

**EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -  
PINENO EMPLEANDO CÉLULAS DE *Rhodococcus opacus* DSM 44313 Y  
*Aspergillus niger* DSM 821**

**JENNIFER PILAR ROJAS LLANES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2009**

**EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -  
PINENO EMPLEANDO CÉLULAS DE *Rhodococcus opacus* DSM 44313 Y  
*Aspergillus niger* DSM 821**

**JENNIFER PILAR ROJAS LLANES**

**Trabajo de investigación presentado como requisito  
parcial para optar al título de Magíster en Química**

**Directora**

**Janeth Aide Perea Villamil**

**Química, Magister en Química, Doctora en Química**

**Codirectora**

**Claudia Cristina Ortiz López**

**Microbióloga, Magíster en Ciencias de la Ingeniería, Doctora en Ciencias**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2009**

***Este logro se lo dedico a Pilar Llanes Castellanos,  
mi madre, mi hermana, mi amiga***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a la Santísima Virgen María y a mi Ángel de la Guarda, por acompañarme y protegerme en todo momento.

A mis padres, por el amor que me han brindado.

A la doctora Janeth Aide Perea Villamil, por su apoyo durante mi formación de pregrado y maestría.

A la doctora Claudia Cristina Ortiz López, por el tiempo dedicado en la codirección del proyecto.

Al bacteriólogo Andrés Rueda, por enseñarme de manera desinteresada y paciente los procedimientos microbiológicos.

A Gloria Prieto, por trasmitirme su experiencia en este tipo de proyectos.

Al doctor Jorge Hernández, director del CINBIN, y al biólogo Genis Castillo, por su colaboración en el desarrollo experimental.

A los integrantes del CICTA, por todos los momentos compartidos.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, por apoyar la investigación en Colombia, y a la doctora Elena Stashenko, por gestionar la financiación de este proyecto.

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	4
1.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS	4
1.1.1 Ventajas del uso de biocatalizadores en la transformación de monoterpenos	5
1.1.2 Enzimas implicadas en la biotransformación de monoterpenos	8
1.1.3 Problemas encontrados en los estudios de biotransformación de monoterpenos	13
1.1.4 Microorganismos empleados en la biotransformación de monoterpenos	17
1.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL	22
1.2.1 Biotransformación de geraniol empleando bacterias	22
1.2.2 Biotransformación de geraniol empleando hongos	24
1.2.3 Biotransformación de geraniol empleando células vegetales	27
1.2.4 Principales productos obtenidos en la biotransformación de geraniol	28
1.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE $\alpha$ -PINENO	30
1.3.1 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando bacterias	31
1.3.2 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando hongos	32
1.3.3 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando células vegetales	33
1.3.4 Principales productos obtenidos en la biotransformación de $\alpha$ -pineno	34
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	36
2.1 REACTIVOS MATERIALES Y EQUIPOS	36

2.2	SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	39
2.2.1	Reactivación, crecimiento y mantenimiento de la bacteria	39
2.2.2	Cinéticas de crecimiento bacteriano	39
2.3	BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	40
2.3.1	Procedimiento general de biotransformación	40
2.3.2	Efecto de la fase de crecimiento de la bacteria	41
2.3.3	Evaluación del efecto del etanol como cosolvente de los sustratos	41
2.3.4	Evaluación de la concentración de sustrato y cinética de la reacción	41
2.3.5	Reacciones de biotransformación en un medio mineral	42
2.4	BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	42
2.4.1	Procedimiento general de biotransformación	43
2.4.2	Efecto de la fase de crecimiento del hongo	44
2.4.3	Evaluación de la concentración de sustrato	44
2.4.4	Evaluación del efecto del etanol como cosolvente	44
2.5	EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS	45
2.6	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	45
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
3.1	SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	46
3.2	BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL UTILIZANDO LA CEPA <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	50
3.2.1	Biotransformación en el medio TSB	50
3.2.2	Biotransformación en el medio YG	52

3.2.3	Efecto de la concentración de sustrato y cinética de la biotransformación	53
3.2.4	Biotransformación en un medio mineral	55
3.3	BIOTRANSFORMACIÓN DE (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	56
3.3.1	Biotransformación en el medio TSB	57
3.3.2	Biotransformación en el medio YG	57
3.3.3	Efecto de la concentración de sustrato y cinética de la biotransformación	58
3.3.4	Biotransformación en un medio mineral	59
3.4	BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL UTILIZANDO LA CEPA <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	63
3.5	BIOTRANSFORMACIÓN DE (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	69
	<b>CONCLUSIONES</b>	78
	<b>RECOMENDACIÓN</b>	80
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	81

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Productos de la biotransformación de geraniol en el medio TSB inoculado con <i>R. opacus</i> en la fase de crecimiento exponencial	51
<b>Tabla 2.</b> Productos de la biotransformación de geraniol en el medio YG inoculado con <i>R. opacus</i> en diferentes fases de crecimiento	53
<b>Tabla 3.</b> Producción de ácido geránico en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol utilizando <i>R. opacus</i>	54
<b>Tabla 4.</b> Producción de <i>cis</i> -verbenol (mg/L) en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en el medio TSB inoculado con <i>R. opacus</i> en la fase de crecimiento exponencial	57
<b>Tabla 5.</b> Productos de la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en el medio YG inoculado con <i>R. opacus</i> en diferentes fases de crecimiento	58
<b>Tabla 6.</b> Producción de <i>cis</i> -verbenol en la biotransformación de diferentes concentraciones de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno	59
<b>Tabla 7.</b> Condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	63
<b>Tabla 8.</b> Concentración de linalol (mg/L) en la biotransformación de geraniol con esporas recuperadas en diferentes días de crecimiento de <i>A. niger</i>	64
<b>Tabla 9.</b> Investigaciones publicadas para la biotransformación de geraniol empleando hongos	68

<b>Tabla 10.</b>	Concentración de $\alpha$ -terpineol y verbenona (mg/L) en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con esporas recuperadas en diferentes días de crecimiento de <i>A. niger</i>	69
<b>Tabla 11.</b>	Efecto del cosolvente en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	73
<b>Tabla 12.</b>	Investigaciones publicadas para la biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando hongos	74
<b>Tabla 13.</b>	Comparación entre las concentraciones de productos obtenidas por Pescheck et al., (2009) y el presente trabajo	75
<b>Tabla 14.</b>	Condiciones con las cuales se alcanzaron los mayores rendimientos en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313 y <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	77

