alexander, 2000).

Por otro lado, se puede ver que la  $\beta$ -ionona reductasa es una enzima que se induce por la presencia de  $\beta$ -ionona en el medio, siempre y cuando *P. amylolyticus* tenga una fuente de carbono para crecer. Las enzimas enona reductasas reportadas en la literatura encontradas en *Rhodococcus erythropolis*, y en levaduras también, son inducidas por el sustrato que transforman (van der Werf, 1999, 2000; van Dyk, 1999). *Paenibacillus amylolyticus* es una bacteria cuyo hábitat natural es el suelo, y no es común que compuestos del tipo de la  $\beta$ -ionona se encuentren presentes. Sin embargo, la cepa aislada en el Lab. de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, fue aislada a partir de un lodo residual del proceso del secado de la flor de cempasúchitl, un medio inusualmente rico en carotenoides. Las iononas y sus derivados provienen del metabolismo oxidativo de los carotenoides. Hay que recordar que *P. amylolyticus* fue aislado junto con una levadura, *Trichosporon asahii*, la cual posee la capacidad de romper oxidativamente a la luteína (principal carotenoide encontrado en el extracto de flor de cempasúchitl), en el enlace 9,10, lo que genera  $\beta$ -ionona en el medio. Entonces, la bacteria se ve sometida a una cantidad relativamente alta de este compuesto, la cual provoca que se induzca la síntesis de la  $\beta$ -ionona reductasa, enzima que actúa en el primer paso de reducción de la  $\beta$ -ionona en la vía de bioconversión de la  $\beta$ -ionona en 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol. Como se sabe que estos compuestos norisoprenoides de 13-C tienen una alta actividad antimicrobiana, debido a que inhiben la cadena respiratoria atrapando los electrones de la misma por tener 3 dobles enlaces conjugados, es posible que *P. amylolyticus* haya desarrollado un sistema para reducir dichos dobles enlaces, y hacer que la  $\beta$ -ionona pierda su toxicidad. En la asociación de *P. amylolyticus* con *T. asahii* para la producción de compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco a partir de la luteína, la levadura es quien se lleva el mayor beneficio, porque ésta es incapaz de soportar concentraciones relativamente bajas de  $\beta$ -ionona, que *P. amylolyticus* sí soporta. Cuando *P. amylolyticus* reduce a la  $\beta$ -ionona que produce la levadura a partir de la luteína, *T. asahii* puede seguir creciendo y ambos microorganismos en conjunto producen los compuestos con aroma. *P. amylolyticus* puede crecer en presencia de luteína, pero no genera los compuestos con aroma, porque rompe inespecíficamente al carotenoide. Además, cuando se cultiva junto con *T. asahii* en un medio adicionado con luteína, el crecimiento de *P. amylolyticus* es ligeramente mejor que al estar solo en el medio (Sánchez-Contreras, et al., 2000, Maldonado-Robledo, et al., 2003). La  $\beta$ -ionona reductasa no es una enzima presente en todas las cepas de *Paenibacillus amylolyticus*. Trabajando con la

cepa de *P. amylolyticus* NRRL-B 14945, en las mismas condiciones en las que este estudio se llevó a cabo con la cepa de trabajo, se encontró que nunca presenta la actividad de  $\beta$ -ionona reductasa aquí descrita (datos no mostrados). Esto nos lleva a pensar que, debido a las características del medio a partir del cual nuestra cepa fue aislada, la bacteria evolucionó de alguna manera para tener a la  $\beta$ -ionona reductasa, enzima que puede hacer su hábitat más amigable para crecer.

