



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL USO BIOTECNOLÓGICO
DE LA SEMILLA DE *Ditaxis heterantha* PARA LA
PRODUCCIÓN DE SAFRANAL.**

T E S I S

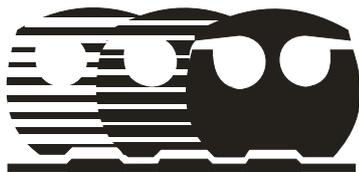
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA)**

P R E S E N T A

MARÍA CATALINA CÁRDENAS ASCENCIÓN

TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Sergio Sánchez Esquivel** en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria; Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México.

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

Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Montero	Instituto de Química, UNAM

El desarrollo de este trabajo fue financiado en parte por un donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT), proyecto: IN202707.

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

Esta tesis fue defendida en examen presentado en el mes de enero de 2009.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente:	Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal:	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Secretario:	Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Suplente:	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente:	Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM

Tutor:

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Sustentante:

María Catalina Cárdenas Ascención

∞ *AGRADECIMIENTOS* ∞

- A **la vida**, que me ha permitido alcanzar un sueño más, y compartirlo con todos mis seres queridos.
- Al **Dr. Sergio Sánchez Esquivel**, por su confianza y apoyo incondicional. Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Por su ejemplo académico y humano.
- A los integrantes del comité tutorial: **Dra. Amelia Farrés** y **Dr. Roberto Arreguín**, por sus aportaciones al proyecto y a mi formación profesional.
- A la **M. en B. Beatriz Ruiz**, por su apoyo moral y académico, por todos sus consejos y sugerencias académicas y personales, por estar ahí y generar un ambiente de trabajo de respeto y tolerancia y por tener toda la paciencia del mundo. ¡¡Gracias Betty!!
- A la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja**, por sus valiosos comentarios y su apoyo para concluir este trabajo.
- Al **E. en B. Marco Antonio Ortiz**, por su apoyo en la identificación de los microorganismos aislados y por su amistad.
- Al jurado de examen, por sus contribuciones para mejorar este trabajo.
- A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial por la oportunidad de conocerlos y de compartir gratos momentos.

∞ DEDICATORIAS ∞

Este trabajo está dedicado a mi familia, por su ejemplo de constancia y seguridad en la vida:

- ✧ A ti **mamá**, por enseñarme a defender mis ideales.

- ✧ A ti **papá**, por tu ejemplo de lucha.

- ✧ A mis hermanos, **Toño, Martha, Yaya, Marisol, Carlos y Diana**, porque la vida no podía darme mejores personas para compartir mi existencia, por ser mis mejores amigos y estar presentes en las buenas y en las malas, por su vitalidad.

- ✧ A **Vero, Alfonso, Daniel y Carlos**; por ser parte importante de mi familia y compartir vida y proyectos con mis hermanos.

- ✧ A **Ximena, Fernando, Sofía y Toñito**, mis sobrinos, que con su ternura y espontaneidad han traído alegría y vitalidad a toda la familia.

- ✧ Y a ti mi amor, por toda tu ayuda, apoyo y complicidad, por compartir la vida juntos y por tu ejemplo de entrega en todos tus proyectos. **Te amo Pablo.**

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
CAPITULO	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
5. ESTRATEGIA.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
8. CONCLUSIONES.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	69
10. REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura		Página
1	Rutas de las moléculas odoríferas.....	3
2	Localización de la región olfativa.....	4
3	Comportamiento de las 10 principales industrias de aromas a nivel mundial....	6
4	Longitud de onda que absorben los carotenoides.....	10
5	Comportamiento de la concentración de clorofila y algunos carotenoides en hojas de tabaco durante la senescencia.....	11
6	Biosíntesis del Fitoeno (Primer carotenoide C40).....	13
7	Propiedades de los carotenoides.....	16
8	Compuestos generados por la ruptura de carotenoides.	18
9	Flor de <i>Crocus sativus</i>	21
10	Origen de los principales constituyentes del azafrán.....	23
11	Distribución de <i>Ditaxis heterantha</i> en México.....	25
12	Semilla y endospermo de <i>Ditaxis heterantha</i>	26
13	Estructura molecular de Heteranthina y Ditaxina.....	28
14	Rutas propuestas en la biotransformación de heteranthina por <i>S. cerevisiae</i>	30
15	Diagrama general de trabajo.....	33
16	Estrategia de aislamiento de microorganismos consumidores de heteranthina..	45
17	Esquema de inoculación de antibiograma.....	49
18	Cinética de degradación de heteranthina (sistema de reacción).....	52
19	Cinética de degradación de heteranthina (extracción con solventes).....	54
20	Determinación cualitativa <i>in vitro</i> de degradación de heteranthina.....	55
21	Cinética de degradación de heteranthina <i>in vivo</i> . Extracción con solventes.....	56
22	Halos formados por la aparente biodegradación de la heteranthina.....	59
23	Degradación de heteranthina y crecimiento microbiano de K-38 y K-155.....	60
24	Micrografías de los microorganismos aislados.....	64
25	Antibiograma.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla		Página
1	Principales carotenoides presentes en la naturaleza.....	12
2	Efecto de la estructura en el color de los carotenoides.....	15
3	Compuestos con aroma derivados de carotenoides.....	19
4	Composición química de la semilla de <i>Ditaxis heterantha</i>	27
5	Punto de fusión de muestra y estándares usados.....	50
6	Valores de absorbancia y λ_{\max} de dos soluciones de heteranthina.....	62
7	Grados de inhibición en el antibiograma.....	66

RESUMEN

Un reflejo de la importancia actual de los aromas para uso industrial es el considerable aumento en su demanda. Este fenómeno, además de las actuales tendencias por el consumo de productos “naturales” y de las restricciones impuestas por algunos países en el uso de aditivos, ha encaminado a esta industria a la búsqueda de métodos alternos para su producción. Como respuesta, se ha impulsado la producción biotecnológica en esta área.

Un aroma muy cotizado en el mercado es el safranal, encontrado de forma natural en los estigmas de la flor de *Crocus sativus* (azafrán). El contenido de éste es el principal parámetro de calidad en el azafrán.

En un trabajo previo, realizado por Del Toro Sánchez en 2006 en el CIATEJ de Guadalajara, Jal., se logró aislar safranal como producto del consumo de una fracción oleosa de la semilla de *Ditaxis heterantha* por *Saccharomyces cerevisiae*. El safranal fue obtenido tanto *in vivo* como *in vitro* usando extractos intracelulares previamente crecidos en presencia y en ausencia de la fracción oleosa de la semilla. El mayor porcentaje de safranal fue obtenido cuando en el sistema de reacción se usó el extracto intracelular previamente crecido en ausencia de heteranthina.

Con base en los resultados previamente reportados, en el presente trabajo se planteó evaluar el potencial biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* en la producción de safranal.

Se probaron los sistemas *in vitro* e *in vivo* previamente reportados.

También se lograron aislar dos cepas presuntas degradadoras de la fracción oleosa de estudio, posteriormente identificadas como pertenecientes al género *Streptomyces*.

Así mismo, se evaluó la estabilidad del sustrato, ya que durante el desarrollo de los experimentos se observó inestable. Los resultados obtenidos mostraron que el sustrato de estudio es una **mezcla** muy inestable y de fácil degradación en las condiciones de trabajo.

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que la degradación que presenta la fracción oleosa en estudio no es debida a su consumo por los microorganismos sino a su inestabilidad en las condiciones de trabajo, además de que el bajo rendimiento en la extracción hace de esta semilla una materia prima no viable para la producción de safranal.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Los aromas en la historia

Los aromas han tenido un importante papel a lo largo de la historia de la humanidad. Las antiguas civilizaciones utilizaron flores, frutos, semillas, cortezas y resinas que tenían un olor agradable en el culto a sus dioses.

La gente ha usado en el cuerpo aceites y ungüentos aromáticos por miles de años. En Egipto se usaron bálsamos perfumados como parte de las ceremonias religiosas y más tarde como parte de la preparación nupcial.

Desde la antigüedad se ha usado la fermentación de manera empírica en alimentos como: pan, lácteos, cárnicos etc. para la modificación de sus características organolépticas (entre ellas sus aromas), para hacerlos más atractivos, teniéndose los primeros relatos de esta práctica en la Biblia.

Es durante la Edad Media cuando los alquimistas de Europa descubren el alcohol etílico y la destilación, y se inician las extracciones de sustancias aromáticas que, por su valor, en ocasiones fueron utilizadas como moneda.

Con los viajes de Marco Polo se generalizó el uso de extracciones de especias. Sus mezclas con flores, plantas, maderas, generaron una mayor diversidad de aromas. Las mezclas de los extractos obtenidos dieron origen a los perfumes, los cuales eran exclusivos para la gente de elevada posición económica.

Durante el siglo XIX se inició la producción y uso de aromas a nivel industrial con el aislamiento de mezclas de sustancias químicas, principales responsables del olor característico de productos naturales.

A principios del siglo XX, la industria de los aromas presenta un desarrollo considerable con el aislamiento de moléculas puras como el cinamaldehído, aislado del aceite de canela y el benzaldehído, aislado de las almendras. Sin embargo, es hasta el aislamiento, identificación y síntesis de la vainilla que se marcaron los inicios de la industria moderna de los sabores y aromas (Krings y Berger, 1998).

1.2 Percepción de aromas.

La percepción de los aromas es un proceso complejo en el que están involucrados tanto aspectos químicos, como biológicos y fisiológicos.

1.2.1 Características de una molécula con aroma

Los compuestos con aroma deben poseer ciertas propiedades moleculares para ejercer un estímulo sensorial. Laing y Jinks (1996) y posteriormente Leffingwell (2002) describen que las moléculas odoríferas deben:

- ser ligeramente hidrosolubles,
- tener una presión de vapor suficientemente alta,
- lipofílicos,
- bajo peso molecular (un máximo de 400).

Estas propiedades permiten ser acarreadas por el aire e interactuar en la región olfativa.

1.2.2 Rutas para la percepción de aromas.

En general, las moléculas odoríferas siguen dos rutas hasta ser percibidas:

- Ruta ortonasal: en ésta, los aromas son acarreados por el aire. La estructura de la nariz recibe y encausa el aire que contiene a las moléculas odoríferas hasta alcanzar la región olfativa.
- Ruta retronasal: las moléculas con aroma que entran por la boca, también acarreadas por el aire o por acompañar algo introducido en ella. Durante el proceso de la masticación los componentes volátiles son liberados y transportados por la nasofaringe a los receptores (Laing y Jinks, 1996). Ver Fig. 1.

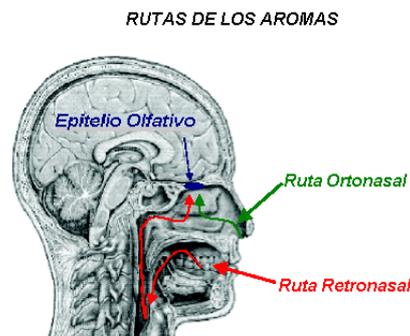


Fig. 1 Rutas de las moléculas odoríferas.

1.2.3 Fisiología de la percepción de aromas.

La percepción de los aromas se desarrolla de la siguiente manera:

Las moléculas odoríferas siguen la ruta orto-nasal o la retro-nasal, alcanzando la “región olfativa”, ésta se encuentra en la profundidad de la cavidad nasal, (Fig. 2),

es un área de apenas 2.5 cm^2 con un aproximado de unos 5 millones de neuronas receptoras, localizada en el techo de la cavidad nasal, en línea horizontal, justo debajo del nivel de los ojos.

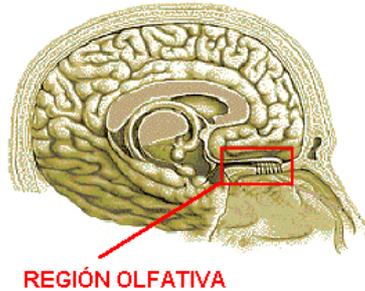


Fig. 2 Localización de la región olfativa.

El estímulo está mediado por proteínas embebidas en la membrana de las células receptoras. Diferentes moléculas con aroma pueden unirse a una proteína receptora particular con diferente afinidad. Cuando una molécula con aroma se une a la proteína receptora, la energía química es traducida a energía eléctrica. Las neuronas del epitelio olfativo se prolongan hasta el bulbo olfativo, donde se conectan con otras neuronas que conducen la señal hasta centros cerebrales donde se desencadenan las emociones y se almacenan los recuerdos (Laing y Jinks, 1996).

1.3 Uso de los aromas

La industria de los aromas ha desarrollado un nicho de mercado muy provechoso, por lo que su producción constituye un importante sector en la industria química. El campo de aplicación de los aromas es muy amplio y éstos son usados por las industrias de:

- ⇒ Alimentos procesados
- ⇒ Farmacia
- ⇒ Bebidas
- ⇒ Cosméticos

- ⇒ Artículos de tocador
- ⇒ Productos de limpieza
- ⇒ Perfumería, etc.

Particularmente en la industria de alimentos y bebidas, los productos son sometidos a diversas condiciones como: altas temperaturas, valores de pH extremos, etc. durante los cuales se alteran sus propiedades originales. Dentro de dichas alteraciones, se pierden una gran cantidad de componentes aromáticos modificando sus propiedades sensoriales, lo cual origina productos poco atractivos al consumidor. El uso de aditivos es una alternativa para restaurar y/o mejorar las propiedades sensoriales del producto final. Es en esta industria donde los ingredientes que proporcionan aroma y sabor comprenden el mayor porcentaje de aditivos empleados.

Durante la última década se ha manejado el término de "aromas corporativos", refiriéndose a aromas que proporcionan identidad y ayudan a ambientalizar ciertas situaciones y lugares, por lo que la industria de los aromas ha expandido su mercado convirtiéndose en un señuelo de la mercadotecnia, debido a la constante búsqueda de productos con mayor aceptación.

1.4 Comportamiento del mercado de aromas

Durante las últimas dos décadas se ha observado un constante crecimiento en el mercado mundial de la industria de aromas y sabores. El mercado total de aromas está estimado en €6.5 billones. La demanda más grande se centra en Europa, África y la región del Medio Oriente con un 36% del mercado total, le siguen Norte América con 32%, Asia y Pacífico con 26% y finalmente Sudamérica con 6% (Berger; 2007).

En un estudio reciente se mostró que las diez principales industrias de aromas a nivel mundial presentan un considerable crecimiento en su demanda al tiempo que

disminuye su presencia en el mercado total. Dichos resultados nos hablan de la creación de nuevas empresas en este ramo. Ver fig. 3 (Estimación obtenida hasta Febrero 11, 2008, Fuente: www.leffingell.com)

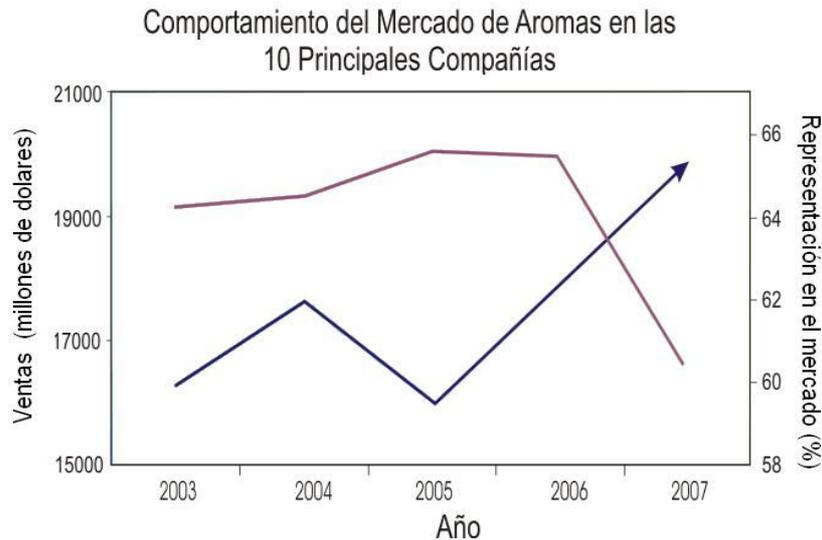


Fig. 3 Comportamiento las 10 principales industrias de aromas a nivel mundial.

Fuente: www.leffingell.com

1.5 Métodos de producción de aromas

Tradicionalmente la obtención de aromas y sabores se ha llevado a cabo por medio de extracciones de productos naturales o por síntesis química.

1.5.1 Extracción de productos naturales

La extracción de productos naturales ha sido el método más utilizado para la obtención de aromas y/o sabores. Es un proceso de bajo rendimiento incapaz de cubrir la tendencia de demanda y su aplicación es fuertemente dependiente de la disponibilidad de la materia prima (flores, frutos, cortezas, etc.) la cual, a su vez, depende de las condiciones ambientales, de estaciones climatológicas e incluso de intereses políticos por lo que representa un alto costo que se ve reflejado en el precio final del producto.

En los procesos de extracción frecuentemente se requieren grandes cantidades de solventes algunas veces difíciles de eliminar al 100%, además de ser un proceso perjudicial para el ambiente.

1.5.2 Síntesis química

La síntesis química representó en su momento una buena alternativa para la obtención de aromas y/o sabores que cubrieran la demanda de la industria de manera autosuficiente, ya que este método es independiente de que las condiciones ambientales sean favorables para la materia prima. Sin embargo, durante la síntesis se presentan mezclas racémicas difíciles de separar y que en ocasiones presentan características indeseables en el producto final y algunas veces estas características son antagónicas con el producto deseado. La FDA indica que cuando en la síntesis de aditivos se obtienen mezclas racémicas, se deben hacer evaluaciones toxicológicas de cada una de ellas.

Otro inconveniente que presentan los productos obtenidos por este método es la restricción de su uso en países de la Unión Europea y Estados Unidos, además de la tendencia del mercado mundial, que durante las últimas dos décadas presenta un incrementado interés por productos “naturales” u “orgánicos”. Este escenario ha generado un mayor interés científico e industrial por la búsqueda de procesos alternos de producción de aromas que satisfagan las características y volumen de la demanda. Es bajo estas circunstancias que la biotecnología se ha presentado como una alternativa interesante para la producción de aromas.