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313 después de 4 días de incubación a diferentes temperaturas utilizando los medios TSA y YGA	47
<b>Figura 2.</b> <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313 después de 4 días de incubación en medio mineral.	48
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313 en el medio TSB	49
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313 en el medio YG	49
<b>Figura 5.</b> Cinética de producción de ácido geránico en la biotransformación de geraniol (20 mM) utilizando <i>R. opacus</i> DSM 44313	54
<b>Figura 6.</b> Cinética de producción de <i>cis</i> -verbenol en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno (35 mM) utilizando <i>R. opacus</i> DSM 44313	60
<b>Figura 7.</b> Curva de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821 en medio MEA a 29 °C	64
<b>Figura 8.</b> Concentraciones de linalol producido en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol empleando la cepa <i>A. niger</i> DSM 821	65
<b>Figura 9.</b> Conversión de geraniol en la biotransformación de diferentes concentraciones de sustrato utilizando <i>A. niger</i> DSM 821	66

<b>Figura 10.</b>	Producción de linalol en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol utilizando la cepa <i>A. niger</i> DSM 821	66
<b>Figura 11.</b>	Efecto del etanol como cosolvente del sustrato en la biotransformación de geraniol utilizando la cepa <i>A. niger</i> DSM 821	67
<b>Figura 12.</b>	Estructura del $\alpha$ -pineno y de los compuestos obtenidos durante su biotransformación utilizando células de <i>A. niger</i> DSM 821	70
<b>Figura 13.</b>	Efecto de la concentración de sustrato y del tiempo de reacción en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno mediante células de <i>Aspergillus niger</i> DSM 821	71
<b>Figura 14.</b>	Conversión de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en la biotransformación de diferentes concentraciones de sustrato utilizando <i>A. niger</i> DSM 821	72
<b>Figura 15.</b>	Producción de $\alpha$ -terpineol y verbenona en la biotransformación de diferentes concentraciones de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando la cepa <i>A. niger</i> DSM 821	72

## LISTA DE ESQUEMAS

		pág.
<b>Esquema 1.</b>	Biotransformación de (-)-carvona y (+)-carvona por <i>Aspergillus niger</i>	7
<b>Esquema 2.</b>	Reacciones catalizadas por oxigenasas tipo P450	9
<b>Esquema 3.</b>	Biotransformaciones realizadas por diferentes cepas de <i>Rhodococcus</i>	19
<b>Esquema 4.</b>	Reacciones de oxidación realizadas por diferentes enzimas de <i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14	20
<b>Esquema 5.</b>	Biotransformación de limoneno por células de <i>Rhodococcus opacus</i> PWD4	21
<b>Esquema 6.</b>	Posibles rutas para la biotransformación de geraniol por <i>Pseudomonas incognita</i>	23
<b>Esquema 7.</b>	Reducción de geraniol a R-citronelol empleando levaduras de pan	24
<b>Esquema 8.</b>	Biotransformación de citrol y citral en 6-metil-5-hepten-2-ona por cultivos de superficie esporulada de <i>Penicillium digitatum</i>	25
<b>Esquema 9.</b>	Biotransformación de geraniol por cultivos de superficie esporulada de <i>Aspergillus niger</i>	26
<b>Esquema 10.</b>	Biotransformación de geraniol por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
<b>Esquema 11.</b>	Hidroxilación regioespecífica de geraniol por células de <i>Aspergillus niger</i>	27
<b>Esquema 12.</b>	Biotransformación de geraniol usando cultivos celulares de <i>Cucurbita maxima</i>	27

<b>Esquema 13.</b>	Biotransformación de geraniol por células de <i>Catharanthus roseus</i>	28
<b>Esquema 14.</b>	Biotransformación de $\alpha$ -pineno mediante células de <i>Psycotria brachyceras</i> y <i>Rauvolfia sellowii</i>	34
<b>Esquema 15.</b>	Biotransformación de geraniol utilizando células de <i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313	51

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO EMPLEANDO CÉLULAS DE *Rhodococcus opacus* DSM 44313 Y *Aspergillus niger* DSM 821\*

**AUTOR:** Jennifer Pilar Rojas Llanes\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Biotransformación, geraniol, pineno, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*

### CONTENIDO:

La biotransformación de monoterpenos produce compuestos de valor agregado que pueden considerarse naturales debido a que se obtienen por procesos enzimáticos a partir de precursores aislados de la naturaleza. Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando la cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y la cepa fúngica *Aspergillus niger* DSM 821. Los experimentos se hicieron a escala de laboratorio en viales de 20 mL y se estudiaron diferentes parámetros de reacción.

Para un mismo sustrato la bacteria generó diferentes compuestos dependiendo del medio de cultivo. Con geraniol se produjeron geranial, ácido geránico y 6-metil-5-hepten-2-ona en el medio TSB, y geranial, neral y nerol cuando la biotransformación se realizó en el medio YG. Con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno la bacteria produjo *cis*-verbenol en los medios TSB y mineral, y cuando la biotransformación se realizó en el medio YG, además del *cis*-verbenol se produjeron canfeno y tujol.

El único producto en la biotransformación de geraniol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821 fue el linalol (518.8 mg/L), mientras que con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se produjeron  $\alpha$ -terpineol, verbenona, *trans*-sobrerol, canfeno,  $\beta$ -pineno y pinocarveol, siendo el producto mayoritario el  $\alpha$ -terpineol (177.9 mg/L), y la verbenona (78.0 mg/L) el compuesto de mayor valor agregado.

Las concentraciones de los productos dependieron de la fase de crecimiento de los microorganismos, de la concentración de sustrato, del tiempo de reacción y de la presencia del etanol como cosolvente.

Las cepas empleadas llevaron a cabo la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, produciendo compuestos con aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística, sin embargo, bajo las condiciones empleadas los rendimientos fueron bajos.

---

\* Trabajo de Investigación Maestría en Química

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Janeth Aide Perea Villamil. Codirectora: Claudia Cristina Ortiz López

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE BIOTRANSFORMATION OF GERANIOL AND (R)-(+)- $\alpha$ -PINENE USING CELLS FROM *Rhodococcus opacus* DSM 44313 AND *Aspergillus niger* DSM 821 DSM\*

**AUTHOR:** Jennifer Pilar Rojas Llanes\*\*

**KEYWORDS:** Biotransformation, geraniol, pinene, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*

### CONTENT:

Biotransformation of monoterpenes produces added value compounds that can be considered natural because they are obtained by enzymatic processes from precursors isolated from nature. From the above, in the present investigation the biotransformation of geraniol and (R)-(+)- $\alpha$ -pinene using the bacterial strain *Rhodococcus opacus* DSM and 44313 and fungal strain *Aspergillus niger* DSM 821 was evaluated. The experiments were made at laboratory scale in 20 mL vials and various reaction parameters were studied.