## X. Conclusiones y Perspectivas

---

- 1) La  $\beta$ -ionona reductasa de *Paenibacillus amylolyticus* es una enzima citoplasmática, que tiene un peso molecular de aproximadamente 58 kDa.
- 2) Sus características bioquímicas determinadas se resumen a continuación:
  - T. de máxima actividad: 40°C
  - pH de máxima actividad: 7.2
  - Punto isoeléctrico: 4.1
  - Comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten
  - Km:  $0.02788 \pm 0.0009$  mM de  $\beta$ -ionona
  - Vmáx:  $40,426.2 \pm 767$  U/ mL
- 3) La comparación de los primeros 17 aminoácidos del extremo N-terminal de la  $\beta$ -ionona reductasa no revela homología específica con ninguna otra secuencia proteica reportada en la base de datos (BLAST) utilizada
- 4) La comparación de los 12 últimos residuos del extremo C-terminal de la  $\beta$ -ionona reductasa muestra que esta secuencia tiene parecido con alquilhidroperóxido reductasas, NADH oxidasas y NADH deshidrogenasas de otras bacterias Gram positivas. Sin embargo, al no contar con más partes de la secuencia de esta proteína, no puede decirse más en cuanto a si es o no parecida a esta enzima.
- 5) El producto de reacción de la  $\beta$ -ionona reductasa cuando actúa sobre la  $\beta$ -ionona como sustrato resultó ser la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona. Este último compuesto sufre una transformación causada por las condiciones del medio de reacción a un compuesto que no se identificó utilizando espectrometría de masas y que, aparentemente, se encuentra en equilibrio con la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona de la cual se generó.



- 6) *Paenibacillus amylolyticus* no puede crecer en el MMS modificado cuando se sustituye la glucosa con  $\beta$ -ionona. Esto indica que la  $\beta$ -ionona no puede ser utilizada como fuente de carbono, pero que, si hay glucosa en el medio, este compuesto puede ser transformado en sus derivados, lo que puede pensarse como un caso de cometabolismo.
- 7) La  $\beta$ -ionona reductasa es una enzima que se induce por la presencia de su sustrato en el medio. Si no hay  $\beta$ -ionona presente, tampoco lo estará la  $\beta$ -ionona reductasa.

Como perspectivas al presente trabajo se propone:

- 1) Clonar y sobreexpresar la  $\beta$ -ionona reductasa de *P. amylolyticus*, con el fin de analizar la secuencia del gen y establecer las similitudes existentes con otras proteínas y para obtener la concentración de proteína necesaria para continuar con su caracterización.
- 2) Obtener oligopéptidos intermedios de la  $\beta$ -ionona reductasa y secuenciar los mismos, para ahondar en las comparaciones y poder decir con mayor certeza a que tipo de proteína se parece.
- 3) Llevar a cabo estudios estructurales sobre la  $\beta$ -ionona reductasa pura, en este caso de dicroísmo circular y de dispersión de luz, para lo cual, se debe optimizar primero la purificación de la proteína.
- 4) Probar si la  $\beta$ -ionona reductasa puede actuar sobre otros compuestos de estructura relacionada con la  $\beta$ -ionona y generar otros compuestos con aroma de interés industrial.
- 5) Llevar a cabo pruebas de inmovilización de la enzima así como de reacción en disolventes orgánicos para tratar de optimizar la producción de los compuestos con aroma.



## **XI. Bibliografía.**

**Alexander, M.;** Biodegradation and bioremediation; 2<sup>nd</sup> edition; Academic Press, New York; (2000)

**Armstrong, D.W.** Brown, L.A., Porter, S.y Rutten, R.; Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. En: Schreier, P., Winterhalter, P. (eds) Progress in flavour precursor studies. Allured, Carol Stream, Ill, pp 425-438.

**Armstrong, D.W.** y Yamazaki, H.; Natural flavours production: a biotechnological approach; *Trends Biotechnol*: (1996) 4: 264-268

**Ash, C.,** Priest, F.G. y Collins, M.D.; Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks, and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*; *Antonie van Leeuwenhoek*; (1993) 64: 253-260

**Bank, T.** y Humenu, A.; MALDI-TOF análisis of protein and DNA; *Neuroscientist*; (2001) 7: 6-12

**Bolotin, A.,** Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. y Sorokin, A.; The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403; *Genome Res*; (2001) 11: 731-753

**Bosser, A.,** Paplorey, E. y Beling, J.M.; A simple way to ( $\pm$ )-dihydroactinidiolide from  $\beta$ -ionone related to enzymatic co-oxidation of  $\beta$ -carotene in aqueous solution; *Biotechnol Prog*; (1995) 11: 689-692

**Burton, H.R.** y Kasperbauer, M.J.; Changes in chemical composition of tobacco lamina during senescence and curing. 1. Plastid pigments; *J Agric Biol Chem*; (1985); 33: 879-883

**Cogan, T.M.;** Flavour production by dairy starter cultures; *J Appl Bacteriol [Symp Suppl]*; (1995) 79: 49S-64S

**Cooper, D.A.;** Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer; *J Nutr.*; (2004) 134:221S-224S

**De Felipe, F.L.,** Kleerebezem, M., De Vos, V.W. y Hugenholtz, J.; Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlling expression of NADH oxidase; *J Bacteriol*; (1998) 180: 3804-3808