1.5.3 Producción Biotecnológica de aromas

La biotecnología es la aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. De acuerdo con esta definición, los procesos

INTRODUCCIÓN

biotecnológicos pueden involucrar el uso de tejidos, microorganismos vivos, extractos de éstos o enzimas puras obtenidas de éstos.

Para la producción de bio-aromas se han usado cultivos de células de plantas, microorganismos y enzimas puros (Damasceno et al., 2003).

De acuerdo con el Código de Regulación Federal de Estados Unidos (CFR por sus siglas en Inglés) en el capítulo 21 que aplica a drogas y alimentos, en la fracción 101.22 que regula los requerimientos del etiquetado de aditivos; y su homólogo Council Directive on Flavorings EC Flavour Directive 88/388/EEC de la Comunidad Europea, los productos obtenidos por medio de la biotecnología, son etiquetados como “**Naturales**”. Esta designación establece una ventaja competitiva de mercado sobre los productos obtenidos por métodos tradicionales, debido a la mayor aceptación y preferencia por parte de los consumidores.

Los aromas obtenidos por métodos biotecnológicos presentan además otras ventajas:

- Las reacciones involucradas son altamente selectivas (químico, regio y estereo específicas),
- Parten de materia prima natural/ fuentes renovables,
- Son amigables con el ambiente y sustentables (Berger, 2007).
- La producción se puede ampliar a nivel industrial sin la limitante de la disponibilidad de la materia prima.
- El costo del producto final disminuye debido a la posibilidad del uso de ingeniería genética para aumentar la eficiencia en los procesos.

En la actualidad, la producción biotecnológica de compuestos con aroma y/o sabor es una disciplina perfectamente establecida en la industria química, con un estimado de 100 moléculas en el mercado mundial producidas por procesos microbianos o enzimáticos (Berger, 2007). Un aumento en el número de

publicaciones y patentes refleja el interés científico y tecnológico en el uso de la biotecnología para producir compuestos volátiles de aroma y sabor, que cubran las demandas de los consumidores.

1.6 Origen de moléculas odoríferas

En la naturaleza, los aromas son derivados de una amplia variedad de moléculas. Un gran porcentaje deriva de la degradación de estructuras más complejas. Se han detectado moléculas odoríferas derivadas de la degradación de: proteínas, ácidos grasos, carbohidratos entre otros, además se ha encontrado que un alto porcentaje deriva de la degradación de carotenoides.

1.7 Los carotenoides

Los carotenoides son una familia de pigmentos naturales liposolubles, formados por hidrocarburos poliénicos de hasta ocho unidades isoprenoides (tetraterpenos). Son los responsables de la extensa variedad de colores en la naturaleza y van del amarillo claro al rojo intenso. El color es generado por la presencia de “dobles enlaces conjugados” (d.e.c.) correspondientes al cromóforo, responsable de la capacidad de absorber la luz en la región del visible y en consecuencia de su gran capacidad de coloración (Fig. 4). También la presencia de d.e.c. es responsable de su reactividad, forma, localización en estructuras subcelulares y de su papel en procesos de transferencia de energía (Meléndez et al., 2007).

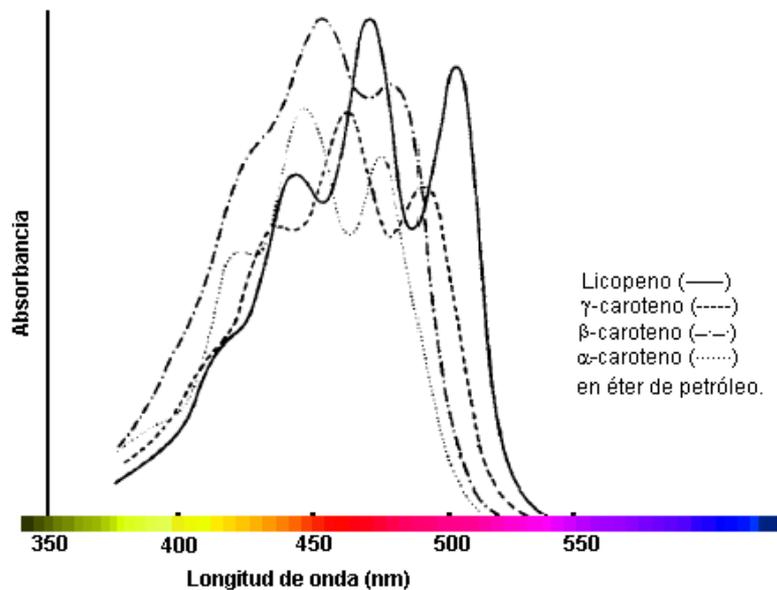


Fig. 4 Longitud de onda que absorben los carotenoides. En el eje "X" se muestra la gama de colores que reflejan. Fuente: Meléndez et al., 2007.

1.7.1 Distribución y estado natural

Los carotenoides son un grupo de moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se han encontrado en microorganismos, plantas y animales. Una fuente rica en carotenoides son las algas, ya que se han reportado más de 100 carotenoides aislados y caracterizados de esos organismos. Sin embargo, hasta el momento la fuente de carotenoides más importante es la flora. Los carotenoides se encuentran principalmente distribuidos en las partes aéreas; en hojas, tallos, flores y frutos y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria). Son los responsables del llamativo color de flores (jacintos, rosas, tulipanes, etc.) y frutas (piñas, naranjas, uvas, jitomates, etc). Normalmente sus brillantes colores característicos son enmascarados por los pigmentos verdes de la clorofila. Los colores observados de los carotenoides varían según la etapa en la que se encuentren las plantas. Durante la senescencia, el contenido de carotenoides y clorofila decrece drásticamente, sin embargo, a diferencia de la clorofila, los carotenoides no decrecen hasta extinguirse, por lo que su presencia es responsable del color en esta etapa (Fig. 5).

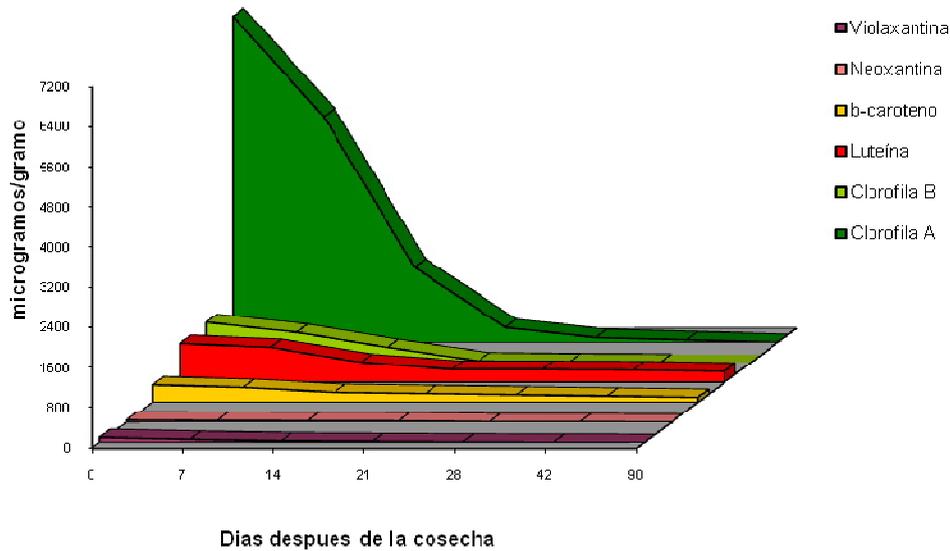


Fig. 5 Comportamiento de la concentración de clorofila y algunos carotenoides en hojas de tabaco durante la senescencia. Fuente: www.leffingell.com

En los animales no se ha observado síntesis de carotenoides, sin embargo éstos están presentes y son responsables del color de aves como flamings y canarios, de algunos insectos y animales marinos como crustáceos y salmón, por mencionar algunos. La fuente de carotenoides de todos éstos es la alimentación y son acumulados en los tejidos.

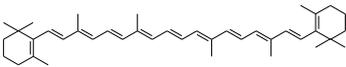
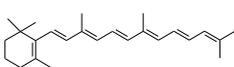
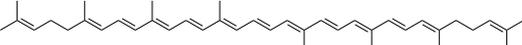
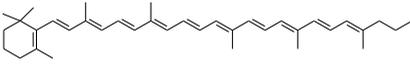
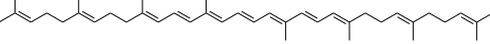
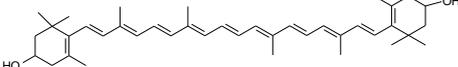
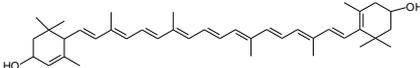
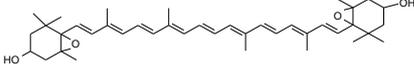
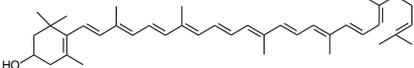
La intensidad y matiz de los colores de plantas y animales dependen de cuáles carotenoides están presentes, sus concentraciones y estado (libres, asociados a proteínas o lípidos, etc).

Normalmente los carotenoides están presentes en bajas concentraciones, pero esto varía enormemente de una fuente a otra. Se ha estimado la producción total de carotenoides en la naturaleza en casi 100, 000,000 toneladas anuales.

INTRODUCCIÓN

El caroteno más comúnmente encontrado es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25-30 % del contenido total de carotenoides en las plantas. La luteína es la xantofila más abundante (40-45 %), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno (Meléndez et al; 2004).

Tabla 1.- Principales carotenoides presentes en la naturaleza.

Nombre común	Formula
β - caroteno	
α -caroteno	
Licopeno	
γ -caroteno	
ζ -caroteno	
Zeaxantina	
Luteína	
Violaxantina	
Rubixantina	

Fuente: Meléndez et al; 2004

1.7.2 Biosíntesis

Químicamente la mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono, que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico a través de dos unidades C_{20} de geranyl-geranylpirofosfato (GGPP). Generalmente se sintetizan y acumulan en los cromoplastos y forman estructuras globulares y fibrilares junto con proteínas (Van Der Beg et al., 2000).

INTRODUCCIÓN

Se forman por la condensación de ocho unidades isoprenoides unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula. Es decir, la unión de dichas unidades es "cabeza-cola", excepto en el centro de la molécula, donde es "cabeza-cabeza". Debido a ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena poliénica están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto están separados por cinco.

A pesar de su diversidad, todos los terpenoides son sintetizados de precursores comunes: la biosíntesis inicia a partir de la condensación de tres moléculas de acetil CoA vía mevalonato (AMV) para producir el intermediario isopentil difosfato (IPP) de cinco átomos de carbono. El IPP se isomeriza a dimetil alil difosfato (DMAPP), ambos pueden condensarse con IPP para dar el intermediario C₁₀ geranyl difosfato (GPP). Una condensación de GPP con IPP genera al intermediario C₁₅ farnesil difosfato (FPP). Y la condensación de IPP con FPP da el intermediario C₂₀ geranyl geranyl difosfato (GGPP). Para formar el fitoeno se condensan dos moléculas de GGPP (Fig. 6).

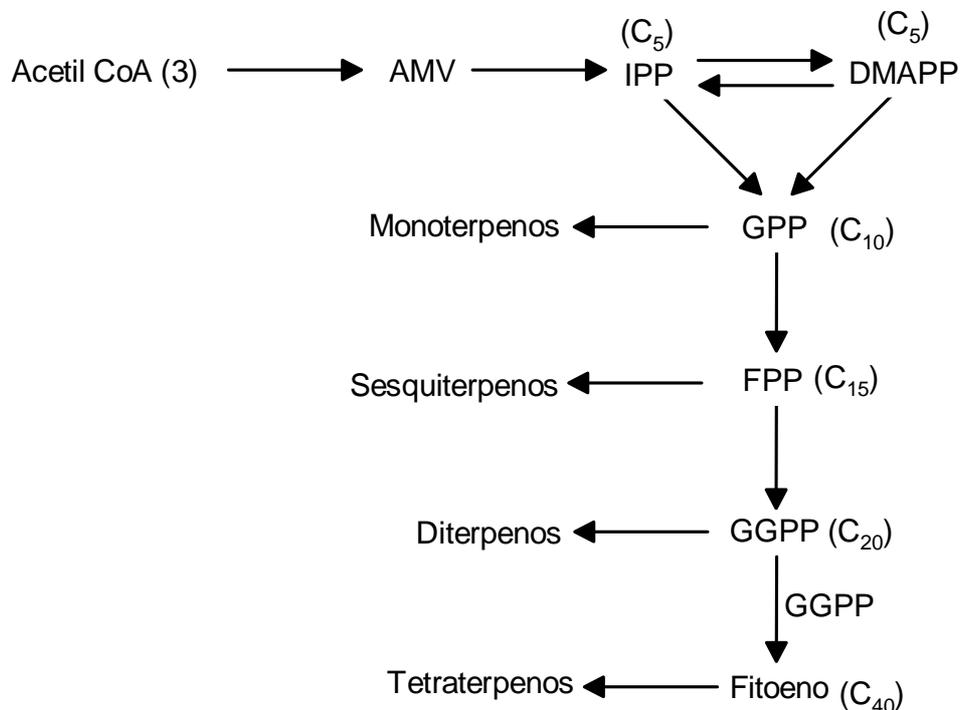


Fig. 6: Biosíntesis de Fitoeno (primer carotenoide C₄₀).
Fuente: Gross, 1991.

El fitoeno es el primer carotenoide C₄₀. A partir de él se generan diversos carotenoides. El licopeno se forma a través de una deshidrogenación progresiva. Mediante cada secuencia de deshidrogenación, el cromóforo se extiende con dos dobles enlaces alternadamente en cada lado (Gross, 1991).

Algunos carotenoides son acíclicos y algunos sufren ciclaciones por una terpeno ciclasas, en uno o ambos extremos de la molécula.

La introducción de grupos hidroxilo y epoxi ocurre después de la ciclación como último paso de la biosíntesis cuando los carotenos son oxidados. La hidroxilación ocurre principalmente en el C-3 en uno o ambos anillos cuando se forman la mayoría de las xantofilas, pero también puede ocurrir en otras posiciones del anillo o de la cadena (Gross, 1991).

1.7.3 Características

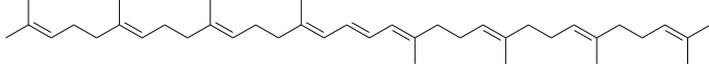
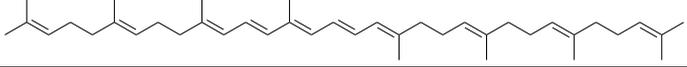
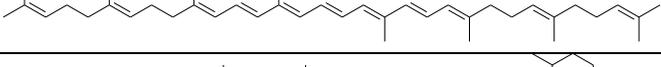
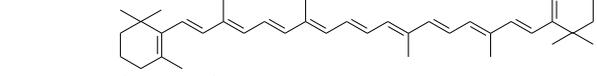
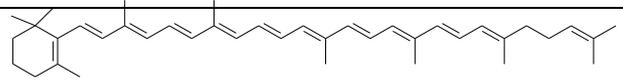
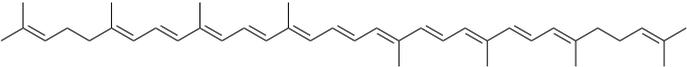
El sistema de d.e.c. de las moléculas de carotenoides es responsable de su intenso color. Para que estos pigmentos tengan una coloración perceptible son necesarios al menos siete d.e.c. Así, el ζ -caroteno (7 d.e.c.) es amarillo pálido, mientras que fitoeno (3 d.e.c.) y fitoflueno (5 d.e.c.), son incoloros (Simpson, 1985).

El color se acentúa a medida que se extiende el sistema conjugado. La ciclación causa algún impedimento, por tanto el β -caroteno y el γ -caroteno son de color naranja y rojo-naranja respectivamente, aunque tienen el mismo número de dobles enlaces conjugados que el licopeno (Tabla 2).

La asociación de carotenoides con proteínas estabiliza a los pigmentos, además de extender el rango de colores a verde, azul y púrpura. Así, el máximo de absorción de astaxantina en acetona es 478 nm, mientras que el de la α -crustacianina es 632 nm, de ahí su coloración azulada.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2: Efecto de la estructura en el color de los carotenoides.

Carotenoide	Estructura	# d.e.c.	Color
Fitoeno		3	Incoloro
Fitoflueno		5	Incoloro
ζ-caroteno		7	Amarillo suave
β-caroteno		11	Naranja
γ-caroteno		11	Rojo naranja
Licopeno		11	Rojo

Analíticamente, el color de los carotenoides es de gran importancia, ya que un cambio de color durante el análisis es indicativo de degradación o de modificación estructural de los pigmentos. De igual forma, el color permite monitorear su separación mediante cromatografía en columna y en capa fina.

La presencia de d.e.c. no sólo afecta a las propiedades de absorción de luz y por tanto al color de los carotenoides, éstos presentan otras características también derivadas de los d.e.c. como reactividad frente a radicales, reactividad con el oxígeno del aire y efectividad en los procesos de transferencia de energía dentro del aparato fotosintético.

Otra característica de los carotenoides es su hidrofobicidad, lo cual determina la localización de éstos en las células.