For the same substrate the bacteria produced different compounds depending of the culture medium. With geraniol were produced, geranial, geranic acid and 6-methyl-5-hepten-2-one in the medium TSB, and geranial, neral and nerol when the biotransformation was carried out in the medium YG. With the (R)-(+)- $\alpha$ -pinene the bacteria produced *cis*-verbenol in TSB and mineral mediums, and when the biotransformation was carried out in the YG medium, besides the *cis*-verbenol, camphene and thujol were produced.

The only product in the biotransformation of geraniol using *Aspergillus niger* DSM 821 was linalool (518.8 mg/L), whereas with the (R)-(+)- $\alpha$ -pinene were produced  $\alpha$ -terpineol, verbenone, *trans*-sobrerol, camphene,  $\beta$ -pinene and pinocarveol, being the major product the  $\alpha$ -terpineol (177.9 mg/L) and the verbenone (78.0 mg/L) the compound of higher added value.

The products concentrations depended of the growth phase of microorganisms, substrate concentration, reaction time and the presence of ethanol as cosolvent.

The strains used carried out the biotransformation of geraniol and (R)-(+)- $\alpha$ -pinene, producing compounds with applications in food, pharmaceutical and perfumery industries, however, under the conditions employed the yields were low.

---

\* Research Work Master in Chemistry

\*\* Science Faculty. Chemistry Department. Director: Janeth Aide Perea Villamil. Codirector: Claudia Cristina Ortiz López

## INTRODUCCIÓN

El interés en la obtención de compuestos naturales ha aumentado la investigación acerca de la producción biotecnológica de estas sustancias. Estos productos pueden extraerse del material vegetal, pero algunos de los compuestos presentes en las plantas, que exhiben excelentes propiedades ya sea como agentes aromatizantes, saborizantes o como productos farmacéuticos, no están disponibles en cantidades industriales. Por este motivo se hace necesaria su síntesis a partir de precursores con mayor disponibilidad y menor valor comercial, empleando biocatalizadores para conservar la denominación de 'natural' (Rozembaum et al., 2006), debido a que la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha definido como "*sustancias naturales*", únicamente a aquellas que pueden obtenerse por procesos físicos, enzimáticos o microbianos a partir de precursores aislados de la naturaleza (Serra et al., 2005).

Algunos de estos procesos se han llevado a cabo de forma comercial, por ejemplo, en países como Alemania cerca del 70% de todos los aromas usados en 1990 fueron naturales (Demyttenaere y De Kimpe, 2001). Además, se estima que las biotransformaciones podrían abarcar hasta el 30% de la síntesis química para el año 2050 (Gavrilescu y Chisti, 2005).

Las biotransformaciones pueden realizarse empleando células completas o enzimas obtenidas a partir de diferentes organismos, en forma soluble o inmovilizada en ambos casos. Su aplicación genera procesos de tecnología limpia, realizándose en condiciones de reacción moderadas y permite solucionar algunos de los inconvenientes que presentan los catalizadores químicos, los cuales, debido a su naturaleza inorgánica provienen de recursos no renovables,

son costosos y pueden presentar un alto grado de toxicidad (Gavrilescu y Chisti, 2005; Serra et al., 2005).

Entre los sustratos utilizados con fines biocatalíticos se encuentran los terpenos, compuestos que constituyen el grupo más grande de productos naturales con cerca de 40 mil estructuras conocidas hasta ahora (De Carvalho y Da Fonseca, 2006). Entre ellos se encuentran los monoterpenos, que con más de 400 estructuras (Van der Werf et al., 1999) constituyen sustratos disponibles como material de partida para la producción biotecnológica de compuestos naturales con aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística, mejorando su valor comercial.

El geraniol y el pineno son monoterpenos empleados en procesos de biotransformación para la producción de compuestos con importantes aplicaciones. Las biotransformaciones de geraniol dan lugar a la obtención de  $\alpha$ -terpineol, linalol y 6-metil-5-hepten-2-ona (Demyttenaere y De Kimpe, 2001), utilizados como aromatizantes y saborizantes (Maróstica y Pastore, 2007; Da Silva et al., 2006; Demyttenaere et al., 2001), así como de 10-hidroxigeraniol, 10-hidroxinerol y 10-hidroxicitronelol (Hamada et al., 1997), reconocidos como agentes antihipertensivos (Loyola et al., 2004) y de ácido geránico (Nagaki et al., 2007; Chatterjee, 2004; Whitehead y Ohleyer, 1997), reconocido por sus propiedades anticancerígenas (Nagaki et al., 2007). Igualmente importantes son las biotransformaciones de  $\alpha$ -pineno, que producen principalmente verbenol y verbenona (Divyashree et al., 2006; Rozenbaum et al., 2006; Vanek et al., 2005; Lindmark et al., 2003; Agrawal y Joseph, 2000), compuestos usados en las industrias de alimentos, fragancias y fármacos (Limberger et al., 2007; Ancel et al., 2004).

Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó la biotransformación de los terpenos geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando la cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y la cepa fúngica *Aspergillus niger* DSM 821, teniendo en cuenta que estos microorganismos producen enzimas oxigenasas (Hayaishi, O. 2004) que permiten generar compuestos de mayor valor agregado.

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Proyecto 8159, se desarrolló en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos –CICTA- y los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizaron en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

Resultados parciales de este trabajo se presentaron bajo la modalidad de póster en el VIII Curso Latinoamericano de Biotecnología realizado en Junio de 2008 en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Además fue aceptado un artículo para publicación en la revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial (ISSN: 1909-9959) Volumen VII No. 2 de 2009, y se envió un artículo de revisión a la revista Salud UIS (ISSN: 0121-0807) sobre los compuestos con potenciales aplicaciones farmacológicas obtenidos mediante biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE MONOTERPENOS

Las biotransformaciones son modificaciones químicas sobre sustratos exógenos naturales o sintéticos, que emplean células o enzimas aisladas para producir compuestos con mayor actividad biológica y valor agregado. Las biotransformaciones son importantes en síntesis orgánica para la producción de químicos finos y precursores quirales que no pueden sintetizarse eficientemente por otros métodos (Pinheiro y Marsaioli, 2007; Valadez et al., 2007), lo que ha conllevado a que el número de procesos de biotransformación a escala industrial incremente continuamente (Straathof et al., 2002).