**Duetz, W.A.,** Fjällman A.H., Ren S., Jourdat, C.y Witholt B.; Biotransformation of D-limonene to (+) *trans*-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells; *Appl Environ Microbiol*; (2001) 67: 2829-2832

**Engel, K.H.** y Roling, I.; Generation of flavors by microorganisms and enzymes: An overview. En: Takeoka, G.R., Teranishi, R., Williams, P.J. y Kobayashi, A. (eds.); Biotechnology for improved foods and flavors (ACS Symposium Series 637): American Chemical Society; Washington, D.C.; (1996) pp 120-123

**Enzell, C.R.** y Wahlberg, I.; Tobacco isoprenoids; *Nat Prod Rep*; (1987) 4: 237-76

**Eugster, C.H.** y Märki-Fischer, E.; The chemistry of rose pigments; *Angew Chem Int Ed Engl*; (1991) 30: 654-672

**Feron, G.,** Bonnarne, P. y Durand, A.; Prospects for the microbial production of food flavours; *Trens Food Sci Technol* ; (1996) 7:285-293

**Gatfield, I.L.;** Bioreactors for industrial production of flavours: use of enzymes. En: Patterson, R.L.S., Charlwood, B.V. y Williams, A.A. (eds) Bioformation of flavours. The Royal Society of Chemistry, Cambridge; (1992), pp 171-185

**Goodwin, T.W.;** Distribution of carotenoids; *Methods in Enzymology*; (1992) 213:167-172

**Grivel, F., Larroche, C. y Gros, J.B.;** Determination of the reaction yield during biotransformation of the volatile and chemically unstable compound  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*; *Biotechnol Prog*; (1999) 4: 697-705

**Grivel, F., y Larroche, C.;** Phase transfer and biocatalyst behaviour during biotransformation of  $\beta$ -ionone in a two-phase liquid system by immobilized *Aspergillus niger*; *Biochem Bioeng J*; (2001) 7: 27-34

**Hagedorn, S. y Kaphammer, B.;** Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals; *Annu Rev Microbiol*; (1994) 48: 773-800

**Hartford, O.M. y Dowds, B.C.;** Isolation and characterization of a hydrogen peroxide resistant mutant of *Bacillus subtilis*; *Microbiology*; (1994) 140 (Pt 2): 297-304

**Harwood, C.R., Archibald, A.R., Hancock, I.C. y Zeigler, D.R.;** Growth, maintenance and general techniques. En: Harwood, C.R. y Cutting, S.M. (eds.); Molecular biological methods for *Bacillus*; John Wiley & Sons Ltd, UK (1990) pp. 1-23

**Higuchi, M., Shimada, M., Matsumoto, J., Yamamoto, Y., Rhaman, A. y Kamio, Y.;** Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-forming NADH oxidase from *Streptococcus mutans*; Resultados no publicados;

**Hirata, T., Hamada, T., Aoki, T. y Suga, T.;** Stereoselectivity of the reduction of carvone and dihydrocarvone by suspension cells of *Nicotiana tabacum*; *Phytochemistry*; (1982) 21: 2209-

**Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, D.S.D., Overbeek, R. y Kyrpides, N.;** Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*; *Nature*; (2003) 423: 87-91

**Karnaukov, V.N.;** Carotenoids: Recent progress, problems and prospects; *Comp Biochem Physiol*; (1990): 95B: 1-20

**Kosteridis, Y., Razungles, A., Bertrand, A. y Baumes, R.;** Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis; *J Agric Food Chem*; (2000) 48: 5383-5388

**Krasnobajew, V. y Helminger D.;** Fermentation of fragrances: biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Lasiodiplodia theobromae*; *Helv Chim Acta*; (1982) 65:1590-

**Krasnobajew, V.;** US Patent 4,311,860

**Krasnobajew, V.;** Terpenoids. En Kieslich, K. (ed) Biotechnology, vol 6a. Biotransformations. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla. (1984), pp97-125

**Krings, U. y Berger, R.G.;** Biotechnological production of flavours and fragrances; *Appl Microbiol Biotechnol*; (1998) 49: 1-8