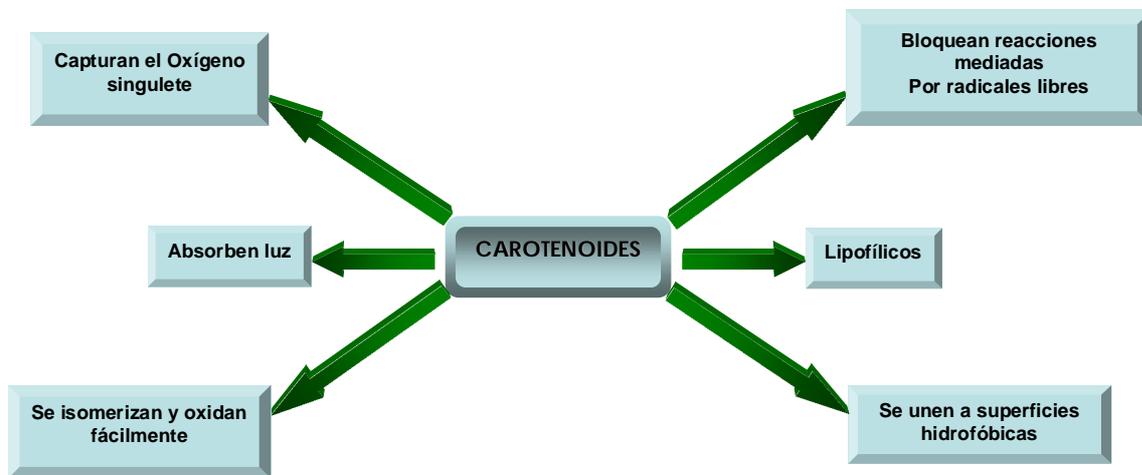


Fig.7 Propiedades de los carotenoides

1.7.4 Clasificación y nomenclatura

Existen dos grandes formas de clasificación de los carotenoides:

Considerando los elementos químicos presentes en sus moléculas, los carotenoides se dividen en dos grupos: carotenos, que son hidrocarburos, y xantofilas, que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo (zeinoxantina, lactucaxantina, etc.), metoxilo (esferoidenona, espiriloxantina, etc.), epóxido (anteraxantina, licopeno-1,2-epóxido, etc.), carbonilo (capsantina, esferoidenona, etc.) o carboxilo (norbixina, neurosporaxantina, etc.), principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos (fucoxantina, dinoxantina, etc.), lactonas (peridinina, uriólido, etc.) y sulfatos (caloxantina-3-sulfato, nostoxantina-3-sulfato, etc.).

Una clasificación más amplia, que además de considerar los elementos químicos en la molécula, considera las formas más frecuentemente encontradas, subdivide a los carotenoides como sigue:

- **lineales**, que corresponden a estructuras como licopeno

- **no lineales**, los cuales presentan uno o ambos extremos formando anillos como α -caroteno, β - caroteno, γ - caroteno
- **xantofilas**, que contienen oxígeno en su estructura como luteína, zeaxantina, anteraxantina y
- **apocarotenoides**, los cuales corresponden a moléculas derivadas de la ruptura oxidativa de carotenoides como retinal.

A los carotenoides generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de los anillos laterales, en especial la posición del doble enlace. El β -caroteno, hoy es denominado β,β -caroteno, para indicar que los dos anillos de los extremos tienen el enlace doble en la misma posición relativa. El α -caroteno se denomina β,ϵ -caroteno.

En general para los carotenos se usa el sufijo caroteno y para las xantofilas, el sufijo "ina".

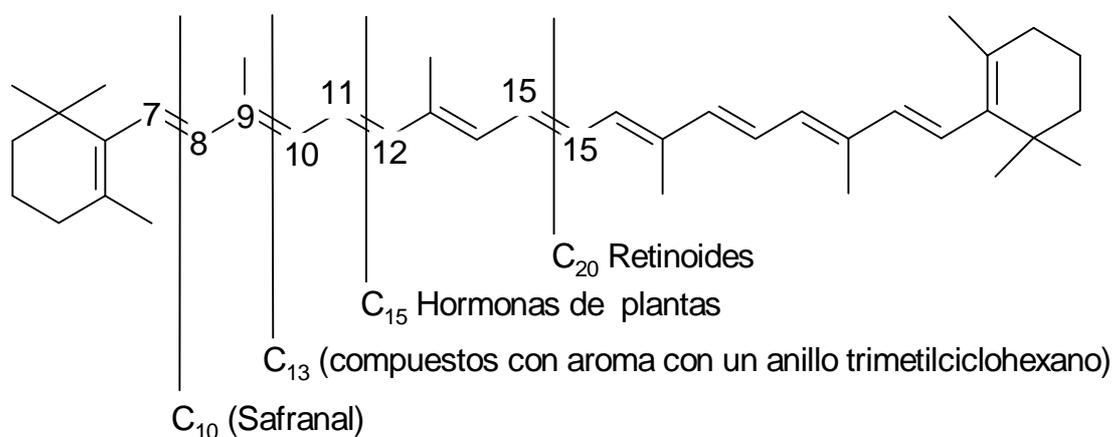
1.8 Los carotenoides como precursores de aromas

Como se ha mencionado en el punto 1.6, un gran número de moléculas odoríferas tienen origen en la degradación de carotenoides.

La mayoría de compuestos con aroma aislados de la naturaleza, presentan estructuras de terpenoides. Aparentemente, los terpenoides no son sintetizados *de novo*, y los estudios que se tienen indican que éstos provienen de la degradación de carotenoides (apocarotenoides).

Hasta hoy, el principal uso dado a los carotenoides ha sido como colorantes, sin embargo ahora se está poniendo especial énfasis a los componentes obtenidos de la ruptura de éstos.

Su degradación genera moléculas de gran interés como: retinoides, hormonas de plantas, compuestos con aroma etc. (Winterhalter, 1996) (Fig. 8).



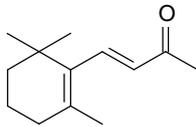
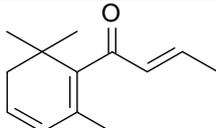
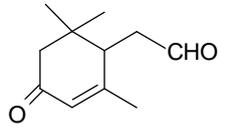
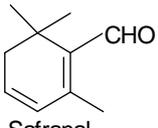
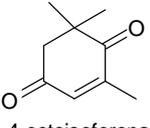
Winterhalter (1996)

Fig. 8 Compuestos generados por la ruptura de carotenoides

A partir de la ruptura de carotenoides en la posición 9-10, se obtienen moléculas con las características mencionadas en el punto 1.2.1, (moléculas odoríferas).

Las diferentes moléculas con aroma encontradas en la naturaleza derivadas de carotenoides son compuestos C₁₃, C₁₁, C₁₀ y C₉ formados vía la oxidación enzimática y la foto oxidación de los muchos carotenoides encontrados en las plantas, flores y frutos. Los compuestos C₉ a C₁₃ son los esenciales en muchos de los perfiles de aromas. Estos compuestos han sido identificados y aislados de diversas fuentes.

Tabla 3.- Compuestos con aroma derivados de carotenoides.

Número de carbonos	Compuestos con aroma	Fuentes
C ₁₃	 β -ionona	Rosa, té negro, fresa, tabaco, mango.
	 β -damascenona	Chabacano, carambola, uva, mango, zarzamora
C ₁₁	 Isoforona-4-acetaldehido	Té negro, tomate, tabaco
C ₁₀	 Safranal	Té negro, jugo de uva, azafrán
C ₉	 4-cetoisoforona	Té negro y azafrán

Fuente: Elaborada con información reportada por Enzell, 1985.

1.9 Mecanismos de degradación de carotenoides

Existen diferentes mecanismos por los cuales la ruptura de carotenoides genera moléculas odoríferas. Comúnmente éstos son generados cuando un doble enlace en la estructura del carotenoide es roto con oxígeno molecular formando un aldehído o cetona en el sitio de corte.

Los apocarotenoides pueden ser generados por mecanismos no específicos vía co-oxidación, peroxidación y foto oxidación, pero un contribuyente principal de la formación de compuestos activos biológicamente es una clase de enzimas

conocidas como CCD's (Carotenoid Cleavage Dioxygenase). Las CCD's producen apocarotenoides activos biológicamente en plantas y animales, estos tienen muchas funciones importantes incluyendo la formación de moléculas señal en plantas, compuestos volátiles con aroma y sabor y la formación de retinoides con funciones fisiológicas y de desarrollo (Schwartz, 2001).

1.9.1 Ruptura Enzimática de carotenoides

El uso de mecanismos enzimáticos para la obtención de los productos a partir de carotenoides presenta ventajas con respecto al uso de degradación térmica y de foto-oxidación, debido a que estas últimas no son específicas y resulta difícil obtener compuestos de interés puros.

La degradación enzimática de los carotenoides puede realizarse adicionando directamente la enzima de interés en el sistema de reacción o con el uso de sistemas microbianos. Este último involucra un menor costo, debido a que no se requiere de la purificación de la enzima requerida.

Las dioxigenasas CCD's rompen oxidativamente los carotenoides en apocarotenoides. Han sido identificadas en plantas y animales y producen una amplia variedad de productos. Los apocarotenoides obtenidos son estructuralmente diversos, resultado del gran número de precursores carotenoides (han sido identificados más de 600), de los distintos sitios de corte y de las modificaciones subsecuentes a la ruptura.

Algunos apocarotenoides ya tienen importancia económica como pigmentos y también como sabores y aromas, como es el caso de la bixina, la cual es usada en una variedad de alimentos. Este apocarotenoide es encontrado en la cubierta de la semilla *Bixa orellana*, y es el producto de la ruptura de las moléculas de licopeno. De igual forma, la crocetina es un apocarotenoide que se origina de la ruptura de

zeaxantina, un carotenoide encontrado en el pistilo de *Crocus sativus* (Méndez-Robles et al., 2006).

Si bien el primer reporte de enzimas que rompen carotenoides fue publicado hace 60 años, el conocimiento acerca de la cinética, estructura de las proteínas y mecanismo de reacción de las carotenasas ha progresado lentamente. Los mecanismos de reacción enzimática de estas enzimas son aun debatidos y la elucidación de las principales rutas de biodegradación de carotenoides permanece sin resolver (Winterhalter y Rouseff, 2002).

Los compuestos con aroma derivados de carotenoides son de gran interés a la industria de alimentos y perfumes. Sin embargo, su extracción a partir de productos naturales frecuentemente es difícil y costosa. La ruptura de los carotenoides por procesos enzimáticos presenta un gran interés debido a la especificidad de sustrato y la reducción del tiempo de producción.

1.10 El azafrán

El azafrán es una fuente potencial del carotenoide zeaxantina. Son los estigmas deshidratados de las flores de *Crocus sativus* y es la especia más cara usada a nivel mundial (Zougagh et al., 2006; Lozano et al., 2000).

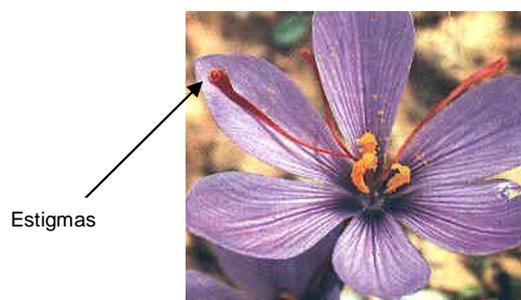


Fig. 9 Flor de *Crocus sativus*. En la imagen se señalan los estigmas (azafrán).

INTRODUCCIÓN

Es producido en la India, Irán, España y Grecia, con España como el principal productor.

La calidad de la especie, varia dependiendo del lugar de producción. Su valor está determinado por la existencia de tres principales metabolitos secundarios:

1. La crocina y sus derivados, una familia de carotenoides de color rojo, solubles en agua, responsables del color.
2. La picrocrocina, un glicósido incoloro del aglicon 4-hidroxi-2,6,6-trimetil-1-carboxaldehido-1-ciclohexeno (HTCC), responsable del sabor amargo característico del azafrán.
3. El safranal, principal componente del aceite esencial y responsable del característico aroma del azafrán, formado por la hidrólisis del glicósido amargo picrocrocina y del HTCC durante el proceso de secado del azafrán. Como éste compuesto no está presente en los estigmas frescos, su concentración depende fuertemente del segado y de las condiciones de almacenamiento (Lozano et al., 1999; Lozano et al., 2000; Zougagh et al., 2006) y por subsecuentes deshidratación química o enzimática de la picrocrocina (Zougagh et al., 2005). El safranal representa el 70% de los volátiles totales (Leffingwell, 2002).

La cantidad de estos compuestos en los estigmas secos es el principal indicador de la calidad de esta especie (Loskutov et al., 2000; Leffingwell, 2002).

Curiosamente, los tres principales compuestos característicos del azafrán, son derivados de la ruptura oxidativa de una misma molécula de zeaxantina (Fig. 10).

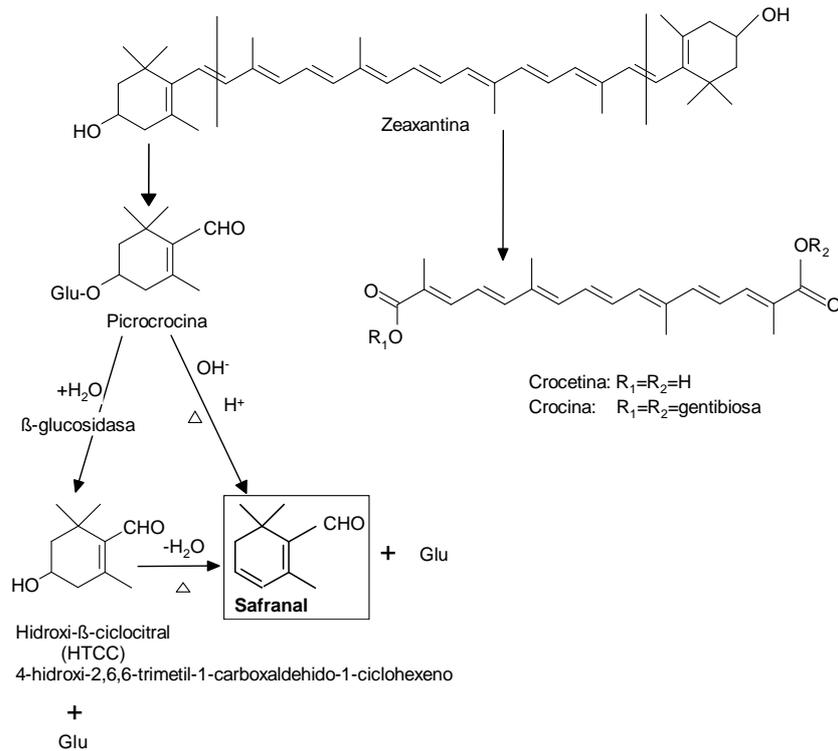


Fig. 10 Origen de los principales constituyentes del azafrán.

Su principal aplicación es como aditivo para dar sabor y color a los alimentos.

Cada flor de *Crocus sativus* produce tres estigmas. El peso de un estigma seco es de aproximadamente 2 mg, por lo que se requieren aproximadamente 500,000 estigmas para producir un kg de la especie; aproximadamente 150,000 flores deben ser cuidadosamente escogidas para la producción de 1 kg de la especie.

Escoger 1000 flores requiere de 45 a 55 minutos, en tanto toma de 100 a 130 minutos removerles los estigmas para secarlos, lo que equivale a un aproximado de 370- 470 horas de trabajo para producir un kilogramo de azafrán seco. Consecuentemente, el azafrán sigue siendo la especie más cara en el mundo. Winterhalter y su grupo en el 2000 reportan un valor de US \$1000-2000/Kg y una producción mundial de aproximadamente 50,000 kilogramos en el 2002 (Winterhalter et al., 2002).

INTRODUCCIÓN

El safranal se ha establecido como un importante componente del aroma en la industria de los alimentos y su principal fuente (*Croccus sativus*) es insuficiente para cubrir la demanda a nivel industrial (Pfander y Schurtenberger, 1982).

Por lo anterior, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas para la producción de safranal las cuales permitan cubrir la demanda del mercado actual.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Ditaxis heterantha*

Ditaxis heterantha (azafrán de bolita) es una planta endémica de México. Es un arbusto el cual crece a una altitud de 1600 a 2200 m sobre el nivel del mar y entre 16° y 23° latitud norte y 99° y 136° longitud este. Crece en las regiones semiáridas en bastos suelos arenosos en forma silvestre. Se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Sinaloa, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, Guerrero, Zacatecas y Michoacán (Méndez et al., 2004) (Ver figura 11).

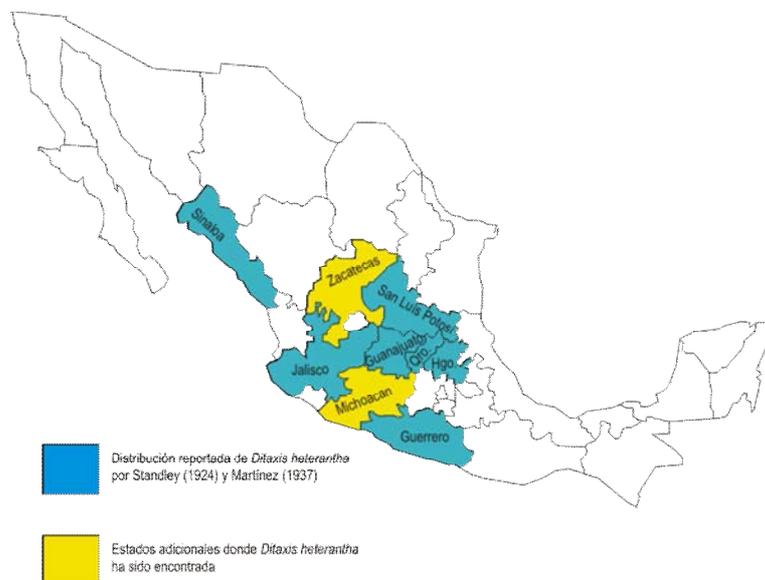


Fig. 11 Distribución de *Ditaxis heterantha* en México
(Méndez-Robles et al., 2004)

ANTECEDENTES

Las semillas tienen propiedades similares al azafrán, son productoras de un color amarillo. Son utilizadas por los habitantes de las regiones donde crece, para dar aroma, color y sabor a los alimentos. El endospermo de las semillas presenta un característico pigmento amarillo de carotenoides (Méndez-Robles et al., 2004).

Su distribución es aun limitada debido a que su uso es prácticamente artesanal.

El fruto es una cápsula verde de tres cavidades y las semillas son negras o café oscuro según su madurez.



Fig. 12 Semilla y endospermo de *Ditaxis heterantha*.

Su cultivo no requiere de atenciones especiales y su crecimiento es factible en regiones semiáridas. Recientemente se ha iniciado su cultivo en forma local, sin embargo, la planta no ha sido cultivada extensivamente aun cuando puede representar un cultivo con potencial económico (Méndez-Robles et al., 2004).