Los monoterpenos son hidrocarburos de cadena ramificada formados por dos unidades isopreno. Ellos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han identificado más de 400 estructuras. En particular, los derivados oxigenados de los monoterpenos, comúnmente conocidos como terpenoides, tiene olores fuertes y agradables. Muchos de estos terpenoides cuando se obtienen de fuentes naturales se consideran aditivos alimentarios seguros, GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros). Varios monoterpenos ampliamente disponibles, como el pineno y el limoneno, se usan en grandes cantidades en la industria química para su transformación en terpenoides de mayor valor (Van der Werf et al., 1997).

En los procesos de biotransformación se emplean células completas o enzimas obtenidas a partir de diferentes organismos, en forma soluble o inmovilizada en ambos casos. Sin embargo, si la presencia de otras enzimas no genera un

impacto negativo sobre la pureza del producto, el uso de células completas es más económico, debido a que los procesos de aislamiento y purificación de enzimas son costosos. Además, las membranas celulares protegen las enzimas de fuerzas de cizalla y permiten aumentar su estabilidad, ya que la remoción de una enzima de su ambiente de membrana ocasiona una pérdida parcial o total de su actividad. De otra parte, la serie de reacciones enzimáticas llevadas a cabo en las células pueden ser difíciles de realizar *in vitro* debido al número de cofactores implicados (Giri et al., 2001).

En la mayoría de publicaciones, la biotransformación de monoterpenos se ha hecho con células completas, principalmente de bacterias (41%), seguidas por células de hongos (35%), plantas (11%), cianobacterias (4%) y microalgas (4%). Únicamente en el 7% de los estudios se han empleado enzimas aisladas (De Carvalho y Da Fonseca, 2006).

La transformación microbiana del monoterpeno (+)-citronelal en (+)-citronelol empleando levaduras se publicó en 1915. Desde entonces se ha investigado sobre la bioproducción de terpenoides a partir de monoterpenos y se han aislado y purificado varias enzimas implicadas en la biotransformación de estos compuestos. También se han clonado y secuenciado los genes que codifican algunas de estas enzimas, abriendo la posibilidad de hacer biotransformaciones en un solo paso (Van der Werf et al., 1997).

### **1.1.1 Ventajas del uso de biocatalizadores en la transformación de monoterpenos**

La biotransformación de monoterpenos es de gran interés comercial para las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística, debido a que los métodos biotecnológicos presentan las siguientes ventajas:

✓ Producción de sabores naturales

Estudios recientes del mercado han demostrado que los consumidores prefieren sustancias naturales. Esta preferencia es especialmente evidente en compuestos utilizados en la industria de alimentos y conduce al aumento de precios de los saborizantes aislados de fuentes naturales (Serra et al., 2005).

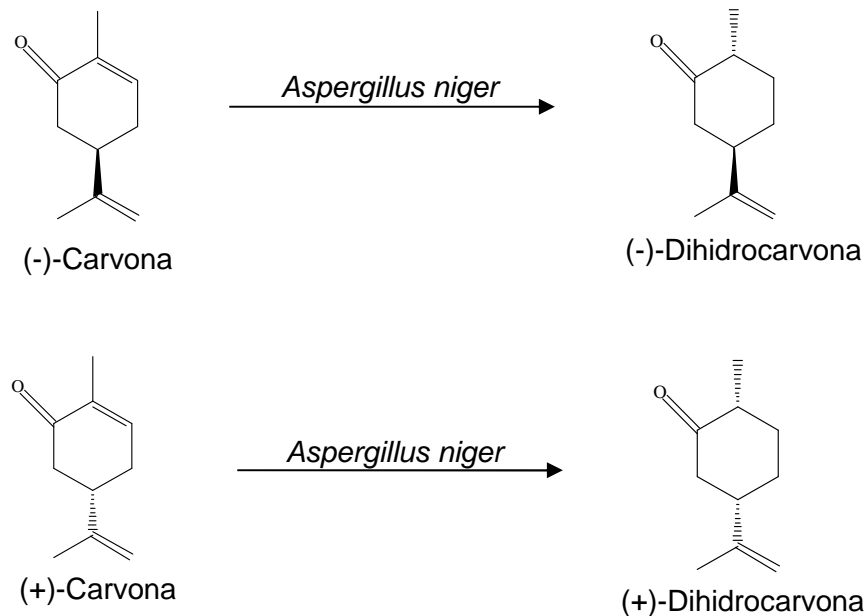
Tradicionalmente, los monoterpenos naturales se aíslan de los aceites esenciales, que consisten en mezclas de compuestos volátiles obtenidos por procesos físicos como la extracción y la destilación a partir de material vegetal. Esta fuente natural de monoterpenos tiene varios inconvenientes, algunos de los cuales son difíciles de controlar (Van der Werf et al., 1997):

- a. La variabilidad en la composición y el rendimiento en los aceites esenciales extraídos de diferentes fuentes geográficas, incluso de la misma fuente dependiendo del clima.
- b. El riesgo de varias enfermedades en las plantas.
- c. Bajas concentraciones del monoterpeno deseado.
- d. Costo del aislamiento.

Para solucionar estos problemas se han desarrollado procesos biotecnológicos. En Estados Unidos, los sabores producidos biotecnológicamente pueden llamarse naturales si el precursor también es de origen natural. Algunos monoterpenos como el ( $\pm$ )- $\alpha$ -pineno, (-)- $\beta$ -pineno, (+)-limoneno, citral y ( $\pm$ )-citronelal, pueden aislarse a gran escala de aceites esenciales y usarse como sustratos para la bioproducción de compuestos de mayor valor (Van der Werf et al., 1997).

✓ Regio- y estéreo-selectividad de los biocatalizadores

La conformación estereoquímica de los monoterpenos influye en sus propiedades sensoriales, de manera que la modificación de estos compuestos requiere alta regio y estéreo-especificidad, características suministradas por los métodos biotecnológicos, los cuales son especialmente adecuados para lograr este tipo de transformaciones. Se ha publicado la producción de compuestos ópticamente opuestos dependiendo del sustrato utilizado (**Esquema 1**) (Van der Werf et al., 1997).



**Esquema 1.** Biotransformación de (-)-carvona y (+)-carvona por *Aspergillus niger*

✓ Producción de nuevos sabores y aromas

La industria de sabores y fragancias tiene un marcado interés en la identificación y descripción de aromatizantes que exhiban nuevas características

organolépticas. La biotecnología tiene el potencial de producir compuestos naturales nuevos usando combinaciones de diferentes enzimas (Van der Werf et al., 1997).