**Krinsky, N.I. y Yeum, K.J.;** Carotenoid-radical interactions; *Biochem Biophys Res Commun*; (2003) 305:754-760

- Larroche, C.**, Creuly, C. y Gros J.B.; Fed-batch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*; *Appl Microbiol Biotechnol*; (1995) 43: 222-227
- Lutz-Wahl, S.**, Fischer, P., Schmidt-Dannert, C., Wohlleben, W., Hauer, B. y Schmid, R.D.; Stereo- and regioselective hydroxylation of  $\alpha$ -ionone by *Streptomyces* strains; *Appl Environ Microbiol*; (1998); 64: 3878-3881
- Maldonado-Robledo, G.**, Rodríguez-Bustamante, E., Sánchez-Contreras, A., Rodríguez-Sanoja, R. y Sánchez, S.; Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process; *Appl Microbiol Biotechnol*; (2003) 62: 484-488
- May, S.W.**; Applications of oxidoreductases; *Curr Opin Biotechnol*; (1999) 10: 370-375
- Mikami, Y.**, Fukunaga, Y., Arita, M. y Kisaki, T.; Microbial transformation of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -methylionone; *Appl Environ Microbiol*; (1981) 41: 610-617
- Nagasawa, T.** y Yamada, H.; Application of nitrile converting enzymes for the production of useful compounds; *Pure Appl Chem*; (1990) 62: 1441-1444
- Nakamura, L.K.**; *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev. *Bacillus pabuli*, sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom., rev.; *Int J Syst Bacteriol*; (1984) 34: 224-226
- Noma, Y.** y Asakawa, Y.; Enantio- and diastereoselectivity in the biotransformation of carveols by *Euglena gracilis* Z; *Phytochemistry*; (1992) 31: 2009-2011
- O'Keefe, D.P.** y Harder, P.A.; Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenase in the actinomycetes; *Mol Microbiol*; (1991) 5: 2099-2105
- Read, T.**, Peterson, S., Tourasse, N., Baillie, L., Paulsen, I., Nelson, K., Tettelin, H., Fouts, D., Eisen, J., Gill, S., Holtzapple, E., Okstad, O., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J., Beanan, M., Dodson, R., Brinkac, L., Gwinn, M., DeBoy, R., Madupu, R., Daugherty, S., Durkin, A., Haft, D., Nelson, W., Peterson, J., Pop, M., Khouri, H., Radune, D., Benton, J., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I., Weidman, J., Berry, K., Plaut, R., Wolf, A., Watkins, K., Nierman, W., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J., White, O., Salzberg, S., Thomason, B., Friedlander, A., Koehler, T., Hanna, P., Kolsto, A.-B. y Fraser, C.; The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria; *Nature*; (2003) 423: 81-86
- Rosenberg, I.M.**; Protein analysis and purification. Benchtop techniques; Birkhäuser, Boston; pp 101-102
- Sánchez, A.**; Flores-Cotera, L.B., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G. y Sánchez, S.; Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones; *Rev Latinoamer Microbiol*; (1999) 41:175-191
- Sánchez-Contreras, A.**, Jiménez, M. y Sánchez, S.; Bioconversion of lutein to products with aroma; *Appl Microbiol Biotechnol*; (2000) 54: 528-534
- Sanderson, G.W.**, Co, H. y Gonzales, J.G.; Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenoids in black tea aroma formation; *J Food Sci*; (1971) 36: 231-236
- Schmid, A.**, Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbots, M y Witholt, B.; Industrial biocatalysis today and tomorrow; *Nature*; (2001) 409: 258-268