2.1.1 Composición química de la semilla de *Ditaxis heterantha*

En un estudio llevado a cabo por Méndez-Robles et al. (2004), se realizó un análisis de la composición química de semillas producidas en 3 estados de la República. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

ANTECEDENTES

Tabla 4. Composición química de la semilla de *Ditaxis heterantha*

Componente (%)	Lugar Huichapan Hidalgo	Totatiche, Jalisco	Cuquio, Jalisco	Moyahua, Zacatecas	Guadalajara, Jalisco
Aceite	38.4	42.3	36.9	35.1	39.0
Proteína	23.7	15.3	21.4	20.22	19.7
Fibra cruda	27.7	21.0	22.7	26.80	21.2
Humedad	6.0	3.6	4.0	4.35	3.5
Ceniza	2.6	2.6	2.5	2.32	2.4

Méndes-Robles, 2004

El estudio indicó la presencia de un alto contenido de compuestos hidrofóbicos.

El endospermo de *Ditaxis heterantha* de color amarillo intenso, sugirió la presencia de pigmentos de la familia de los carotenoides y se estableció que éstos pueden ser utilizados como fuente de pigmentos naturales (Méndez-Robles et al., 2004).

Con el objetivo de evaluar los componentes presentes en el endospermo, se llevó a cabo la extracción de su fracción oleosa usando hexano como medio de extracción. El extracto obtenido fue desengrasado obteniéndose el pigmento total (Méndez-Robles et al., 2004).

En la separación del pigmento total mediante cromatografía de columna abierta se lograron identificar siete fracciones, de las cuales dos de ellas (F4 y F5) están presentes en mayor proporción (80%) (Méndez-Robles et al., 2004).

Las fracciones mayoritarias fueron identificadas, por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, como: metil 3-oxo-12'-apo- ϵ -caroten-12'-oato, de 26 átomos de carbono (F4) y metil-3- β , 6- β -epoxi-5 β -hidroxi-4,5-dihidro-8'-apo- ϵ -caroten-8'-oato, de 31 (F5) (Méndez Robles et al., 2005).

ANTECEDENTES

Las dos fracciones han sido químicamente caracterizadas como apocarotenoides y llamadas heteranthina (F4) y ditaxina (F5) en honor al género y especie de la planta de la que fueron extraídos.

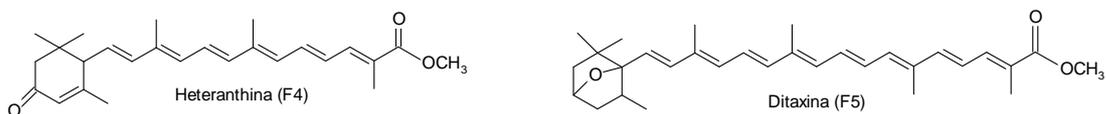


Fig. 13 Estructura molecular de Heteranthina y Ditaxina.
Fracciones mayoritarias de la fracción oleosa del endospermo
de *Ditaxis heterantha*

Una característica de estos componentes es la presencia de dobles enlaces conjugados, los cuales son susceptibles a la oxidación, con la posible generación de componentes con aroma.

En un trabajo realizado en el Centro de Investigación en Asistencia y Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ), (Del Toro-Sánchez 2006) se llevó a cabo la degradación térmica, enzimática y microbiológica de los dos compuestos mayoritarios con el objetivo de buscar compuestos con aroma de interés para la industria.

Para la degradación microbiológica, se lograron aislar nueve colonias microbianas de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), por su capacidad para degradar carotenoides. Estas colonias fueron evaluadas por su propiedad para degradar los dos apocarotenoides y producir aromas. De ellas, sólo una colonia fue capaz de llevar a cabo la degradación de heteranthina. Esta colonia fue identificada como *Saccharomyces cerevisiae* amplificando la secuencia que codifica para la región del rRNA 5.8S (Del Toro-Sánchez et al., 2006).

De la degradación microbiológica de heteranthina se identificaron siete componentes volátiles, posteriormente identificados por cromatografía de gas acoplado a un espectrómetro de masas como: 4-oxo-isoforona, isoforona, 3-hidroxi- β -ciclocitral, safranal, 3-oxo- α -ionona, 3-oxo- α -ionol, y 3-oxo-7,8-dihidro- α -

ANTECEDENTES

ionona. El safranal fue detectado como el principal producto de degradación encontrándose en un 35% con respecto al total de los aromas (Del Toro- Sánchez et al., 2006).

Los mismos 7 componentes fueron producidos *in vitro* a partir de heteranthina por el extracto proteico intracelular de células previamente cultivadas en presencia de heteranthina. Nuevamente, el safranal fue detectado como el principal producto de degradación, encontrándose en un 32% con respecto al total de los aromas. A partir de dicho extracto se aisló una actividad enzimática capaz de degradar heteranthina. La enzima presentó un peso molecular de 27.6 kDa (Del Toro- Sánchez et al., 2006).

Se determinaron las condiciones de máxima actividad de la enzima detectada, encontrándose que ésta ocurre a pH: 5.5 y temperatura de 35 °C. La enzima mostró una energía de activación: 7.23 Kcal mol⁻¹. La Km para heteranthina fue: 27 µM, Vmax de 135 µmoles min⁻¹. Como producto de dicha actividad solamente se detectó 3-oxo-α-ionona.

Cuando el sistema *in vitro* se realizó con el extracto proteico intracelular de la levadura crecida en ausencia de heteranthina se observó la producción de solo 4 aromas: 4-oxo-isoforona, isoforona, 3-hidroxi-β-ciclocitral, safranal (Del Toro- Sánchez et al., 2006). También aquí, el safranal fue detectado como el principal producto de degradación encontrándose en un 58% con respecto al total de los aromas.

En la degradación térmica de heteranthina se encontraron 14 compuestos con aroma y en la enzimática, usando xantina oxidasa, sólo 3. En ninguna de las dos condiciones se encontró safranal.

Dichos resultados sugirieron que:

ANTECEDENTES

1. la producción de safranal a partir de heteranthina es llevada a cabo específicamente por el sistema microbiano utilizado (*S. cerevisiae*).
2. la presencia de al menos dos rutas de degradación de heteranthina; una de ellas, inducida por su sustrato, es responsable de la producción de 3-oxo- α -ionol y 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionona, llevando como intermediario a la 3-oxo- α -ionona; la otra, al parecer constitutiva estaría involucrada en la formación de safranal, llevando como intermediario al 3-hidroxi- β -ciclocitral.

Con los compuestos obtenidos, se propuso una primera aproximación a la ruta seguida en la biotransformación de heteranthina a safranal por *S. cerevisiae*. (Ver fig. 14)

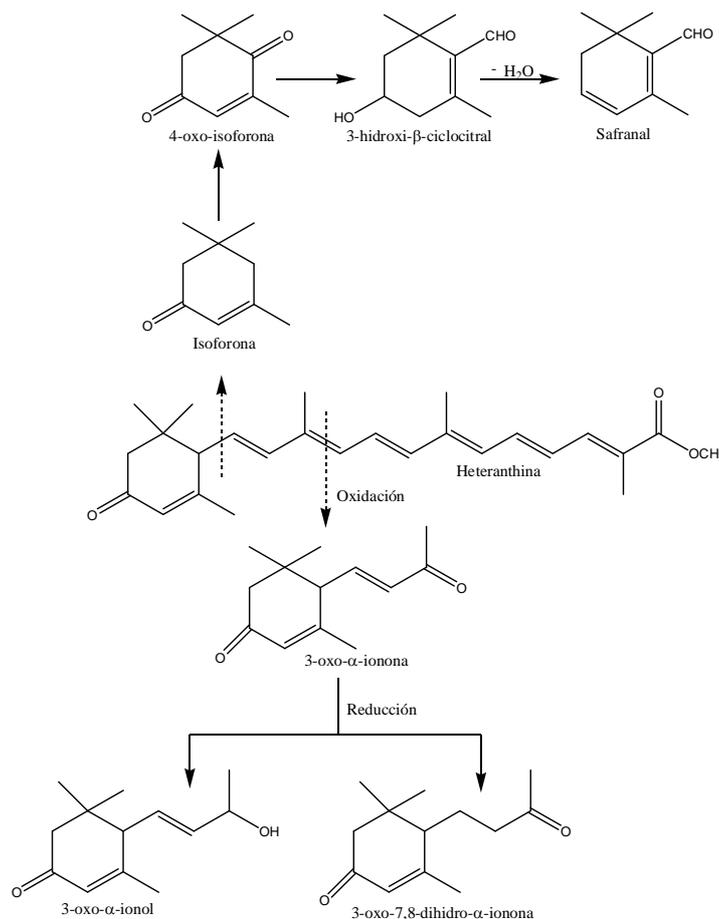


Fig. 14 Rutas propuestas en la biotransformación de heteranthina por *S. cerevisiae*. (Del Toro-Sánchez et al., 2006).

3 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

3.1 JUSTIFICACIÓN

El safranal es un producto muy valorado en la industria de aromas y sabores. El uso de la semilla de *Ditaxis heterantha* para su producción representaría una fuente más viable que la que representa el azafrán además de estimular la producción de un cultivo endémico nacional.

3.2 HIPÓTESIS

Ya que un alto porcentaje de los aromas presentes en la naturaleza provienen de la degradación de carotenoides, la degradación de la heteranthina por *Saccharomyces cerevisiae* u otros microorganismos generará moléculas volátiles por lo que será posible obtener moléculas con aroma, entre ellas el safranal.

4 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* en la producción de safranal.

Objetivos particulares

- Estandarizar la metodología de extracción de la fracción correspondiente a heteranthina.
- Identificar los productos obtenidos en la degradación de heteranthina por *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes tiempos de fermentación.
- Aislar microorganismos capaces de degradar heteranthina.
- Identificar los productos obtenidos en la degradación de heteranthina por los microorganismos aislados a diferentes tiempos de fermentación.

5 ESTRATEGIA

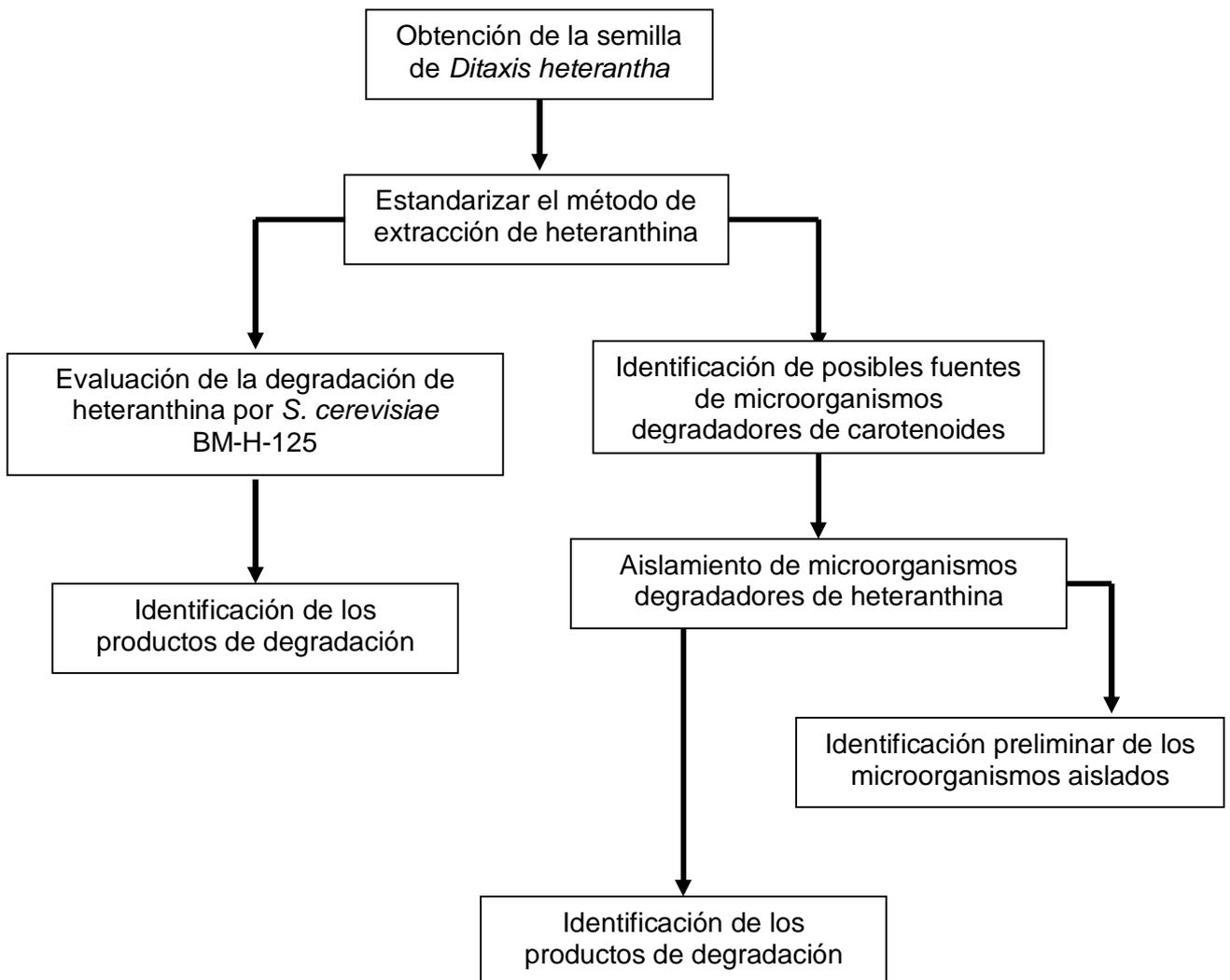


Fig. 15 Diagrama general de trabajo

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de la semilla de *Ditaxis heterantha*

La semilla seca de *Ditaxis heterantha* nos fue proporcionada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.).

6.2 Obtención de la fracción oleosa correspondiente a heteranthina

6.2.1 Extracción

La semilla de *Ditaxis heterantha* se molió en una licuadora con el propósito de aumentar la superficie de contacto durante la extracción. Se agregó hexano en una proporción de 1:10 (w/v). La mezcla se puso en agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo en todo momento de la luz con papel aluminio. Se separó el sobrenadante por medio de filtración por gravedad usando papel Whatman 40. Se realizó una segunda extracción con igual proporción de solvente y en iguales condiciones con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción. Los extractos se unieron y se evaporó el solvente usando un rotavapor con vacío a una temperatura de 35°C. Se obtuvo así la oleorresina.

6.2.2 Desengrasado

La eliminación de grasas se realizó adicionando acetona a la oleoresina en una proporción de 10:1 (v/v). La solución de la oleoresina en la acetona se congeló usando un baño de hielo seco en acetona. Una vez sólida la grasa, se eliminó por filtración usando un sistema de filtración con vacío de Millipore®. La acetona se eliminó en el rotavapor a 35°C y protegiendo de la luz con papel aluminio. Se obtuvo el pigmento total.

6.2.3 Separación

La separación de los componentes del pigmento total se realizó por cromatografía en columna abierta (CC) usando gel de sílice como adsorbente y una mezcla de éter etílico: éter de petróleo en gradientes como eluyente (se inició con éter de petróleo 100% y se continuó con 50 ml de cada una de las proporciones 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60). Se colectaron las diferentes fracciones con ayuda de la capacidad de coloración del pigmento.

Para su identificación se realizó cromatografía en capa fina (TCL) en una mezcla de solventes éter etílico: éter de petróleo 50:50 usando como estándar dos muestras de heteranthina con un R_f de 6.7 proporcionadas amablemente por el CIATEJ.

6.2.4 Concentrado

Una vez confirmada su identidad, se reunieron las fracciones que contuvieran la fracción de interés y se evaporó el solvente usando un rotavapor a 35°C con vacío hasta disminuir el volumen a aproximadamente 5 mL. Se pasó a un recipiente ámbar con ayuda de una pipeta Pasteur. El residuo en el matraz bola se retiró con éter etílico y se incorporó al frasco ámbar. Se eliminó el solvente restante con un flujo suave de nitrógeno. La heteranthina así obtenida se almacenó en atmósfera de nitrógeno y en congelación para su uso posterior.

6.2.5 Punto de fusión

Uno de los parámetros usados como primer indicativo de la pureza de un compuesto es su punto de fusión, el cual debe ser lo más puntual posible, ya que el rango de fusión es inversamente proporcional a su pureza.

Para las determinaciones se usó un equipo Fisher-Johns usando como estándar las dos muestras de heteranthina proporcionadas amablemente por el CIATEJ.

6.2.6 Preparación de la heteranthina para incorporarla al medio de cultivo.

Una de las características de la heteranthina es su hidrofobicidad, por lo que fue necesario preparar una suspensión acuosa para poder incorporarla en los medios líquidos y hacerla disponible a los microorganismos. La suspensión se preparó justo antes de su uso según lo reportado por Del Toro-Sánchez (2006).

31 mg de heteranthina y 0.5 g de tween 80 se disolvieron en 25 mL de cloroformo. El solvente se eliminó con un flujo suave de nitrógeno. Se adicionaron 6.25 mL de solución de EDTA al 0.25% y 12.5 mL de buffer de citratos 0.01 M a un pH de 4.6. Se esterilizó por filtración usando un filtro Millipore (swinex) con membrana de 0.45 μm .

6.3 Degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

La degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* ya fue reportada por Del Toro-Sánchez en 2006. En esta parte del trabajo se repitieron los experimentos de consumo de heteranthina con el objetivo de tener un parámetro de comparación tanto de la degradación como de los productos derivados de ésta. Después se buscaron otros microorganismos con la actividad de interés.

La cepa utilizada se obtuvo de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, la cual fue depositada por Del Toro-Sánchez (2005) e identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, con base en la

secuencia de ADN que codifica para la región ribosomal ITS-5.8S-ITS2 (Del Toro-Sánchez et al., 2005). La clave asignada a la cepa es: BM-H-125.

6.3.1 Conservación de la cepa

Con el fin de garantizar la uniformidad de los microorganismos usados en cada experimento se preparó una reserva de los inóculos. Se optó por un método de conservación a largo plazo por congelación, usando un crioprotector (glicerol), el cual protege del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación.

La conservación se realizó de la siguiente forma:

Se partió de un liofilizado proporcionado por la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se inocularon 25 mL de medio YPD líquido contenidos en un matraz de 250-mL para reactivar las células. Debido a que la cepa estaba liofilizada, presentó una fase Lag más larga de la normal. Una vez crecido, se tomó una muestra con un asa microbiológica y se inoculó una placa de medio YPD sólido por agotamiento, esto con el fin de obtener colonias aisladas. La placa se incubó a 29°C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se seleccionó una colonia y se inoculó con ella un matraz de 250-mL con 25 mL de medio YPD líquido. El cultivo se incubó a 29°C, 60 rpm por 24 horas, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de medio YPD nuevo con 40% de glicerol. Se homogenizó y se hicieron alícuotas de 0.5 mL en tubos eppendorf. Finalmente se almacenaron a una temperatura de -30°C.