✓ Condiciones suaves de reacción

El interés por tecnologías ambientalmente más seguras demanda el uso de condiciones suaves de reacción. Los procesos de biotransformación se realizan en condiciones moderadas de pH y temperatura y no implican el uso de solventes tóxicos o carcinogénicos. Esto reduce los costos de energía y minimiza las reacciones colaterales (Van der Werf et al., 1997).

✓ Combinación de reacciones múltiples en un solo paso

Los microorganismos son biocatalizadores que pueden biotransformar compuestos a través de múltiples pasos enzimáticos, pero el uso de células completas en contraste con la síntesis química convencional, podría potencializar la catálisis de estas transformaciones en un solo paso. Esta propiedad podría ser aprovechada, por medio de técnicas de ingeniería genética, expresando enzimas en células recombinantes que son capaces de degradar el compuesto de interés (Van der Werf et al., 1997).

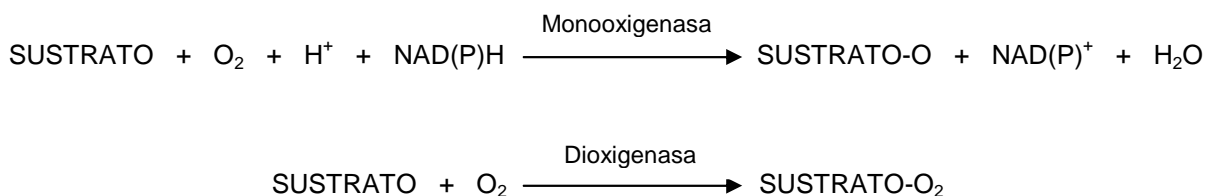
### **1.1.2 Enzimas implicadas en la biotransformación de monoterpenos**

Las enzimas más estudiadas han sido las implicadas en el mecanismo de biotransformación del (+)- y (-)-alcanfor por *Pseudomonas putida* ATCC 17453. Sin embargo, también se han purificado y aislado otras enzimas responsables de la transformación de monoterpenos como la linalol monooxigenasa, la  $\alpha$ -terpineol monooxigenasa y la  $\alpha$ -terpineol deshidratasa (Van der Werf et al., 1997).

Desde el punto de vista comercial las biotransformaciones más interesante son catalizadas por oxigenasas, pero durante el trabajo con estas enzimas se han identificado varios factores que deben tenerse en cuenta para el desarrollo de biotransformaciones competitivas. Algunas limitaciones que se presentan cuando se utilizan oxigenasas son (Held et al., 2000):

a. *La introducción de oxígeno por los biocatalizadores requiere cofactores costosos*

Las monooxigenasas introducen un átomo de oxígeno molecular en compuestos orgánicos alifáticos o aromáticos para formar grupos hidroxilo o epóxido. El átomo de oxígeno remanente es reducido a agua con electrones derivados de los cofactores piridínicos NADH o NADPH (**Esquema 2**). Las monooxigenasas que se encuentran en la naturaleza generalmente requieren equivalentes de reducción para el átomo de oxígeno remanente. Una excepción a esta regla es la monooxigenación del naftaleno llevada a cabo por una monooxigenasa citocromo P450 que también es capaz de usar el peróxido de hidrógeno como donador de oxígeno, de manera que la reacción es independiente de los equivalentes de reducción. Si la independencia de cofactores pudiera generalizarse, se generaría un impacto significativo sobre la biocatálisis a escala industrial (Held et al., 2000).



**Esquema 2.** Reacciones catalizadas por oxigenasas tipo P450

Las dioxigenasas introducen los dos átomos de oxígeno molecular en sustratos hidrocarbonados para formar peróxidos (**Esquema 2**). La reducción subsecuente al correspondiente alcohol o diol también requiere equivalentes de reducción derivados del NAD(P)H. La introducción de un grupo oxo, funcionalmente no requiere equivalentes de reducción, lo que sería una mayor ventaja en el desarrollo de procesos prácticos. Desafortunadamente, los productos oxo formados son típicamente de bajo valor comercial (Held et al., 2000).

Los donores de electrones son costosos y deben usarse en cantidades estequiométricas. Se han desarrollado metodologías para reciclar el NAD(P)H durante las reacciones biocatalíticas. El acople de la reacción de oxigenación a otra reacción enzimáticamente catalizada que produzca NAD(P)H a partir de NAD(P) es la solución preferida para reciclar el NAD(P)H. El reciclaje de NADPH también puede lograrse con glucosa deshidrogenasa, de manera que el equilibrio es desplazado hacia el producto porque la gluconolactona formada es inestable y se hidroliza a ácido glucónico. En caso del NADH, una aproximación es la oxidación enzimática de formato a dióxido de carbono por la formato deshidrogenasa. Métodos alternativos para proporcionar los equivalentes de reducción, como la reducción química directa, o la regeneración electroquímica de cofactores están en desarrollo (Held et al., 2000).

Por varias razones, los procesos a escala industrial que usan oxigenasas y oxidoreductasas están preferiblemente basados en biocatalizadores con células completas. En primer lugar, la regeneración de cofactores *in vitro* descrito anteriormente, es factible pero relativamente costosa. En segundo lugar, las oxigenasas a menudo consisten de varias subunidades de proteínas, y el componente de la oxigenasa está frecuentemente ubicado en la membrana celular, de manera que la purificación y reconstitución de tales sistemas *in vitro* es una tarea desafiante. Ambos problemas pueden ser resueltos mediante la aplicación de oxigenasas *in vivo*, ya que el sistema enzimático (multicomponente)

es sintetizado por las células. No se necesitan sistemas de reciclaje de NAD(P)H, porque el metabolismo normal de las células regenera los cofactores. De modo que los biocatalizadores basados en células completas funcionan como biorreactores miniaturizados que ingieren el sustrato, producen un sistema funcional de enzimas, convierten el sustrato a productos que se difunden al exterior celular y reciclan los cofactores (Held et al., 2000).

El reciclaje de NAD(P)H in vivo requiere células metabólicamente activas; cuando los equivalentes de reducción no son suficientemente generados, la reacción de oxigenación deseada se detiene. Esto implica que las células deben mantenerse en una etapa que permita una alta velocidad de regeneración de cofactores. Un requerimiento mínimo para el mantenimiento de este estado es que la membrana celular permanezca intacta durante el proceso biocatalítico; cuando la permeabilidad de la membrana aumenta, los metabolitos de bajo peso molecular y los cofactores se pierden. Esto trae como resultado el deterioro o incluso el completo rompimiento del metabolismo intracelular y la regeneración de cofactores, incluso cuando todas las enzimas relevantes están completamente activas. De manera que para el desarrollo de procesos biocatalíticos con células completas, es importante considerar los efectos del medio, las condiciones del proceso, los sustratos y los productos sobre la fisiología celular, la actividad enzimática y la regeneración de cofactores (Held et al., 2000).