- Shida, O.**, Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K. y Komagata, K.; Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov.; *Int J Syst Bacteriol*; (1997); 47: 299-306
- Shimoda, K.** y Hirata, T.; Biotransformación of enones with biocatalysts –two enone reductases from *Astasia longa*; *J Molec Catalysis B: Enzymatic*; (2000); 8: 255-264
- Smith, P.K.**, Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Anal Biochem*; (1985) 150: 76-85. Erratum in: *Anal Biochem* (1987) 163: 279.
- Smoot, J.C.**, Barbian, K.D., Van Gompel, J.J., Smoot, L.M., Chaussee, M.S., Sylva, G.L., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Porcella, S.F., Parkins, L.D., Beres, S.B., Campbell, D.S., Smith, T.M., Zhang, Q., Kapur, V., Daly, J.A., Veasy, L.G. y Musser, J.M; Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; (2002) 99: 4668-4673
- Sugita, T.**, Nishikawa, A. y Shinoda.T.; Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR; *J Clin Microbiol*; (1998) 36: 1458-1460
- Sode, K.**, Karube, I., Araki, R. y Mikami Y.; Microbial conversion of  $\beta$ -ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent; *Biotechnol Bioeng*; (1989) 33: 1191-1195
- Somogyi, L.P.**; The flavour and fragrance industry: serving a global market; *Chemistry & Industry*; (1996) 4:170-173
- Somogyi, L.** y Kishi A.; Aroma Chemicals and the flavor and fragrance industry; *CEH report*; Agosto 2001
- Spizizen, J.**; Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate; *Proc Natl Acad Sci USA*; (1958) 44:407-408
- Tang, Y-X.** y Suga, T.; Characterization of two enone reductases from *Nicotiana tabacum* cell cultures; *Phytochemistry*; (1992) 31: 2599-2603
- Tang Y-X.** y Suga T.; Biotransformation of alpha- and beta- ionones by immobilized cells of *Nicotiana tabacum*; *Phytochemistry*; (1994) 37: 737-740
- Tayhas, G.**, Palmore, R., Bertschy, H., Bergens, S.H. y Whitesides, G.M.; Methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electroenzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials; *J Electroanal Chem*; (1998) 443: 155-161
- Wagner, K.H.** y Elmadfa, I.; Biological relevance of terpenoids; *Ann Nutr Metab*; (2003) 47: 95-106
- van der Werf M.**, y van der Ven C; Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14; *J Biol Chem*; (1999) 37: 26296-26304
- van der Werf M.** y Boot A.; Metabolism of carveol and dihydrocarveol in *Rhodococcus erythropolis* DCL14; *Microbiology*; (2000) 146, 1129-1141
- van Dyk, M.S.**, van Rensburg, E., Rensburg, I.P.B. y Moleleki, N.; Biotransformations of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi; *J Molec Catalysis B: Enzymatic*; (1998) 5: 149-154

**Wahlberg, I., Eklund, A.-M., Austin, D.J., Junker, N.; Roeraade, J., Enzell, C.R. y Johnson, W.H.;** Effects of flue-curing and ageing on the volatile, neutral and acidic constituents of Virginia tobacco<sup>1</sup> *Phytochemistry*; (1977); 16: 1217-1233

**Wahlberg, I.;** Carotenoid-derived aroma compounds in tobacco. En Winterhalter, P. y Rouseff, R. (eds) Carotenoid -derived aroma compounds (ACS Symposium Series 802); American Chemical Society; Washington D.C.(2002)

**Welsh, F.W., Murray, W.D. y Williams, R.E.;** Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals; *Crit Rev Biotechnol*; (1989) 9:105-169

**Winterhalter, P.;** Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects. En: Takeoka, G.R., Teranishi, R., Williams, P.J. y Kobayashi, A. (eds) Biotechnology for improved foods and flavors (ACS Symposium Series 637); American Chemical Society; Washington D.C.; (1996) pp 120-123

**Winterhalter, P. y Rouseff, R.;** Carotenoid -derived aroma compounds: an introduction. En Winterhalter, P. y Rouseff, R. (eds) Carotenoid -derived aroma compounds (ACS Symposium Series 802); American Chemical Society; Washington D.C.(2002) pp 1-19

**Xu, X.M., Koyama, N., Cui, M., Yamagishi, A., Nosoh, Y. y Oshima, T.;** Nucleotide sequence of the gene encoding NADH dehydrogenase from an alkalophile, *Bacillus* sp. strain YN-1; *J Biochem*; (1991) 109: 678-683