6.3.2 Preparación del pre-inóculo

Para estandarizar el número de células usadas en las fermentaciones y en las pruebas cualitativas, todas partieron de un pre-inóculo realizado como sigue:

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó una alícuota de la cepa almacenada, descongelándola a 37°C. Para reactivar las células, con la alícuota se inocularon 25 mL de medio YPD líquido contenido en un matraz bafleado de 250-mL. El medio se incubó a 29°C, 60 rpm por 48 horas. Se tomó 0.1 mL de éste y se inoculó una placa con medio YPD sólido en forma masiva, incubando a 29°C, 60 rpm, por 24 horas.

Con ayuda del asa microbiológica, se tomó biomasa de la placa para hacer una suspensión celular en solución salina isotónica hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. (Cada 0.1 OD₆₀₀ corresponde a 3x10⁶ células /mL de *S. cerevisiae*)¹ todo fue realizado en condiciones de esterilidad. Esta suspensión celular fue usada como pre-inóculo.

6.3.3 Condiciones de la fermentación

Se usó el medio de cultivo YPD modificado (mYPD) cuya formulación fue:

1% de extracto de levadura.

2% de bactopectona

0.02% glucosa

Este medio fue el reportado por Del Toro-Sánchez (2006) en su estudio del consumo de heteranthina por *S. cerevisiae*.

Las fermentaciones se realizaron con 50 mL de medio mYPD en matraces bafleados de 250-mL, a 29°C, 60 rpm por 24 h. Se agregaron 16 µL de la suspensión de heteranthina por mL de medio, previo a la inoculación (concentración final de 25 µg/mL). Los medios se inocularon con 2 mL del pre-inóculo.

¹ Dato obtenido del Current Protocols in Molecular Biology, en "Determination of Cell Density"

6.3.4 Extracción de la proteína intracelular

6.3.4.1 Obtención del pellet celular.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, el volumen total del cultivo se centrifugó a 6,300 x *g*, durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó con ayuda de una pipeta pasteur. Las células se lavaron como sigue: el pellet se resuspendió en 20 mL de solución salina isotónica y nuevamente centrifugadas a 6,300 x *g*, durante 15 min a 4 °C. Se realizó un segundo lavado en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 10 mL de solución salina isotónica.

6.3.4.2 Ruptura de las células

El pellet celular lavado y resuspendido se filtró en un sistema de vacío Millipore con filtros de papel Whatman 40 para eliminar la mayor cantidad de líquido. Con el sistema de vacío en función, se adicionaron lentamente 10 mL de acetona previamente enfriada. Las células retenidas en el filtro se congelaron por 24 h.

En un mortero previamente enfriado (30 min. en congelador) se trituró un trozo pequeño de hielo seco (aproximadamente 5 g), se incorporaron las células y con el pistilo se trituraron usando el hielo seco como sistema abrasivo. Se adicionaron 10 mL de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 con 0.1 mM fluoruro fenil metil sulfonil (PMSF) y 0.1 mM ácido etilen diamino tetraacético (EDTA). La suspensión obtenida se centrifugó a 15,000 rpm, durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante (extracto libre de restos celulares) se concentró como sigue:

6.3.4.3 Concentración de la proteína

El extracto intracelular, se concentró 20 veces por ultra filtración, utilizando el sistema de Amicon® Ultra de Millipore, a 15,000 rpm y 4°C. El producto fue utilizado como fuente de proteína intracelular.

6.3.4.4 Determinación de proteína

Las determinaciones se realizaron por el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) y siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor.

6.4 Determinación cuantitativa *in vitro* de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

La determinación se llevó a cabo siguiendo dos procedimientos: el descrito por del Toro-Sánchez en el 2006 (Determinación directa en el sistema de reacción) y el recomendado por Rodríguez- Amaya en “A guide to carotenoid análisis in foods” en 2005 para muestras de carotenoides (extracción del carotenoide de interés con solventes).

6.4.1 Determinación directa en el sistema de reacción de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

La determinación cuantitativa se realizó mediante espectrometría. Se monitoreó la absorbancia del sistema de reacción a una longitud de onda de 396.7 nm. Se usó el coeficiente de extinción molar de 1.25×10^5 L/(mol cm), datos previamente reportados por Del Toro-Sánchez en el 2006.

Se preparó un sistema de reacción de 3 mL en viales color ámbar, formado por: el volumen requerido para tener 480 µg de proteína (del extracto intracelular concentrado), 30 µL de la suspensión stock de heteranthina ($C_f = 16$ µg/mL) y el volumen de buffer 100 mM de citrato pH 5.5 requerido para un volumen final de 3 mL. El control se preparó de igual forma sustituyendo el volumen del extracto proteico por el mismo buffer.

Bajo estas condiciones, la actividad fue monitoreada por la disminución de la absorbancia a 396.7 nm durante 2 h a intervalos de 10 min a 35 °C.

6.4.2 Determinación de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* usando la cuantificación del sustrato residual (extracción con solventes)

El sistema de reacción se preparó de acuerdo con las proporciones descritas en el paso anterior, pero a un volumen de 150 mL. Se tomaron muestras de 5 mL cada

10 min hasta las 2 h. cada muestra tomada se colocó en baño de CO₂ sólido con acetona para detener la reacción.

Cuando se reunieron todas las muestras, se adicionaron 5 mL de éter etílico a cada una y se agitó durante 10 min. Se recuperó la fase orgánica y se realizó una segunda extracción. Se evaporó el éter de las muestras con flujo de nitrógeno y el sustrato residual se resuspendió en 2 mL de acetona.

Se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 389.5 y usando un coeficiente de extinción molar de 1.16×10^5 (datos reportados por Méndez-Robles en 2004 para este solvente).

6.5 Determinación cualitativa *in vitro* de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

La actividad de degradación de la heteranthina se monitoreó cualitativamente de acuerdo con lo reportado por Del Toro-Sánchez (2006) como se menciona a continuación:

Se preparó buffer de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0, con agarosa al 1%. Previo a verterlo en cajas Petri, se suplementó con 0.2 mg/mL de heteranthina (125 µL de la suspensión stock de heteranthina/ mL de buffer). Una vez solidificada la agarosa, se agregaron 100 µg de proteína del extracto proteico intracelular de *S. cerevisiae* sobre el agar. Se incubaron a 30 °C por 24 h.

Siendo la heteranthina un apocarotenoide colorido, se obtienen placas de color amarillo. El criterio usado para determinar presencia de actividad fue la formación de un halo claro que indicara la degradación del color proporcionado por la heteranthina.

6.6 Determinación *in vivo* de la actividad de degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

Las fermentaciones se realizaron con 50 mL de medio mYPD en matraces bafleados de 250-mL, a 29°C, 60 rpm por 24 h. Se agregaron 16 µL de la suspensión de heteranthina por mL de medio, previo a la inoculación (concentración final de 25 µg/mL). Los medios se inocularon con 2 mL del preinóculo.

El control se preparó con el medio de cultivo más el sustrato (heteranthina) sin inocular.

6.6.1 Determinación de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* en medio de cultivo líquido

La fermentación y el control se realizaron por triplicado. Se tomaron muestras de 5 mL a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Ya recolectadas todas las muestras, se adicionaron 5 mL de éter etílico a cada una. Se agitaron suavemente durante 10 min. Se recuperó la fase orgánica y se realizó una segunda extracción. Se evaporó el éter de las muestras con flujo suave de nitrógeno y el sustrato residual se resuspendió en 2 mL de acetona. Se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 389.5 y usando un coeficiente de extinción molar de 1.16×10^5 (datos reportados por Méndez-Robles en 2004 para este solvente).

6.6.2 Determinación de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* en medio de cultivo sólido

Se prepararon 50 mL de medio mYPD con 1.5% de agar. Previo a vaciar en cajas Petri, se adicionaron 800 µL de la suspensión acuosa de heteranthina ($C_i = 25$ µg/mL). Se dejaron solidificar y se inocularon con 100 µL de una dilución 10^{-5} del pre-inóculo, con el fin de tener colonias aisladas. Se incubaron a 29°C por 72 h y se revisó la aparición de halos claros alrededor de las colonias que pudieran indicar la degradación de heteranthina.

6.7 Determinación de actividad de degradación de luteína por *S. cerevisiae*

La cepa de *S. cerevisiae* reportada por Del Toro-Sánchez en 2006 (la misma usada en este trabajo) se aisló usando placas de medio YNB adicionadas con luteína. Las placas de medio YNB adicionadas con 0.04 mg/mL de luteína fueron usadas para aislar microorganismos con capacidad para degradar carotenoides. La cepa fue seleccionada entre otras debido a su capacidad de degradación del carotenoide mostrado por la generación de halos claros en el medio sólido alrededor de las colonias.

Esta prueba se realizó para evaluar si se estaba trabajando con la misma cepa previamente reportada debido a que los resultados de actividad realizados fueron negativos y no coinciden con los previamente reportados.

6.7.1 Solución acuosa de luteína

En la metodología usada por Del Toro-Sánchez (2006) para aislar microorganismos con capacidad de degradación de carotenoides se usó luteína como fuente de carbono. Fue en estas condiciones que se aisló la cepa de *S. cerevisiae* reportada como productora de safranal a partir de heteranthina.

Con el fin de saber si la cepa de *S. cerevisiae* usada en el presente trabajo es la misma que la previamente reportada, se sembró en medio con luteína como fuente de carbono. Para la elaboración de la solución acuosa de luteína se siguió el procedimiento descrito en el punto 6.2.6 sustituyendo a la heteranthina por luteína.

6.7.2 Preparación de medio YNB sólido adicionado con luteína

Se prepararon 50 mL de medio YNB con 1% de agar. Previo a vaciar en cajas petri, se adicionaron 1.2 mL de la suspensión acuosa de luteína ($C_f = 0.04$ mg/mL) esterilizada por filtración. Después de solidificar el medio, las placas se inocularon con 100 μ L de una dilución 10^{-5} del pre-inóculo, con el fin de tener colonias muy

aisladas. Se incubaron a 29°C por 24 h y se revisó la aparición de halos claros alrededor de las colonias que pudieran indicar la degradación de la luteína.

6.8 Selección de microorganismos con capacidad de degradación de heteranthina.

Considerando que la cepa de *S. cerevisiae* fue aislada de medios con luteína, y que posteriormente se probó su capacidad de degradación de heteranthina, se planteó aislar microorganismos usando directamente a la heteranthina como fuente de carbono en medios de cultivo para un crecimiento selectivo.

Se diseñó una estrategia para aislar microorganismos con actividad de degradación de heteranthina que se describe a continuación:

6.8.1 Selección y preparación de muestras

Se eligieron cuatro muestras con posibilidad de portar microbiota degradadora del carotenoide:

- 1.- la superficie de la semilla de *Ditaxis heterantha*
- 2.- semilla de *Ditaxis heterantha* molida y expuesta durante 15 días en un jardín
- 3.- tierra de jardín
- 4.- lodo de un mercado de flores

Se colocó un gramo de muestra en 10 mL de solución salina isotónica. Se hicieron diluciones de 10^0 , 10^{-6} y 10^{-9} . Se adicionaron 100 μ L de cada dilución a los diferentes medios en placa.

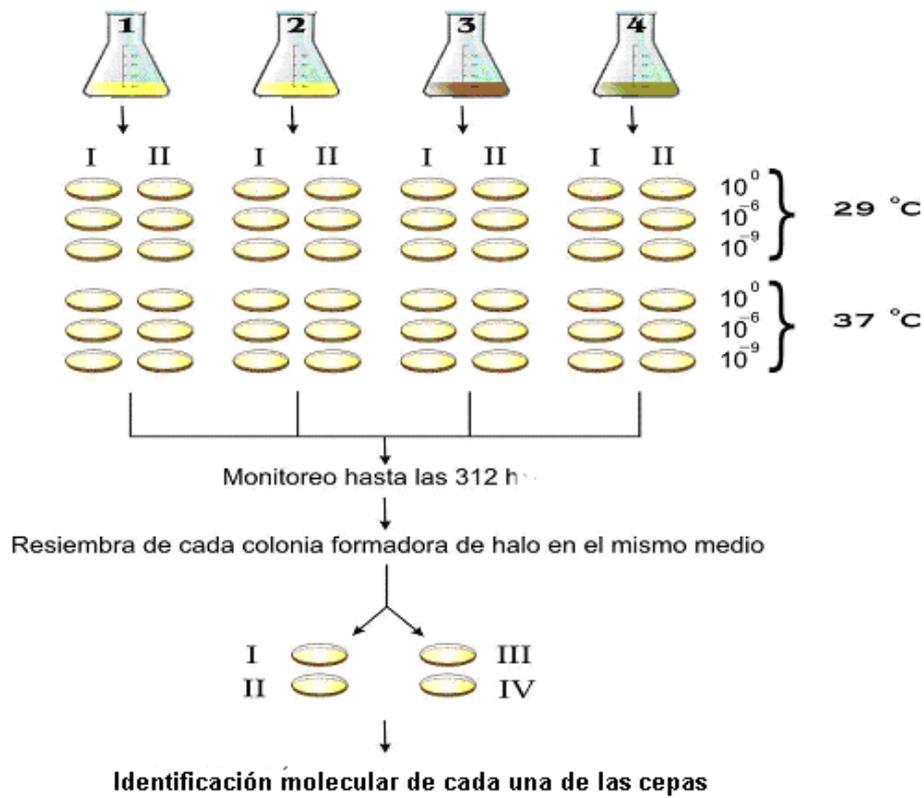


Fig. 16 Estrategia de aislamiento de microorganismos consumidores de heteranthina.

6.8.2 Medios de cultivo

Se usaron medios mínimos para bacterias, hongos y levaduras, con heteranthina como única fuente de carbono con el fin de abarcar todos los posibles grupos microbianos.

6.8.2.1 Medio Czapek (Para 1000 mL)

NaNO₃ 3.0 g

K₂HPO₄ 1.0 g

MgSO₄·7H₂O 0.5 g

KCl 0.5 g

FeSO₄·7H₂O 10.0 mg

Agar 20.0 g

Solución acuosa de heteranthina 16 mL (C_f = 25 µg/mL).

MATERIALES Y MÉTODOS

La solución de heteranthina se adicionó esterilizando por filtración y previo a verter en placas.

6.8.2.2 Medio MM-M9 (para 1000 mL)

Na ₂ HPO ₄		6.0 g
KH ₂ PO ₄		3.0 g
NH ₄ Cl		1.0 g
NaCl		0.5 g
MgSO ₄	1 M	2.0 mL
CaCl ₂	1 M	0.1 mL
Tiamina	1 mg/mL	1.0 mL (esterilizada por filtración)
Agar		15.0 g

Solución acuosa de heteranthina 16 mL ($C_f = 25 \mu\text{g/mL}$) (se adicionó igual que en el paso anterior).

6.8.2.3 Condiciones de incubación y criterio de selección de microorganismos

Un grupo de placas se incubaron a 29°C y otro a 37°C con la finalidad de abarcar mayores condiciones para la microbiota que estuviera presente.

El criterio de selección fue la formación de halos claros que indicaran la degradación de la heteranthina.

6.8.3 Conservación de los microorganismos aislados

Se observó que los microorganismos aislados son productores de esporas, por lo que se usaron éstas para su preservación. El medio de cultivo de arroz fue el más favorable en la producción de esporas para ambos microorganismos. Se preparó como sigue:

Medio de cultivo sólido arroz (1000 mL).

Arroz blanco molido 100.0 g

Agar 15.0 g

El arroz se coció durante 10 min. Se agregó el agar y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min. Se dejó enfriar para verterlo en cajas Petri.

La inoculación se realizó por extensión en placa en forma masiva. Las placas se incubaron a 29°C por 72 h (es el tiempo en el cual se veía la placa completamente llena de esporas). A cada placa se adicionaron 5 mL de solución salina isotónica y con ayuda del asa bacteriológica se raspó la superficie del cultivo con el fin de recuperar las esporas en la solución salina. La suspensión de esporas se colocó con una pipeta estéril en viales que contenían tierra de diatomea previamente esterilizados. Se guardaron en congelación a -30°C hasta su posterior uso.

6.8.4 Evaluación cuantitativa de la degradación de heteranthina por los microorganismos aislados.

Una vez aislados los microorganismos por la presencia de halos alrededor de las colonias, se monitoreó la degradación de la heteranthina con el método de extracción con solventes (ya descrito) y el crecimiento por densidad óptica a 540 nm para cada uno de los microorganismos.

La determinación se llevó a cabo usando medio Czapek con heteranthina como fuente de carbono (concentración final de 25 µg/mL).

6.9 Evaluación de la estabilidad del sustrato

Se evaluó la estabilidad de la heteranthina para elucidar la degradación observada. Para ello se preparó una solución en acetona y una solución alcohólica. Se le realizó un barrido de absorbancia de 250 a 500 nm al tiempo cero, a las 24, 48 y 72 hs identificando λ_{\max} y absorbancia en cada determinación.

6.10 Evaluación de la producción de agarasas

Para evaluar si el agar sirvió como fuente de carbono a los microorganismos aislados, se realizó el siguiente ensayo.

Se prepararon placas de medio Czapek sin fuente de carbono. Se inocularon por agotamiento, para tener colonias separadas.

Las placas se incubaron a 29°C por 48 horas. Después del tiempo de incubación se adicionaron 5 mL de lugol a cada placa con el objetivo de revelar los sitios de degradación del agar. Después de 10 min a temperatura ambiente se observó el resultado. La presencia de halos alrededor de la colonia son indicadores de la degradación del agar. Las moléculas de yodo se intercalan en la red formada por el agar solidificado. En las regiones donde hubo degradación del agar, la cantidad de moléculas de yodo intercaladas es menor o nula reflejándose en la presencia de halos claros.

6.11 Identificación de los microorganismos aislados

Los microorganismos aislados se nombraron K-38 y K-155 para su manejo hasta su identificación.