*b. Concentraciones muy bajas de los sustratos y productos pueden inactivar el biocatalizador*

En su hábitat natural, los microorganismos usualmente encuentran sólo bajas concentraciones de sustratos para el crecimiento. Aunque los microorganismos tienen mecanismos para sobrevivir en condiciones desfavorables, ellos no pueden manipular las altas concentraciones de sustratos no-naturales y los compuestos que podrían producirse en procesos biocatalíticos industriales. De hecho, algunos

compuestos que se han estudiado tienen propiedades bactericidas e inactivan las células completas en concentraciones que están en el rango de 0.2 a 0.5 g/L. De manera que tienen que desarrollarse estrategias para obtener altos rendimientos en el proceso, manteniendo concentraciones no tóxicas de sustratos y productos. Para compuestos hidrofóbicos, esto puede lograrse por la adición de un solvente orgánico inmiscible en agua a la mezcla de reacción. El solvente actúa como un reservorio que separa el sustrato y el producto de la fase acuosa, y mantiene la concentración efectiva de estos compuestos en niveles adecuados para el biocatalizador y como los productos se concentran en la fase orgánica pueden separarse fácilmente de la suspensión biocatalizadora. Como resultado, las concentraciones de productos de compuestos bactericidas como 1-octanol o epóxido de-(S)-estireno puede incrementar por lo menos en un orden de magnitud de ~20 g/L (Held et al., 2000).

*c. La velocidad de transferencia de oxígeno puede limitar la velocidad de producción*

La velocidad a la que el oxígeno puede transferirse a las células completas en tanques agitados influencia la velocidad de la reacción biocatalítica. La máxima velocidad de transferencia de oxígeno a escala industrial de 100 m<sup>3</sup> en reactores de tanque agitado continuamente está en el orden de 100 mmol/(L.h). La manera como el oxígeno es usado depende del sistema biocatalítico. Para biocatálisis *in vitro* es teóricamente posible canalizar todo el oxígeno en la reacción, y la productividad volumétrica podría aumentar a 1600 U/L (Held et al., 2000).

Para reacciones biocatalíticas con células completas, *in vivo*, el oxígeno es necesario para el crecimiento celular y para el mantenimiento, así como para la reacción de oxigenación. En la práctica, más de la mitad del oxígeno alimentado en el reactor se usa para el metabolismo celular (Held et al., 2000).

### 1.1.3 Problemas encontrados en los estudios de biotransformación de monoterpenos

Se reconoce que la transformación microbiana de monoterpenos para la producción de terpenoides es de gran potencial económico pero se considera técnicamente difícil. Algunos de los problemas encontrados en estos procesos y las principales razones por las que su comercialización se ha limitado se describen a continuación (Van der Werf et al., 1997).

#### ➤ Inestabilidad química de monoterpenos

Los monoterpenos son compuestos inestables. Ellos sufren reacciones espontáneas de autooxidación química, isomerización *cis-trans*, racemización, hidratación, ciclización y polimerización, esto conlleva a la formación de una mezcla de productos y a la reducción del rendimiento, y hace necesario el uso de blancos para diferenciar entre las reacciones químicas y las biológicas. La estabilidad química de los monoterpenos depende de varios factores (Van der Werf et al., 1997):

- a. Las propiedades intrínsecas de la molécula; por ejemplo, el  $\alpha$ -pineno sufre reacciones de catálisis ácida 16 veces más rápido que el limoneno.
- b. El pH del medio; valores de pH mayores que 8 y menores que 6 incrementan las velocidades de las reacciones químicas.
- c. La concentración de iones metálicos; el hierro en particular estimula la autooxidación.
- d. La presión parcial de oxígeno.
- e. La temperatura.
- f. La exposición a la luz (especialmente UV) resulta en un incremento del nivel de autooxidación.

La mayoría de los problemas de inestabilidad de estos sustratos pueden minimizarse haciendo crecer las células a temperatura moderada (30 °C), usando un pH neutro y un medio mineral que contenga bajas concentraciones de sales (Van der Werf et al., 1997).

➤ Baja solubilidad de los monoterpenos

Los monoterpenos y especialmente los hidrocarburos monoterpénicos, son escasamente solubles en agua. Dependiendo de la afinidad del sistema biológico hacia el sustrato ( $K_M$ ), la velocidad de la reacción podría verse limitada por la biodisponibilidad del mismo. Se espera que a una baja densidad celular esto no represente un problema, pero a altas densidades celulares la baja solubilidad afecta la velocidad de biotransformación (Van der Werf et al., 1997).

➤ Volatilidad de los monoterpenos

La principal propiedad que hace interesante a los monoterpenos como compuestos del sabor y aroma es su volatilidad, lo que también causa serios problemas durante su bioproducción a gran escala. La mayoría de reacciones de biotransformación comercialmente interesantes dependen de la concentración de oxígeno. De manera que es necesario suministrar aireación y agitación vigorosa, lo que podría ocasionar pérdidas de sustrato y producto. Afortunadamente, los terpenoides producidos son generalmente menos volátiles que los hidrocarburos terpénicos, y se espera que las pérdidas de producto sean menores que las pérdidas de sustrato (Van der Werf et al., 1997).

➤ Toxicidad de los monoterpenos hacia las células completas

Se ha observado que la adición de terpenos a los cultivos celulares inhibe su crecimiento e incluso puede ocasionar lisis celular. Aunque la mayoría de

monoterpenos son escasamente solubles, los efectos inhibitorios dependen de la concentración y, en general, a concentraciones más altas que aproximadamente 0.05 % v/v, no se observa más crecimiento (Van der Werf et al., 1997).

La toxicidad de los monoterpenos y de los solventes orgánicos se manifiesta en sus efectos sobre la membrana celular. Los terpenos disueltos en la membrana alteran su integridad y ejercen efectos de permeabilización. La hidrofobicidad de los solventes orgánicos, expresada como la partición del solvente entre octanol y agua (valor de log P), es un buen indicador de su toxicidad. Sustancias con un valor de log P en el rango 1- 5 son, en general, tóxicas para las células completas. Los monoterpenos tienen valores de log P que generalmente están en el rango 2.5 - 4.5. Los terpenoides son, en general, incluso más tóxicos que los hidrocarburos terpénicos de partida, lo que podría resultar en problemas de incremento de la toxicidad durante la biotransformación. La toxicidad de monoterpenos específicos, como el citral, es engrandecida por la exposición a la luz UV (Van der Werf et al., 1997).