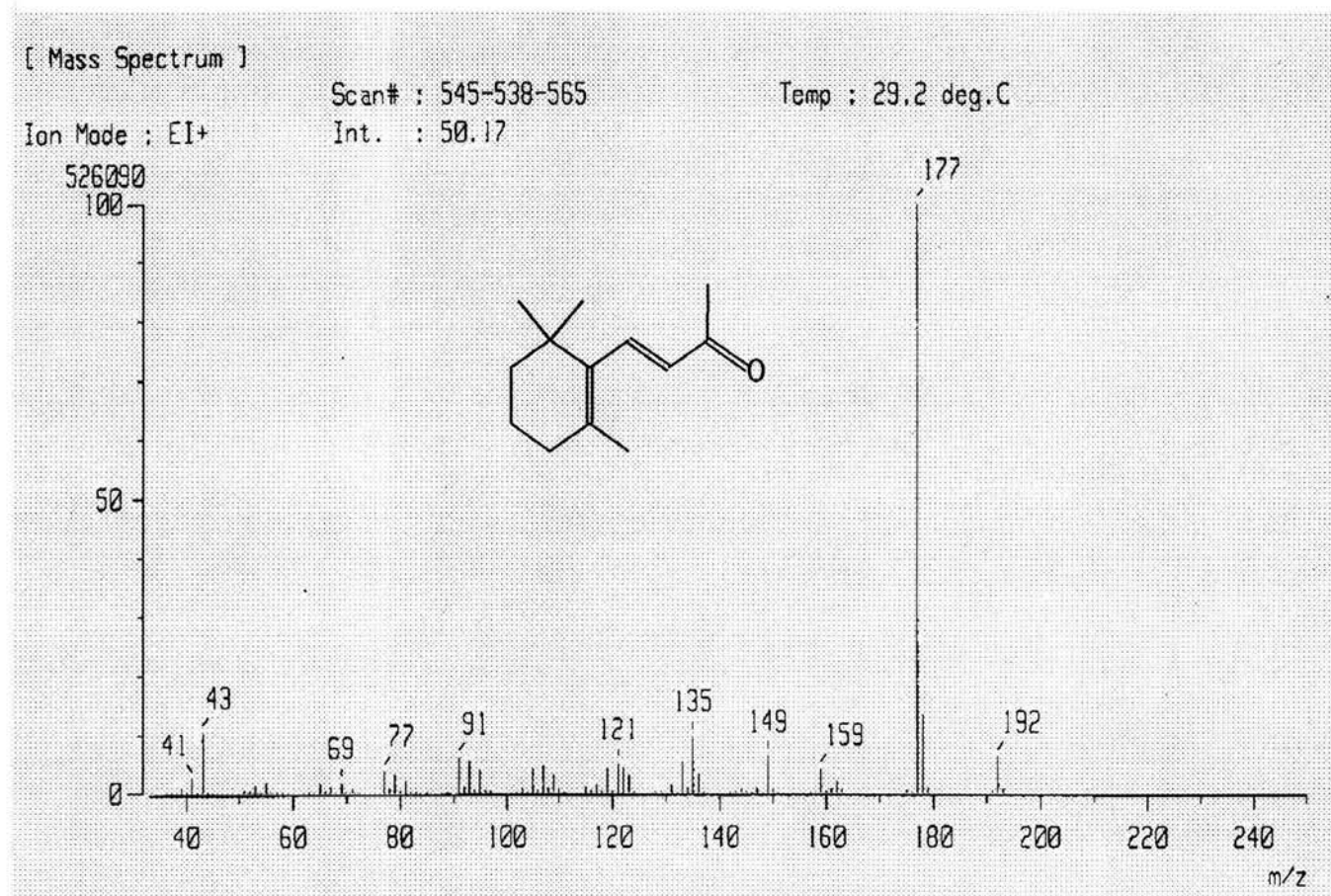


# Anexo

## Espectros de masas

---

### 1) $\beta$ -IONONA



$\beta$ -ionona: EM: m/z; 192 [M]<sup>+</sup>, 177/100 [M-Me], 149/ 8, 135/ 12, 93/ 7, 91/ 6.4, 43/ 26, 41/ 6