La identificación previa de los microorganismos se llevó a cabo con el apoyo del cepario del IIB, por medio de la secuenciación de una región ribosomal 16S, y comparando la secuencia obtenida en una base de datos.

6.12 Evaluación de la producción de antibióticos por los microorganismos aislados

Los resultados preliminares de la identificación de los microorganismos aislados indicaron que pertenecen al género *Streptomyces* y que son posibles especies no reportadas.

Considerando la importancia de esta especie en la producción de metabolitos secundarios, entre ellos antibióticos, se realizó un screening primario el cual se llevó a cabo por el método de estría perpendicular.

K-38 y K-155 se estriaron por separado en placas de agar nutritivo e incubadas a 29°C. Después de 48 horas de incubación, los microorganismos de prueba [dos levaduras (*S. cerevisiae*, *C. albicans*), dos bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. lutea*) y una bacteria Gram negativa (*E. coli*)] se inocularon en línea perpendicular a la estría en la dirección indicada en las flechas del esquema de la figura 17.

Después de 24 horas de incubación a 37°C, se evaluó el efecto de inhibición.

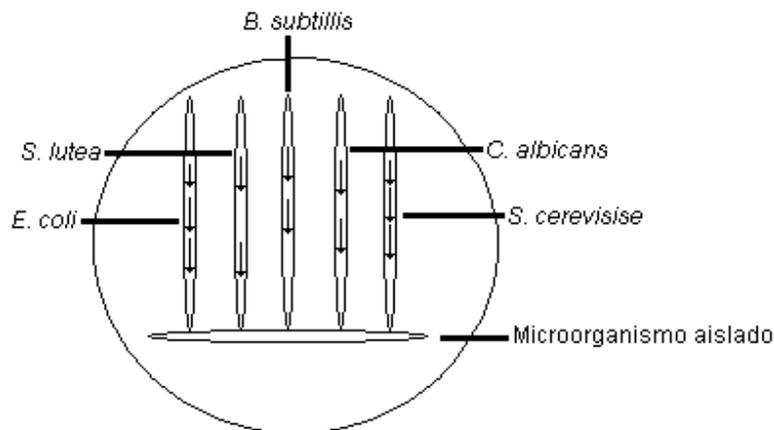


Fig 17 Esquema de inoculación de antibiograma.

7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción de la fracción oleosa correspondiente a heteranthina

Se obtuvo un rendimiento del 0.036% de heteranthina a partir de la semilla completa de *Ditaxis heterantha*. No podemos saber si esto representa una buena eficiencia o si hubo pérdidas considerables debido a que no se reporta en trabajos previos el porcentaje de heteranthina en la semilla. En trabajos anteriores sólo se indica que la fracción correspondiente a heteranthina (F4) + ditaxina (F5) es mayoritaria (Méndez et al., 2004) y posteriormente, Del Toro y col. en 2006 indican que F4 + F5 corresponden al 80% de los componentes carotenoides.

En la determinación del punto de fusión, la muestra obtenida en el laboratorio, se comparó contra dos muestras enviadas del CIATEJ (consideradas como controles en el presente trabajo). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 5. Punto de fusión de muestra y estándares usados

MUESTRA	PUNTO DE FUSIÓN
Control 1	75°C-122°C
Control 2	108°C-122°C
Muestra	115°C-121°C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El punto de fusión reportado en el trabajo donde se caracterizó la heteranthina es de 121°C (Méndez en 2005). En los resultados obtenidos se observó un rango de fusión amplio tanto en las muestras usadas como control como en la muestra obtenida en nuestro laboratorio lo cual sugiere la presencia de compuestos de menor punto de fusión como contaminantes. Se observó además un mayor rango de fusión en las muestras usadas como control, lo cual indica menor pureza.

Los resultados revelan que tanto las muestras enviadas del CIATEJ y usadas aquí como control y la muestra obtenida en el laboratorio, ninguna de las tres corresponde a un compuesto puro. La muestra menos impura es la obtenida en nuestro laboratorio, aún cuando se siguió la misma metodología reportada.

Las muestras usadas en los trabajos previos donde se reportó la obtención de safranal (Del Toro Sánchez, 2006) corresponden a las utilizadas aquí como control, por lo cual cuando se obtuvieron y analizaron estos resultados consideramos que aún cuando no se tenía un compuesto puro, la evaluación de la producción biotecnológica de safranal a partir de esa fracción era viable.

7.2 Degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*

7.2.1. Determinación cuantitativa *in vitro* de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*. Determinación directa en el sistema de reacción

La degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* ya fue reportada por Del Toro-Sánchez en 2006. En esta parte del presente trabajo se repitieron las metodologías con el objetivo de tener un parámetro de comparación tanto de la degradación, como de los productos derivados de ésta para después llevar a cabo la búsqueda de otros microorganismos que presentaran la actividad de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados no pudieron reproducirse. Los resultados mostrados en las gráficas de la Figura 18 corresponden a una de varias repeticiones en las que los resultados obtenidos fueron diferentes en cada una de ellas.

La determinación de la absorbancia directa en el sistema de reacción presentó inestabilidad. Las lecturas tomadas cuando el sistema de reacción se montó en la misma celda del espectrofotómetro sí presentaron un aparente decremento en la concentración de heteranthina (gráfica a), pero cuando se montó de tal forma que había que trasvasar, las lecturas fueron muy variadas y en ningún caso se observó un decremento en la concentración (gráfica b). Considerando que era un efecto del sistema se trasvasó en la última determinación en la celda para corroborarlo (determinación a los 120 min de la gráfica a).

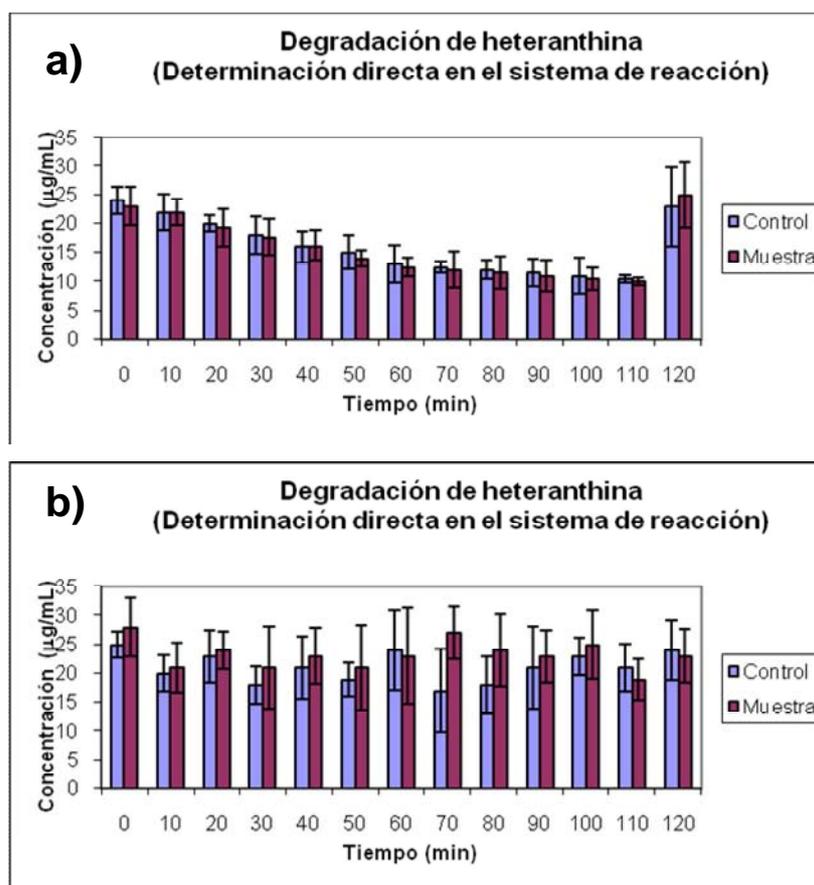


Fig 18. Cinética de degradación de heteranthina. La determinación se realizó obteniendo la absorbancia directamente del sistema de reacción. La gráfica a) muestra la cinética sin agitación, la gráfica b) muestra el efecto de la agitación al trasvasar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observamos en la gráfica a) que aparentemente mostró una degradación del 56% a los 110 min. Después de agitar el sistema de reacción se obtuvo una absorbancia similar a la obtenida en el tiempo cero.

Los resultados reportados por Del Toro-Sánchez para este procedimiento mostraron una degradación del 78.23% a los 120 min.

El sistema de reacción es en realidad una emulsión formada por el buffer, el sustrato oleoso (apocarotenoide) y el tween 80. Por su carácter hidrofóbico el apocarotenoide requiere estar en emulsión para ser bio-disponible en un cultivo, sin embargo para las determinaciones espectrométricas el sistemas en emulsión no es adecuado ya que uno de los requisitos de la muestra a ser evaluada por espectrometría es estar en un solvente en el que sea perfectamente soluble. En una emulsión el tamaño de las partículas varía según la homogenización y con el tiempo tiende a desestabilizarse. El resultado obtenido de la evaluación de absorbancia o transmitancia de una misma emulsión es función del tamaño de partículas y de su estabilidad. Sin embargo esta estrategia ya ha sido reportada por Bosser y Belin en 1994.

Los resultados sugieren que lo reportado como degradación de la heteranthina fue una desestabilización de la emulsión ya que una vez agitado el sistema la lectura es similar a la obtenida en el tiempo cero.

7.2.2 Determinación cuantitativa *in vitro* de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*. Determinación mediante la cuantificación del sustrato residual (extracción con solventes)

La determinación *in vitro* también se realizó siguiendo la metodología de la extracción de la heteranthina residual con solventes de acuerdo con lo recomendado por Rodríguez- Amaya en “A guide to carotenoid análisis in foods” en 2005 para muestras de carotenoides.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de la heteranthina residual de muestras tomadas a los diferentes tiempos establecidos se realizó usando éter etílico y resuspendiendo en acetona por ser el solvente con el cual se obtuvo el coeficiente de extinción y λ_{\max} (Méndez-Robles, 2004) cuyos valores reportados son de 1.16×10^5 y 389.5 respectivamente.

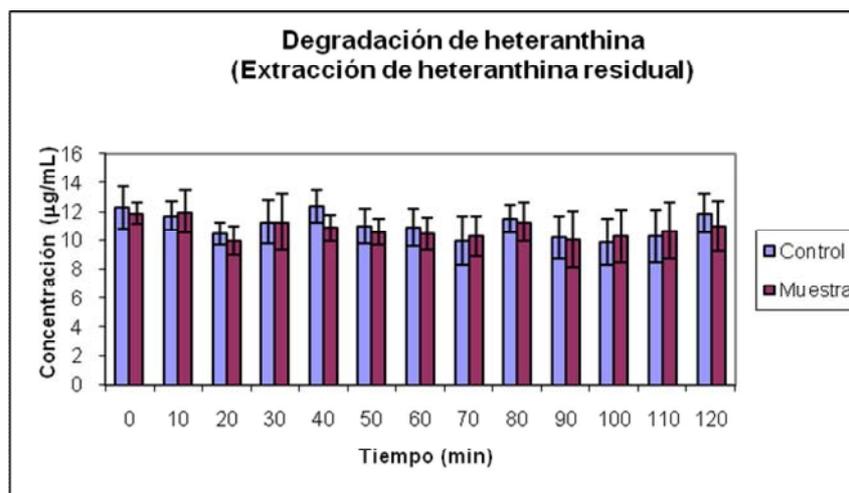


Fig 19. Cinética de degradación *in vitro*, extracción del sustrato residual con solventes

Como se observa en la gráfica de la figura 19, la concentración de heteranthina se mantiene constante en 11.06 ± 0.85 en el control y en 10.92 ± 0.55 en la muestra a lo largo del tiempo de la determinación. No se observó degradación. La concentración real inicial en el sistema de reacción fue de $16 \mu\text{g/mL}$.

Considerando el tiempo cero (que es en el cual se sabe la concentración del sustrato) con esta metodología se logró extraer en promedio el 75% de la concentración real inicial tanto en la muestra como en el control. La subestimación es debida a la metodología y no a una degradación por el extracto proteico, ya que se observa en ambos en la muestra y en el control.

7.2.3 Determinación cualitativa *in vitro* de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*.

Esta determinación se realizó debido a que en las determinaciones cuantitativas no se pudo observar actividad de degradación de la heteranthina.

Del Toro Sánchez (2006) reportó el uso de la heteranthina solidificada con agarosa al 1% en placas para evaluar de manera cualitativa la actividad de degradación en el extracto proteico intracelular de *S. cerevisiae*.

Después del tiempo de incubación indicado (30 °C por 24 h), no se observó formación de halo que indicara presencia de la actividad de degradación de heteranthina.



Fig 20. Determinación cualitativa *in vitro* de degradación de heteranthina. Placas de agarosa al 1% con 0.2 mg de heteranthina/ml. No hay formación de halo de degradación del sustrato.

La figura 20 muestra placas de agarosa al 1% con 0.2 mg de heteranthina/mL. La placa de la izquierda corresponde al control y la de la derecha corresponde a la placa con 100 µg de proteína del extracto intracelular de *S. cerevisiae*. No hay diferencia entre ambas placas, no se observa algún cambio que pueda ser atribuido al efecto del extracto proteico.

7.2.4 Determinación *in vivo* de la actividad de degradación de heteranquina por *S. cerevisiae*

7.2.4.1 Determinación *in vivo* de la actividad de degradación de heteranquina por *S. cerevisiae* en medio de cultivo líquido

Con los resultados obtenidos, consideramos importante evaluar la actividad de degradación de heteranquina *in vivo*.

La determinación se llevó a cabo con el uso de la extracción de la heteranquina residual con solventes según lo descrito en el capítulo 6 (6.4.2).

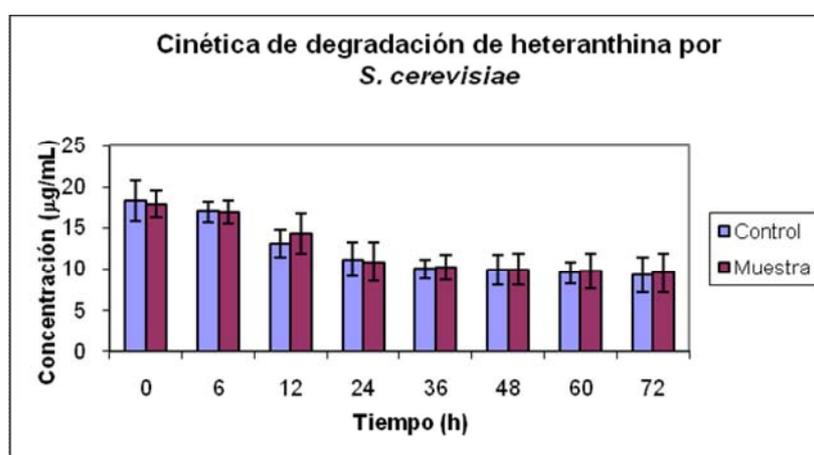


Fig 21. Cinética de degradación de heteranquina *in vivo*. Extracción con solventes.

La Figura 21 muestra una disminución en la concentración de heteranquina del 38.2% en el control y del 39% en la muestra a las primeras 24 horas, después la concentración sigue disminuyendo pero a menor velocidad. Sin embargo, el comportamiento se observa tanto en las muestras inoculadas como en los controles, por lo que este efecto no puede ser atribuido a una actividad generada por *S. cerevisiae*.

La determinación fue reproducible. Se observa un comportamiento similar al observado en 7.3.1.2, ya que solo se pudo extraer el 72% de la concentración real

inicial al tiempo cero de (18 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al parecer esta metodología subestima las concentraciones reales.

7.2.4.2 Determinación *in vivo* de la actividad de degradación de heteranthina por *S. cerevisiae* en medio de cultivo sólido

Del Toro-Sánchez en 2006 reportó el uso de placas con medio YPD modificado sólido (mYPD, con sólo 0.02% de glucosa) en la identificación de la degradación de heteranthina por *S. cerevisiae*. El medio de cultivo se suplementó con 25 μg de heteranthina/mL como fuente de carbono. En ese trabajo se reportó la formación de halos claros alrededor de las colonias correspondiendo a halos de degradación de la heteranthina.

El medio de cultivo suplementado queda pigmentado por la presencia de la heteranthina (apocarotenoide) por lo que la presencia de halo alrededor de la colonia se interpretó como degradación de ésta.

En el presente trabajo no se observó la formación de halos que indicara degradación de la heteranthina.

S. cerevisiae sí creció en el medio mYPD sólido con 25 μg de heteranthina/mL, sin embargo el medio contenía 1% extracto de levadura (no era un medio mínimo) y su crecimiento no puede ser atribuido al uso de heteranthina como fuente de carbono. De cualquier forma, no se observaron los halos descritos alrededor de las colonias, por lo que se concluye que no hubo degradación de la heteranthina.

7.2.5 Determinación de la actividad de degradación de luteína por *S. cerevisiae*

El medio de cultivo mYPD adicionado con 0.04 mg/mL de luteína se usó como medio de selección de microorganismos con capacidad de degradación de carotenoides. Del Toro-Sánchez (2006) reportó que se lograron aislar nueve

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

colonias con capacidad de degradación del carotenoide, identificando la actividad con la formación de halos claros alrededor de ellas. Posteriormente los microorganismos aislados se sembraron en cultivo sumergido con medio mYPD con heteranthina como fuente de carbono. De este trabajo se aisló la cepa de *S. cerevisiae* usada en el presente trabajo y de la cual reportó ser la única de los microorganismos aislados con capacidad de degradación de la fracción correspondiente a heteranthina.

Este ensayo se realizó debido a los resultados de actividad de degradación de heteranthina negativos obtenidos hasta esta parte del trabajo. El ensayo se consideró clave debido a que fue el método de selección de la cepa.

Las placas con luteína no presentaron los halos claros reportados por Del Toro-Sánchez como indicador de la actividad de degradación del carotenoide. Esta prueba es decisiva de la ausencia de actividad en la cepa usada debido a que fue en este medio donde se aisló.

Debemos considerar además que éste tampoco era un medio mínimo el cual obligue a crecer sólo la biota capaz de asimilar al carotenoide como fuente de carbono.

7.3 Selección de microorganismos con capacidad de degradación de heteranthina

Esta metodología propuesta involucró el uso de la heteranthina como única fuente de carbono desde el principio de la selección usando medios de cultivo químicamente definidos.