Para evitar los efectos de toxicidad, en muchos casos los sustratos terpénicos se han agregado al cultivo después de que se ha obtenido el máximo crecimiento celular, también se han adicionado secuencialmente cantidades no tóxicas de terpeno, o se ha suministrado el sustrato en fase gaseosa, alternativamente, se ha agregado el monoterpeno disuelto en un solvente que no sea tóxico para las células (Van der Werf et al., 1997).

#### ➤ Mineralización del sustrato

Se ha encontrado que algunos microorganismos son capaces de mineralizar el sustrato impidiendo la acumulación de productos. Esto puede resolverse agregando inhibidores de enzimas no deseadas en el medio de crecimiento, variando las condiciones de crecimiento o por mutación de la cepa. Sin embargo,

como se ha encontrado que varias cepas tienen múltiples trayectorias para metabolizar los terpenos, estos métodos, en general, no han tenido mucho éxito (Van der Werf et al., 1997).

- Múltiples trayectorias metabólicas dan lugar a la formación de mezclas de productos

Las transformaciones microbianas de terpenos generalmente conducen a mezclas de metabolitos, y la acumulación de un único producto de reacción es escasa. Por ejemplo, se han encontrado 12 productos en la transformación de (+)-limoneno con una cepa de *Pseudomonas* sp. Los autores sugieren que este microorganismo tiene tres trayectorias diferentes para la transformación de este compuesto (Van der Werf et al., 1997).

La obtención de mezclas complejas de compuestos relacionados dificulta la purificación del producto de interés. Sin embargo, algunos de los trabajos realizados constituyen una excepción. Por ejemplo, se ha reportado la transformación de (+)-limoneno por células de *Corynespora cassiicola*, lo que condujo a la formación de (1S, 2S, 4R)-*p*-menten-8-eno-1,2-diol como el único producto de reacción. Desafortunadamente, este diol no tiene aplicación en la industria perfumística porque no es lo suficientemente volátil (Van der Werf et al., 1997).

- Bajas concentraciones y rendimientos de productos

Algunos monoterpenos producidos durante estudios de biotransformación se han obtenido en cantidades traza, algunas veces incluso después de extensivas investigaciones de optimización. Los rendimientos de algunas biotransformaciones han sido muy bajos, incluso menores al 5%. Sin embargo, se ha reportado la producción de 900 g de (1S, 2S, 4R)-*p*-menten-8-eno-1,2-diol a

partir de 1300 g de (*R*)-(+)-limoneno en un fermentador de 70 L en 4 días. También se ha reportado la producción de (+)- $\alpha$ -terpineol a partir de (*R*)-(+)-limoneno por células de *Penicillium digitatum* en concentraciones superiores a los 0.46 g/L (Van der Werf et al., 1997).

➤ Actividad enzimática no detectable en los extractos celulares

La determinación de los mecanismos de biotransformación de monoterpenos y el uso de enzimas aisladas para transformarlos, se han limitado sustancialmente por el hecho de que después de romper las células las actividades enzimáticas se pierden total o parcialmente (Van der Werf et al., 1997).

#### **1.1.4 Microorganismos empleados en la biotransformación de monoterpenos**

##### ♣ Bacterias

Se ha publicado la aplicación de bacterias pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, con las cuales se han logrado transformaciones oxidativas.

En nuestro estudio se utilizó la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 que no ha sido publicada en trabajos anteriores para la biotransformación de los sustratos analizados en esta investigación.

El género *Rhodococcus* es un grupo de bacterias Gram positivas ampliamente distribuidas en el ambiente, de manera particular en suelos, reservorios de agua, ríos, lagos y otros ambientes acuáticos, aunque también ha sido detectado en ambientes de difícil crecimiento como los sedimentos de desechos altamente radiactivos (Flitsch et al., 1999). Un variado número de cepas de *Rhodococcus* han demostrado poseer un gran potencial oxidativo, catalizando reacciones de

hidroxilación. Entre las especies interesantes se encuentran la *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus erythropolis* (orden *Actinomycetales*, familia *Nocardiaceae*) (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004).

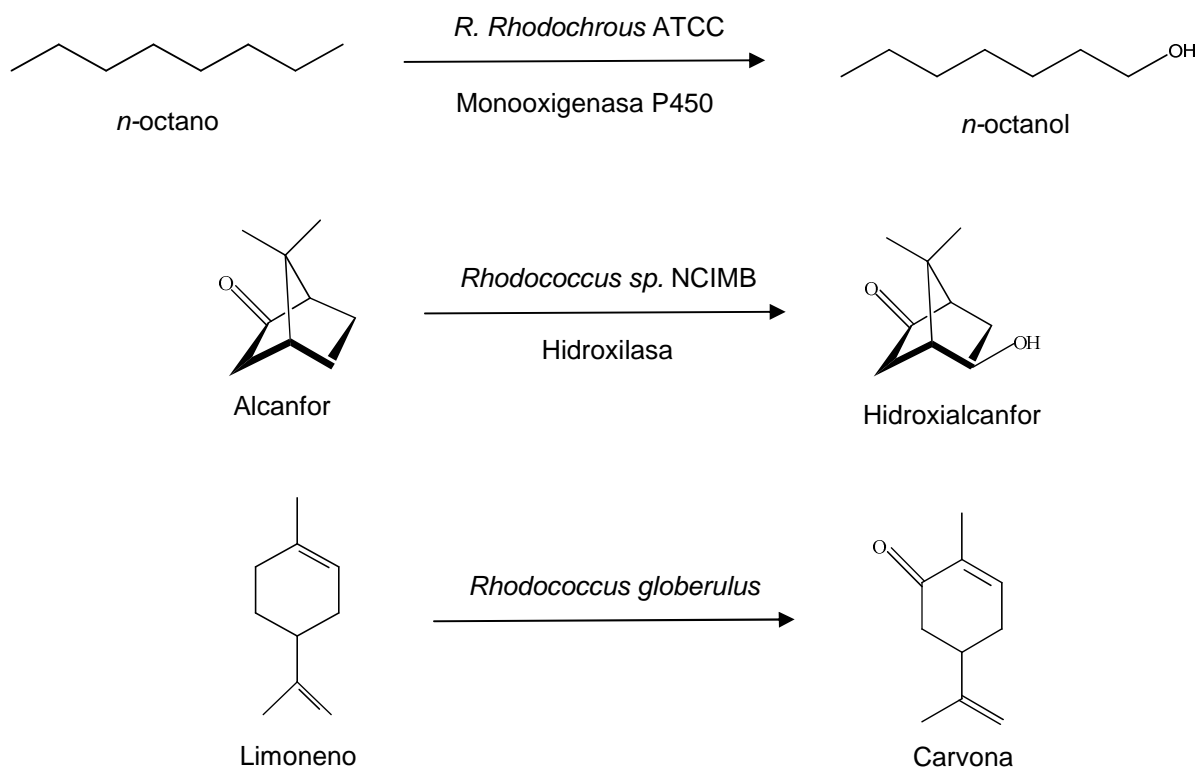
*Rhodococcus* es muy conocido por su diversidad metabólica, puede catabolizar alcanos y alquenos de cadena corta y larga, compuestos aromáticos (halogenados y nitrosustituidos), heterocíclicos, policíclicos, tiocarbamatos, herbicidas triazínicos y moléculas grandes como esteroides. Es interesante cómo su habilidad catabólica sobrepasa la de otras bacterias. Las *Rhodococcus* son candidatas ideales a emplear en biorremediación y se han probado en modificaciones de esteroides, síntesis enantioselectiva y producción de amidas a partir de nitrilos (Larkin et al., 2005).