## 2) 7,8-DIHIDRO- $\beta$ -IONONA

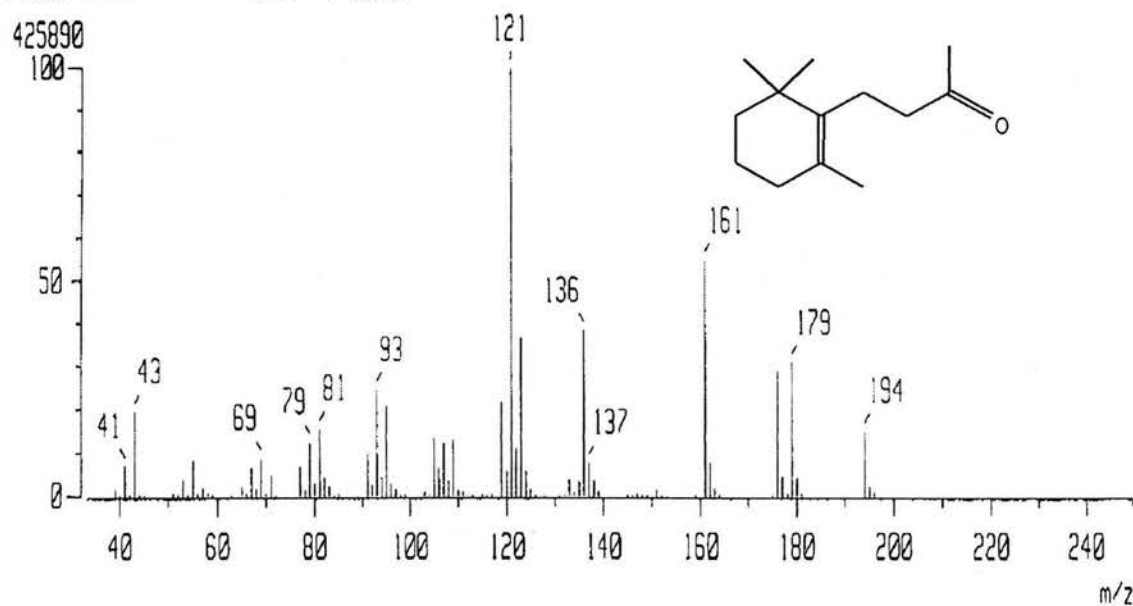
[ Mass Spectrum ]

Scan# : 531-513-539

Temp : 29.2 deg.C

Ion Mode : EI+

Int. : 40.62



7,8-dihidro- $\beta$ -ionona: EM: m/z; 194/ 15 [M]<sup>+</sup>, 161/ 45, 136/ 13, 121/ 100, 107/ 7, 93/ 30, 79/ 28, 41/ 28



### 3) COMPUESTO NO IDENTIFICADO

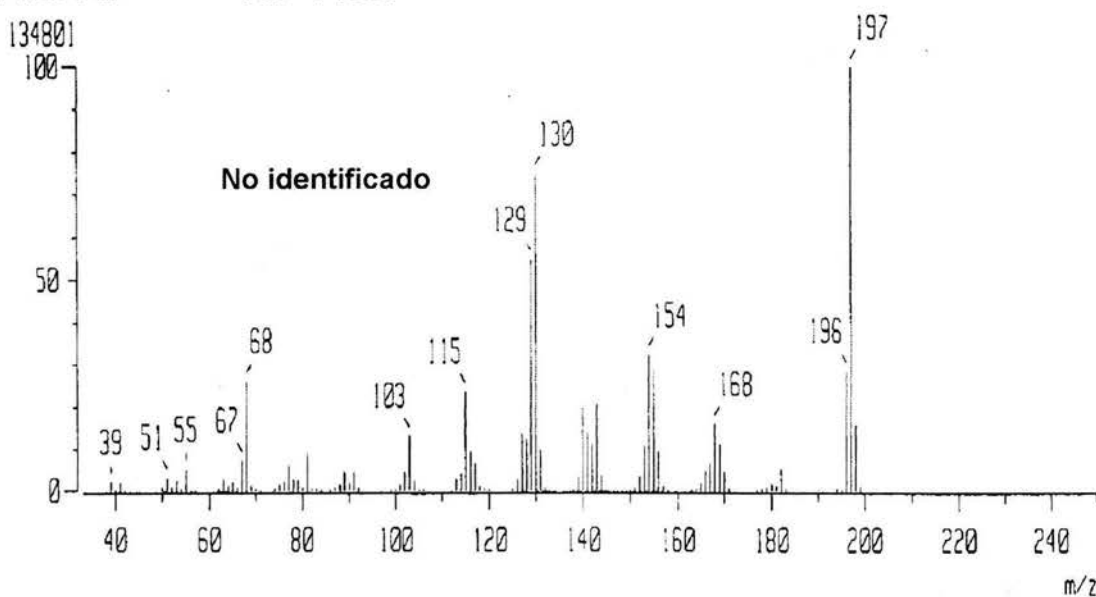
[ Mass Spectrum ]

Scan# : 681-675-701

Temp : 28.1 deg.C

Ion Mode : EI+

Int. : 12.86



Compuesto desconocido: EM: m/z; 198/ 15 [M]<sup>+</sup>; 197/ 100, 154/ 34, 130/ 78, 129/ 54, 115/ 23, 68/ 25, 55/ 5, 39/ 2