Con la metodología propuesta se aislaron dos colonias de microorganismos presuntos degradadores de heteranthina. Las colonias que formaron halo se apreciaron a las 72 horas de incubación a 29°C. Ambas colonias provenían de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

muestra de semilla de *Ditaxis heterantha* molida y expuesta durante 15 días en un jardín.

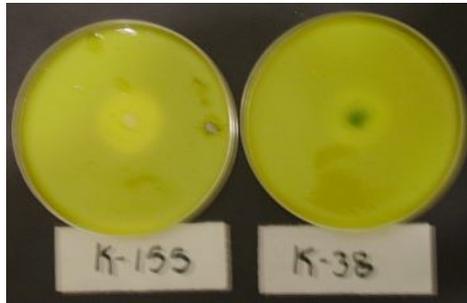


Fig 22 Halos formados por la aparente biodegradación de la heteranthina

Los microorganismos fueron llamados K-38 y K-155 para su manejo hasta su identificación, posteriormente se identificaron como se detalla en el punto 7.6.

K-155 mostró un halo más grande que el observado en K-38 lo cual se atribuyó a una mayor capacidad de degradación.

7.3.1 Evaluación cuantitativa de la degradación de heteranthina por los microorganismos aislados.

La degradación de la heteranthina se monitoreó en el mismo medio de cultivo (líquido) usado para aislar los microorganismos (medio Czapek con heteranthina como fuente de carbono a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Simultáneamente se determinó el crecimiento para correlacionarlo con el consumo de heteranthina.

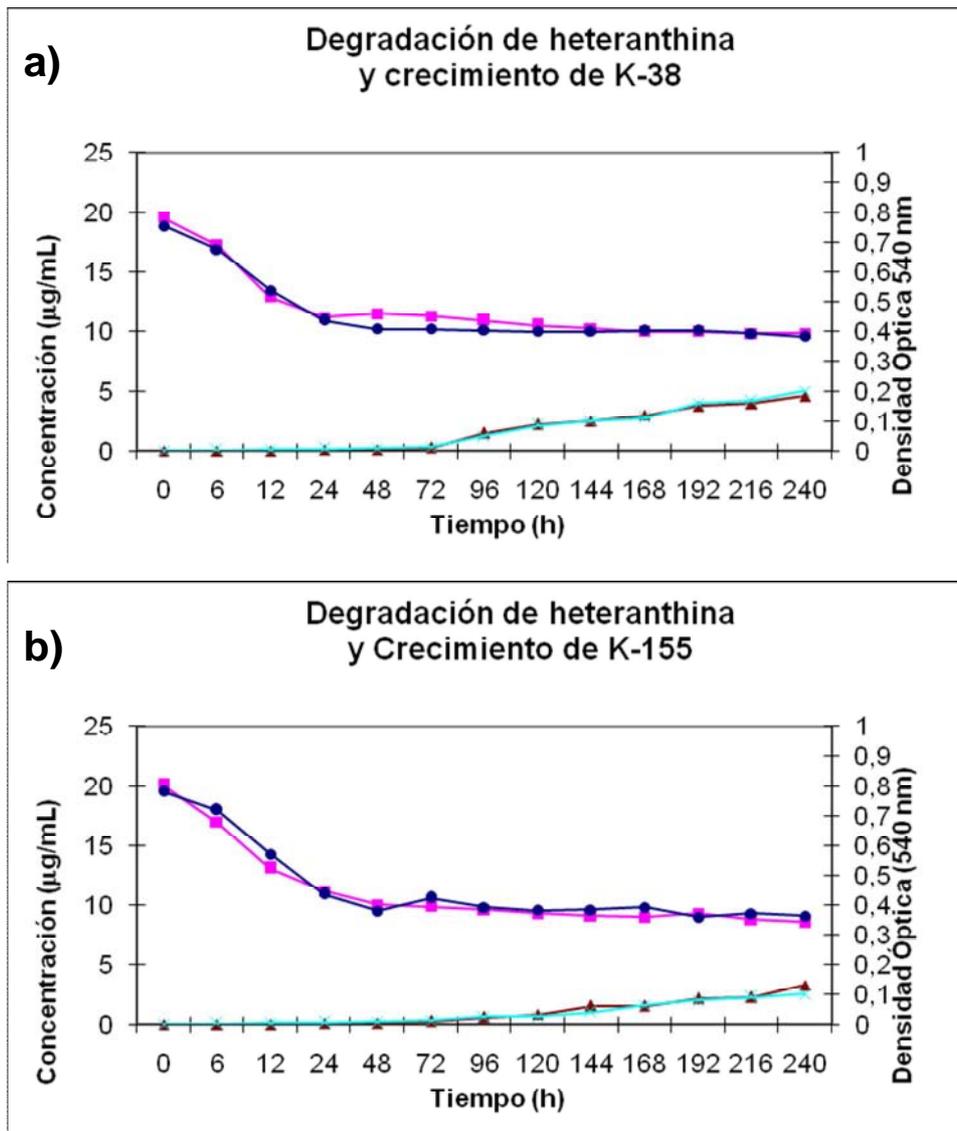


Fig 23 Degradación de heteranthina y crecimiento microbiano de a) K-38 y b) K-155. Concentración de la heteranthina residual, medio inoculado ■ y control●. Densidad óptica medio inoculado ▲ y control x.

Observamos el mismo comportamiento en ambas graficas de la figura 26 correspondientes a K-38 y K-155, una disminución considerable en la concentración de las primeras 12 horas y después la concentración sigue disminuyendo pero a menor velocidad. La degradación se observó también en los controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este comportamiento es el mismo observado cuando se llevó a cabo con *S. cerevisiae*, sin embargo en los ensayos con *S. cerevisiae* los medios usados contenían extracto de levadura al cual podemos adjudicar que permitieran crecer a las células. A diferencia, en este ensayo el medio usado está químicamente definido asegurándonos que la heteranthina fue la única fuente de carbono.

La determinación de la densidad óptica a los diferentes tiempos establecidos con el objeto de evaluar el crecimiento microbiano mostró un ligero aumento después de las 72 horas para ambos microorganismos. Sin embargo, como el efecto se observó también en los controles (medio de cultivo sin inocular) el aumento en la densidad óptica no fue debido al crecimiento de los microorganismos.

El aumento en la densidad óptica pudo ser debido a la presencia de productos de degradación de la heteranthina por efecto de las condiciones del cultivo como agitación y temperatura y no por el crecimiento microbiano.

Los resultados en el medio líquido nos mostraron que las células no fueron capaces de crecer usando a la heteranthina como única fuente de carbono aún cuando se observó una disminución en la concentración de ésta.

Pero entonces, ¿cuál fue la fuente de carbono que permitió el crecimiento de los microorganismos aislados? ¿Qué provocó la presencia de halos alrededor de las colonias de los microorganismos aislados? ¿Qué genera la aparente degradación de la heteranthina?

Para resolver estas interrogantes, por una parte planteamos la evaluación de la estabilidad del sustrato la cual nos permitió entender los resultados obtenidos y por otra parte se consideró la composición del medio en el cual se aislaron los microorganismos.

7.4 Evaluación de la estabilidad del sustrato

La Tabla 7 muestra los valores obtenidos de longitud de onda máxima (λ_{\max}) y de absorbancia correspondiente a la λ_{\max} de las soluciones de heteranthina en etanol y en acetona a diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente.

Tabla 6. Valores de absorbancia y λ_{\max} de dos soluciones de heteranthina.

Muestra	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
	λ_{\max} (nm) Abs	λ_{\max} (nm) Abs	λ_{\max} (nm) Abs	λ_{\max} (nm) Abs
Heteranthina en solución alcohólica	394.5 1.041	392.5 0.908	392.5 0.908	392.5 0.559
Heteranthina en solución de acetona	393.5 1.500	393.0 1.395	393.0 1.043	391.0 0.818

Se observó en ambas soluciones un desplazamiento en λ_{\max} lo cual es característico de degradación de moléculas cromóforas. Se observa una menor absorbancia también como consecuencia de degradación de la heteranthina.

Los resultados mostraron inestabilidad en el sustrato, lo cual pudo ser el efecto observado y erróneamente considerado como degradación microbológica.

7.5 Evaluación de la producción de agarasas

Considerando las diferencias en la composición de los medios de cultivo usados cuando se aislaron K-38 y K-155 y el usado para la evaluación cuantitativa de la degradación de heteranthina por estos microorganismos, tenemos que el primero es sólido y el segundo líquido. La única diferencia en cuanto a la composición es el agar usado en el medio sólido.

Algunos microorganismos como *Clostridium thermocellum*, *Alteromonas sp*, *Streptomyces coelicolor*, entre otros (Gilbert y col. 1995), tienen la capacidad de producir agarasas permitiéndoles utilizar al agar como fuente de carbono.

Este ensayo se realizó para elucidar el uso del agar como fuente de carbono por los microorganismos aislados, ya que no crecieron con heteranthina como única fuente de carbono (medio líquido).

Las moléculas de yodo se intercalan en la estructura del agar y el complejo yodo-agar genera un color ámbar oscuro. Los sitios de degradación del agar se observan como zonas más claras debido a una menor cantidad de moléculas de yodo intercaladas debido a su ruptura.

Ambos microorganismos dieron positivo a la prueba de producción de agarasas. Se observaron halos claros alrededor de las colonias ligeramente teñidos con el lugol. Este resultado nos indicó que el crecimiento observado durante el aislamiento fue debido a la capacidad de los microorganismos de producir agarasas que les permitieron el uso del medio solidificado con agar como fuente de carbono.

Los halos observados y considerados como degradación de la heteranthina pudieron ser generados por el mismo efecto de la degradación del agar, la cual generara un cambio en la dispersión de la luz apreciando zonas más claras que el resto de la placa y erróneamente consideradas como degradación de la heteranthina.

7.6 Identificación de los microorganismos aislados

Simultáneamente con los ensayos realizados a los microorganismos aislados se efectuó una identificación preliminar con ayuda del cepario del IIB, por personal del mismo, en donde se amplificó y secuenció la región que codifica para la subunidad ribosomal 16S.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia obtenida se comparó en una base de datos. Los resultados preliminares indicaron que ambos microorganismos pertenecen al género *Streptomyces*.

K-38 mostró identidad del 99% *Streptomyces thermocarboxidus*. K-155 presentó una identidad del 98% con *Streptomyces thermocarboxidus* y con *Streptomyces aureus*.

Cuando se compararon las características de crecimiento de K-155 y *Streptomyces thermocarboxidus* en los medios ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 y ISP5 (indicados en el "International Streptomyces Project) mostraron diferencias en su morfología (Este trabajo lo está llevando a cabo Mariana Ávalos García como parte de su trabajo de tesis de licenciatura). La comparación con *Streptomyces aureus* se está se está llevando a cabo.

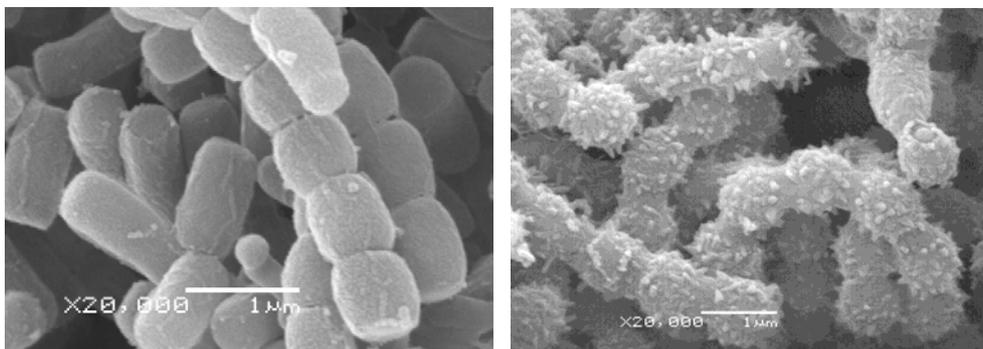


Fig 24 Micrografías de K-38 (izquierda) y K-155 (derecha)

Los resultados preliminares han mostrado que K-155 corresponde a una especie de estreptomiceto no reportada previamente.

Los estreptomicetos son de gran interés industrial debido a la diversidad de enzimas y metabolitos secundarios que son capaces de producir. Su capacidad de degradar biopolímeros está ligada a la producción de gran variedad de enzimas extracelulares (Gilbert y col. 1995). Además, son la principal fuente (70%) de varios antibióticos disponibles en el mercado incluyendo aminoglicosidos,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

antraciclinas, glicopéptidos entre otros (Sahin and Ugur, 2003, Okami and Hotta, 1988). El número de compuestos antimicrobianos reportados de especies de este género por año ha incrementado en las últimas dos décadas, razón por la cual son preferencialmente evaluados por su producción de antibióticos lo cual los hace de gran valor biotecnológico. Esta condición los hace de especial interés para su estudio.

En este momento se continúa con el trabajo de identificación para tener la seguridad de que se trata de nuevos microorganismos y de ser así, identificar algún probable uso.

7.7 Evaluación de la producción de antibióticos por los microorganismos aislados

Considerando el interés por especies del género *Streptomyces*, simultáneamente con su identificación se realizó un antibiograma preliminar para evaluar la viabilidad de sus estudios posteriores.

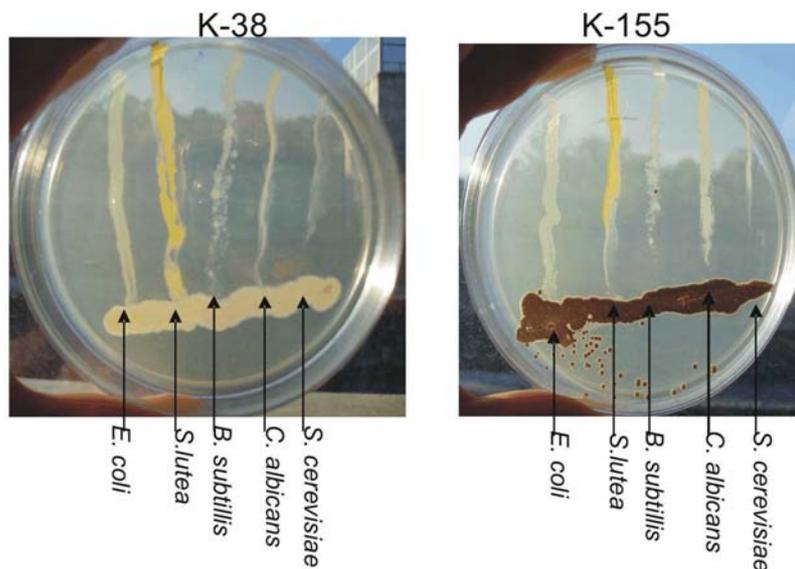


Fig 25. Antibiograma

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las placas se plantean en la Tabla 8. Se manejó una escala según el efecto de inhibición en el microorganismo probado, (-) para el que no se aprecia inhibición y (+) según el efecto de inhibición observado.

Tabla 7. Grados de inhibición en el antibiograma

Microorganismo de prueba	Inhibición	
	K-38	K-155
<i>C. albicans</i>	+	++
<i>S. cerevisiae</i>	++++	+++++
<i>B. subtilis</i>	++	++++
<i>S. lutea</i>	+	++
<i>E. coli</i>	-	+

Esta fue sólo una prueba rápida, pero se consideró de interés como antecedente para futuros estudios con estos microorganismos.

8

CONCLUSIONES

- ⇒ El rendimiento de la extracción de heteranthina a partir de la semilla de *Ditaxis heterantha* es muy bajo, y aunado al proceso de extracción hacen a este sustrato muy caro para su uso como materia prima para una biotransformación.
- ⇒ El sustrato con el que se ha trabajado no es un compuesto puro, por lo que la estructura reportada no corresponde a la fracción que se ha estado usando.
- ⇒ El crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio con heteranthina se debió a la presencia en la formulación de extracto de levadura y no a su capacidad de usara la heteranthina como fuente de carbono.
- ⇒ La cepa de *S. cerevisiae* usada no mostró actividad de degradación de la heteranthina en las condiciones de trabajo.
- ⇒ No se reprodujeron los resultados previamente reportados por Del Toro-Sánchez (2006), y comparándolos con los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible que no se haya trabajado con la misma cepa.

CONCLUSIONES

- ⇒ Los dos microorganismos posteriormente aislados crecieron en el medio de cultivo mínimo sólido con heteranthina como única fuente de carbono, sin embargo se demostró que son productores de agarasas por lo cual es posible que éste haya sido usado como la fuente de carbono.

- ⇒ Ninguno de los microorganismos aislados tienen la capacidad de degradar a la heteranthina.

- ⇒ Los microorganismos aislados de semilla molida de *Ditaxis heterantha* pertenecen al género *Streptomyces* de los cuales no se encuentra reportada su especie.

- ⇒ Éstos no presentan actividad de degradación de heteranthina, sin embargo se observó la presencia de actividad contra levaduras y ligeramente contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, lo que resulta de interés para futuras investigaciones.

9 PERSPECTIVAS

- ⇒ Se requiere continuar con los trabajos de identificación y caracterización de los microorganismos aislados para corroborar que éstos corresponden a especies no reportadas previamente.
- ⇒ Evaluar a detalle el efecto antibiótico producido por los microorganismos aislados.
- ⇒ Realizar un screening de la producción de otros metabolitos que pudieran ser de interés industrial.

10 REFERENCIAS

Abdullaev, F., Riverón, L., Caballero, H., Hernández, J., Pérez, I., Pereda, R. and Espinosa, J. (2003) **Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L).** *Toxicology in Vitro* 17 731- 736.

Baser, K. and Demirci, F. (2007) **Chemistry of Essential Oils.** In Berger, R. *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 45-63.

Berger, R., (2007). **The Flavour and Fragrance Industry Past, Present and Future.** Berger, R.G. (Ed.), XVI, 648 p. 236.

Binet, M., Commerreuc, S. and Verney, V. (2000) **Thermo-oxidation of polyterpenes: influence of the physical state.** *European Polymer Journal* 36: 2133-2142.

Bode, H., Zeeck, A., Plückhahn, K. and Jendrosseck, D. (2000) **Physiological and Chemical Investigations into Microbial Degradation of Synthetic Poly(cis-1,4-isoprene)** *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3680-3685.

Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H. and Leyser, O. (2004) **MAX3/CCD7 Is a carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule.** *Current Biology* 14:1232-1238.

Brandt, K., Haas, A., Hardt, T., Mayer-Figge, H., Merz, K. and Wallmichrath, T. (1999) **Synthesis of Germinal-bis(trifluoromethyl)-substituted dienes, heterodynes, 7,7,7,8,8,8-hexafluoro- β -cyclocitral and -safranal.** *Journal of Fluorine Chemistry* 97: 115-125.

REFERENCIAS

- Cadwallader, K. (2002) **Flavor Chemistry of Saffron**. In: Winterhalter P, and Rouseff R (eds) Carotenoid-derived aroma compounds (ACS symposium series 802). American Chemical Society, Washington, D.C., pp 220-238.
- Cao, Y., Guo, X., Zhang, Q., Cao, Z., Zhao, Y. and Zhang, H. (2005) **Isolation and Characterization of Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene in Halophyte *Suaeda salsa***. Plant Growth Regulation 46: 61-67.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T. and Gunata, Z. (2007) **Interactions Between Aroma Compounds and Whole Mannoprotein Isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Strains**. Food Chemistry 100: 22-30.
- Chapuis, A. and Jacoby, D. (2001) **Catalysis in the Preparation of fragrances and Flavours**. Applied Catalysis A: General 221: 93-117.
- Crouzet, J. and Kanasawud, P. (1992) **Formation of Volatile Compounds by Thermal Degradation of Carotenoids**. Methods in Enzymology 213: 54-62.
- Damasceno, S., Cereda, M., Pastore, G. and Oliveira, J. (2003) **Production of Volatile Compounds by *Geotrichum fragrans* Using Cassava Wastewater as Substrate**. Process Biochemistry 39 (441-414).
- De Carvalho, CCR. and da Fonseca, MMR. (2006) **Biotransformation of Terpenes**. Biotechnology Advances 24: 134-142.
- Del Toro, L., Sánchez, S., Ortiz, M., Villanueva, S. and Lugo, E. (2006) **Generation of Aroma Compounds from *Ditaxis heterantha* by *Saccharomyces cerevisiae***. Applied Microbiology And Biotechnology 72: 155-162.
- Dötter, S. (2006) **El aroma Floral Como Atrayente Para Polillas y Abejas**. Ed. CIFA La Mojonera-La Cañada IFAPA. La Mojonera (Almería), España.
- Enzell, C. (1985) **Biodegradation of carotenoids an important route to aroma compounds**. Pure & Appl. Chem. Vol. 57, 693-700.
- Feron, G., Bonnarme, P. and Durand A. (1996) **Prospects for the Microbial Production of Food Flavours**. Trend In Food Science & Technology 7: 285-293.
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. And Kluepfel, D. (1995) **Production and Secretion of Proteins by *Streptomyces***. Critical Reviews in Biotechnology 15(1): 13-39
- Gramss, G. and Rudeschko, O. (1998) **Activities of oxidoreductase enzymes in tissue extracts and sterile root exudates of three crop plants, and some properties of the peroxidase component**. New Phytologist 138: 401-409.

REFERENCIAS

Gross, J. (1991) **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids.** London. 1991. p. 351.

Jeevarajan, A., Kispert, L., Chumanov, G., Zhou, C. and Cotton, T. (1996) **Resonance Raman Study of Carotenoid Cation Radicals.** Chemical Physics Letters 259: 515-522.

Jin, Y., Veiga, M. and Kennes, C. (2006) **Performance optimization of the fungal biodegradation of α -pinene in gas-phase biofilter.** Process Biochemistry 41: 1722-1728.

Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J., Vogt, K., Lederer, M., Breithaupt, D. and von Lintig, J. (2001) **Identification and Characterization of a Mammalian Enzyme Catalyzing the Asymmetric Oxidative Cleavage of Provitamin A.** The Journal of Biological Chemistry 276: 14110-14116.

Kloer, D.P. and Schulz, G. E. (2006) **Structural and biological aspects of carotenoid cleavage.** Cellular and Molecular Life Science 63: 2291-2303.

Krings, U. and Berger, R. (1998) **Biotechnological Production of Flavours and Fragrances.** Applied Microbiology and Biotechnology 49: 1-8.

Križman, M., Baričević, D. and Prošek, M. (2006) **Fast quantitative determination of volatile constituents in fennel by headspace-gas chromatography.** Analytica Chimica Acta 557: 267-271.

Lacey, M., Tan, Z., Webb, A and Sweedler, J. (2001) **Union of Capillary high-performance Liquid Chromatography and Microcoil Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Applied to the Separation and Identification of Terpenoids.** Journal of Chromatography A. 922: 139-149.

Laing, D. and Jinks, A. (1996) **Flavour Perception Mechanisms.** Special Issue of Trends in Food Science & Technology of Flavour Perception 7, Number 12, 387-389.

Lakshman, M. (2004) **Alpha and Omega of Carotenoid Cleavage.** Journal of Nutrition 134: 241S-245S.

Larroche, C., Gros, J. and Fontanille, P. (2002) **Microbial Processes.** In Berger, R. Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 575.

Lee, J. and Kim, Y. (2006) **Cloning and Characterization of the Astaxanthin Biosynthesis Gene Cluster from the Marine Bacterium *Paracoccus haeundaensis*.** Gene 370: 86-95.

REFERENCIAS

- Lee, P. and Schmidt-Dannert, C. (2002) **Metabolic Engineering Towards Biotechnological Production of Carotenoids in Microorganisms**. Applied Microbiology And Biotechnology 60: 1-11.
- Leffingwell, J. (2002) **Saffron**. Leffingwell Reports 2:1-6.
- Leuenberger, M., Engeloch-Jarret, C. and Woggon, W. (2001) **The Reaction Mechanism of the Enzyme-Catalyzed Central Cleavage of β -Carotene to Retinal**. Angew. Chem. int. 40:2614-2617.
- Lindqvist, A. and Andersson, S. (2002) **Biochemical Properties of Purified Recombinant Human β -Carotene_{15,15'}-Monooxygenase**. The Journal of Biological Chemistry 277: 23942-23948.
- Loskutov, A., Beninger, C., Hosfield, G. and Sink, K. (2000) **Development of an Improved Procedure for Extraction and Quantitation of Safranal in Stigmas of *Crocus sativus* L. using high Performance Liquid Chromatography**. Food Chemistry 69: 87-95.
- Lozano, P., Castelar, M., Simancas, M., and Iborra, J. (1999) **Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L) products**. Journal of Chromatography A. 830: 477-483.
- Lozano, P., Delgado, D., Gómez, D., Rubio, M. and Iborra, J. (2000) **A non-destructive method to determine the safranal content of saffron (*Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gaschromatography**. Journal Of Biochemical And Biophysical Methods 43: 367-378.
- Maldonado, G., Rodriguez, E., Sanchez, A., Rodríguez, R. and Sanchez, S. (2003) **Production of Tobacco Aroma from Lutein. Specific Role of the Microorganisms Involved in the Process**. Applied Microbiology And Biotechnology 62: 484-488.
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K. and Akimoto, N. (2001) **Isolation of a Series of Apocarotenoids from the Fruits of the Red Paprika *Capsicum annuum* L.** 49: 1601-1606.
- Marasco, E., Vay, K. and Schmidt-Dannert, C. (2006) **Identification of Carotenoid Cleavage Dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with Different Cleavage Activities**. Journal of Biological Chemistry 281:31583-31593.
- Margalith, P. (1999) **Production of Ketocarotenoids by Microalgae**. Applied Microbiology And Biotechnology 51: 431-438.

REFERENCIAS

- Meléndez, A., Vicario, I., Heredia, F. (2004) **Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición ISSN 0004-0622.
- Meléndez, A., Vicario, I. y Heredia, F. (2007) **Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas.** Archivos Latinoamericanos De Nutricion 57: 109-117.
- Méndez-Robles, M., Flores, C., Jaramillo, M., Orozco, I. and Lugo, E. (2004) **Chemical Composition And Current Distribution Of “Azafrán de Bolita” (*Ditaxis heterantha* Zucc; Euphorbiaceae): A Food Pigment Producing Plant.** Economic Botany 58(4) pp. 530–535.
- Méndez-Robles, M., 1995. **“Identificación y caracterización del pigmento obtenido a partir de semillas del azafrán de bolita (*Ditaxis heterantha*)”.** Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional, México D. F., México.
- Méndez-Robles, M., Permady, H., Jaramillo, M., Lugo, E., Cardador, A., López, F., Cerda, C. and Tamariz, J. (2006) **C-26 and C-30 Apocarotenoids from Seeds of *Ditaxis heterantha* with Antioxidant Activity and Protection against DNA Oxidative Damage.** *Journal of Natural Products* 69: 1140 -1144.
- Mercadante, A. (1999) **New Carotenoids: Recent Progress.** Pure and Applied Chemistry 71: 2263-2272.
- Mijts, B. N., Lee, P. C., and Schmidt-Dannert, C. (2004) **Engineering Carotenoid Biosynthetic Pathways.** *Methods in Enzymology* 388:315-329.
- Mijts, B. N., Lee, P. C., and Schmidt-Dannert, C. (2005) **Identification of Carotenoid Oxygenase Synthesizing Acyclic Xanthophylls: Combinatorial Biosynthesis and Directed Evolution.** *Chemistry & Biology* 12: 453-460.
- Navarrete, J., Jiménez, H., Botello, E., Rico, R. and Paredes, O. (2004) **Improving Xanthophyll Extraction from Marigold Flower Using Cellulolytic Enzymes.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:3394-3398.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. and Sumitomo K. (2006) **Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CmCCD4a) Contributes to White Color Formation in Chrysanthemum Petals.** *Plant Physiology* 142: 1193-1201.
- Okami, Y. and Hotta, K. (1988) **Search and discovery of new antibiotics.** p. 33-67. In M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordarski (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology.*
- Pfander, H. and Schurtenberger, H. (1982) **Biosynthesis of C20-carotenoids.** *Phytochem* 21: 1039-1042.

REFERENCIAS

- Polyakov, N., Leshina, T., Konovalova, T. and Kispert, L. (2001) **Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction: Antioxidants or Pro-oxidants?** Free Radical Biology & Medicine 31: 398-404.
- Ravichandran, R. (2002) **Carotenoid Composition, Distribution and Degradation to Flavour Volatiles during Black Tea Manufacture and the Effect of Carotenoid Supplementation on Tea Quality and Aroma.** Food Chemistry 78: 23-28.
- Redmond, T. M., Gentleman, S. Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gant, E. and Cunningham, F. X. (2001) **Identification, Expression, and Substrate Specificity of a Mammalian β -Caroten 15,15'-Dioxygenase.** The Journal Of Biological Chemistry 276: 6560-6565.
- Rodríguez-Amaya, D. (2005) **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.** ILSI Press. International Life Sciences Institute, One Thomas Circle, N.W. Washington, D. C.
- Rodríguez, E., Maldonado, G., Ortiz, M., Díaz, C. and Sanchez, S. (2005) **Bioconversion of Lutein Using a Microbial Mixture-Maximizing the Production of Tobacco Aroma Compounds by Manipulation of cultura Médium.** Biotechnological Products and Process engineering 68: 174-182.
- Rodríguez, E. and Sánchez, S. (2007) **Microbial production of C₁₃-Norisoprenoids and Other Aroma Compounds via Carotenoid Cleavage.** Critical Reviews in Microbiology 33: 211-230.
- Sánchez, A., Jiménez, M. and Sánchez, S. (2000) **Bioconversion of Lutein to Products with Aroma.** Applied Microbiology And Biotechnology 54:528-534.
- Sandman, G. (1994) **Carotenoid Biosynthesis in Microorganisms and Plants.** European Journal of Biochemistry 223: 7-14.
- Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knörzer, O. and Börger, P. (1999) **The Biotechnological Potencial and Design of Novel Carotenoids by Gene Combination in *Escherichia coli*.** Trends in Biotechnology 17: 233-237.
- Saeidnia, S., Gohari, A., Uchiyama, N., Ito, M., Honda, G. and Kiuchi, F. (2004) **Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from *Dracocephalum kotschya*.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 52: 1249-1250.
- Sahin, N. and Ugur, A. (2003) **Investigation of the Antimicrobial Activity of some Streptomyces isolates.** Turkish Journal of Biology 27: 79-84.
- Schöller, C., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S. and Wilkins, K. (2002) **Volatile Metabolites from Actinomycetes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry.

REFERENCIAS

- Schmidt-Dannert, C. (2000) **Engineering Novel Carotenoids in Microorganisms**. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 255-261.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. and Arnold, F. (2000) **Molecular Breeding of Carotenoid Biosynthetic Pathways**. *Nature Biotechnology* 18: 750-753.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. and Schwab, W. (2006) **The Carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* Is a Dioxigenase**. *The Journal Of Biological Chemistry* 281: 9845-9851.
- Schrader, J. (2007) **Microbial Flavour Production**. In Berger, R. *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 507-540.
- Schwartz, S. H., Qin, X. and Loewen, M. C. (2004) **The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates that a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching**. *The Journal Of Biological Chemistry* 279: 46940-46945.
- Schwartz, S. H., Qin, X. and Zeevaart, J. A. (2001) **Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxigenase from Plants**. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 25208-25211.
- Simkin, A., Underwood, B., Auldrige, M., Loucas, H., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. and Klee, H. (2004) **Circadian Regulation of the PhCCD1 Carotenoid Cleavage Dioxigenase Control Emission of β -Ionone, a Fragrance Volatile of *Petunia* Flowers**. *Plant Physiology* 136: 3504-3514.
- Simkim, A., Schwartz, S., Auldrige, M., Taylor, M. and Klee, H. (2004) **The Tomato Carotenoid Cleavage Dioxigenase 1 Genes Contribute to the Formation of the Favor Volatiles β -ionone, Pseudoionone, and Geranylacetone**. *The Plant Journal* 40: 882-892.
- Simpson, B. And Haard, N. (1985) **The use of Proteolytic Enzymes to Extract carotenoprotein from Shrimp Waste**. *Journal of Applied Biochemistry* 7: 212-222.
- Stark, D., Kormann, H., Münch, T., Sonnleitner, B. and Marison, I. (2003) **Novel Type of In Situ Extraction: Use of Solvent Containing Microcapsules for the Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 376-385.
- Steiger, S., Takaichi, S. and Sandmann, G. (2002) **Heterologous Production of two unusual acyclic Carotenoids, 1,1'-dihydroxy-3,4-didehydrolycopene and 1-hidroxy-3,4,3',4'-tetrahydrolycopene by combination of the *crtC* and *crtD* genes from *Rhodobacter* and *Rubrivivax***. *Journal of Biotechnology* 97: 51-58.

REFERENCIAS

- Tan, B. C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K. and McCarty, D.R. (2003) **Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family**. The Plant Journal 35: 44-56.
- Tsushima, M., Katsuyama, M. and Matsuno, T. (1997) **Metabolism of Carotenoids in the Apple Snail, *Pomacea Canaliculata***. Comparative Biochemistry And Physiology 118B: 431-436.
- Umeno, D., Tobias, A. and Arnold, F. (2005) **Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution**. Microbiology and Molecular Biology Reviews 69: 51-78.
- Van den Berg, V., Vanhees, I., De Boer, R., Compernelle, F. and Vinckier, C. (2000) **Identification of the oxidation products of the reaction between (pinene and hydroxyl radicals by gas and high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection**. Journal of Chromatography A 896: 135-148.
- Veiga, P., Blasco, L., Rosa dos Santos, F., Poza, M. and Villa, T. (2005) **Influence of cultura conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production**. International Microbiology 8: 55-58.
- Von-Lintig, J. and Vogt, K. (2000) Filling the Gap in Vitamin A Research. **Molecular Identification of an Enzyme Cleaving β -carotene to Retinal**. The Journal of Biological Chemistry 275: 11915-11920.
- Von-Lintig, J. and Vogt, K. (2004) **Vitamin A Formation in Animals: Molecular Identification and Functional Characterization of Carotene Cleaving Enzymes**. Journal of Nutrition. 134: 251S-256S.
- Winterhalter, P. (1996) **Carotenoid-derived aroma compounds: Biogenetical and Biotechnological Aspects**, in: **Biotechnology for Improved Food and Flavors**. Some Recent Advances, ACS Symposium Serie 637. American Chemical Society, Whashington, D.C., 1996. 295-308.
- Winterhalter, P. and Rouseff, R. (2002) **Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction**. In: Winterhalter P, and Rouseff R (eds) Carotenoid-derived aroma compounds (ACS symposium series 802). American Chemical Society, Washington, D.C., pp 3, -19.
- Wisthaler, P. and Straubinger, M. (2000) **Saffron-Renewed Interest in an Ancient Spice**. Food Reviews International, Volume 16, Issue 1, pages 39-59.
- Wisthaler, A., Jensen, N., Winterhalter, R., Lindinger, W. and Hjorth, J. (2001) **Measurements of Acetone and other gas phase product yields from the OH-initiated oxidation of terpenes by proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS)** Atmospheric Environment 35: 6181-6191.

Wyss, A. (2004) **Carotene Oxygenases: A New Family of Double Bond Cleavage Enzymes**. Journal of Nutrition 134: 246S-250S.

Zorn, H., Neuser, F. and Berger, R (2004) **Degradation of α -pinene oxide and [2H7]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by Pseudomonas Fluorescens NCIMB 11761**. Journal of Biotechnology 107: 255-263.

Zorn, H., Lahghoff, S., Scheibner, M. and Berger, R. (2004) **Cleavage of β,β -Carotene to Flavor Compounds by Fungy**. Applied Microbiology and Biotechnology 62: 331-336.

Zougagh, M., Simonet, B., Ríos, A. and Varcárcel, M. (2005) **Use of Non-aqueous Capillary Electrophoresis for the Quality Control of Commercial saffron Samples**. Journal of Chromatography A 1085:293-298.

Zougagh, M., Ríos, A. and Varcárcel, M. (2006) **Determination of Total Safranal by *in situ* Acid Hydrolysis in Supercritical Fluid Media: Application to the Quality Control of Commercial Saffron**. Analytica Chimica Acta. 578: 117-121