La habilidad del *Rhodococcus* para utilizar diferentes sustratos tiene una base fisiológica y un factor clave es su tolerancia a sustratos y solventes. Se ha encontrado que el *Rhodococcus* tolera solventes miscibles en agua como etanol, butanol y dimetilformamida hasta 50% v/v y solventes no miscibles en agua como dodecano, y tolueno hasta 5% v/v (Flitsch et al., 1999).

Una característica común de *Rhodococcus* aeróbicas es la presencia de diversos tipos de monooxigenasas y dioxigenasas, entre las cuales se destacan las enzimas tipo hemo P450, responsables de la inserción de uno o dos átomos de oxígeno en las reacciones de oxidación de diversos sustratos (Larkin et al., 2005).

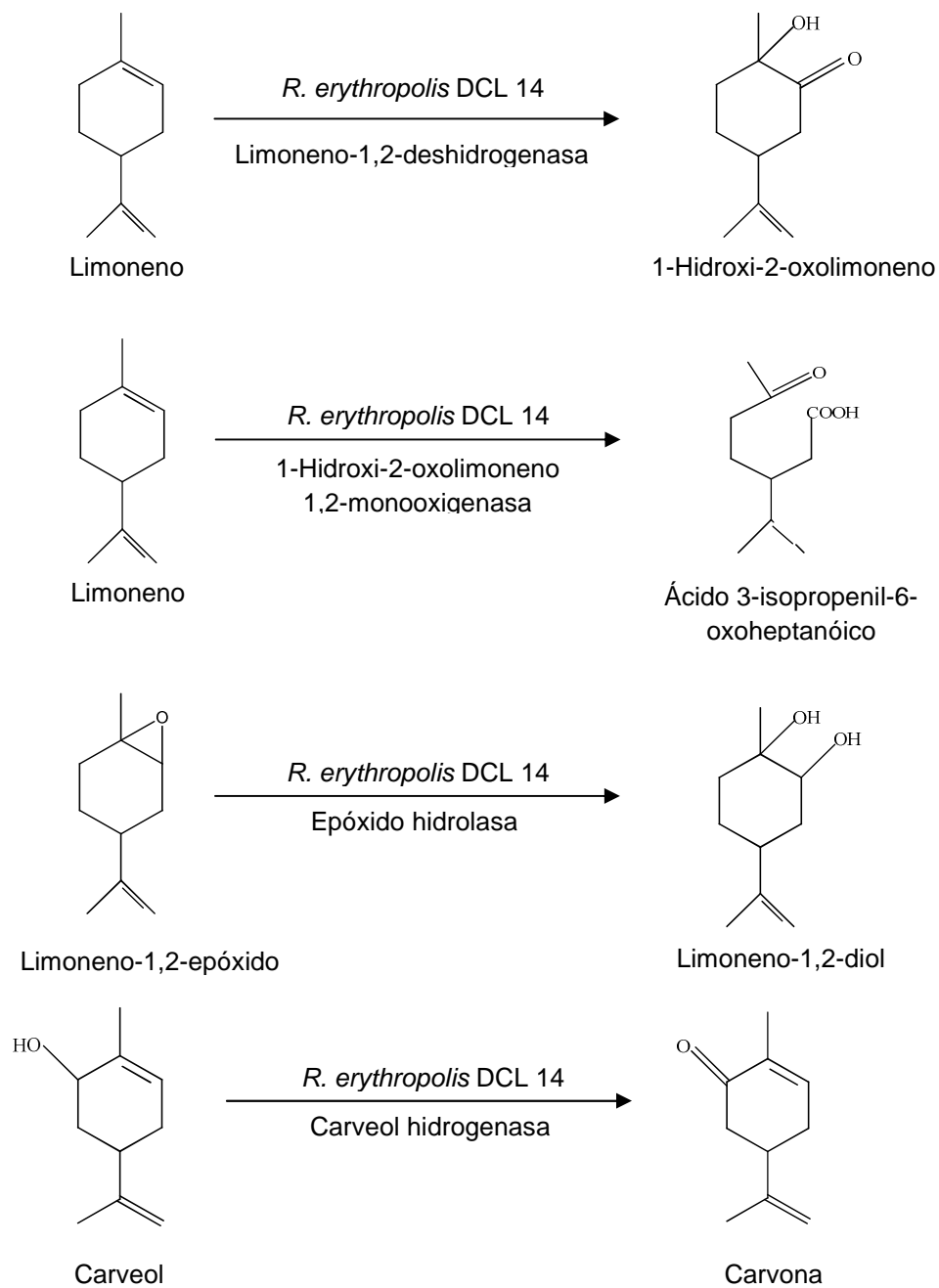
*R. rhodochrous* ATCC 19067 contiene una monooxigenasa inducible P450 que realiza la oxidación, dependiente de NADH, de *n*-octano a *n*-octanol (**Esquema 3**). Se ha encontrado que este sistema celular completo también puede aceptar un amplio rango de sustratos cíclicos y aromáticos, donde la hidroxilación ocurre exclusivamente en la parte alifática de la molécula en lugar del sistema aromático. Otra cepa estudiada, *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, contiene una hidroxilasa que

genera hidroxialcanfor a partir de alcanfor, aunque la evidencia para esta reacción ha sido indirecta debido al metabolismo posterior del alcohol producido. Las células de *Rhodococcus globerulus* PWD8 han llevado a cabo la transformación de limoneno en carvona (Flitsch *et al.*, 1999) (**Esquema 3**).



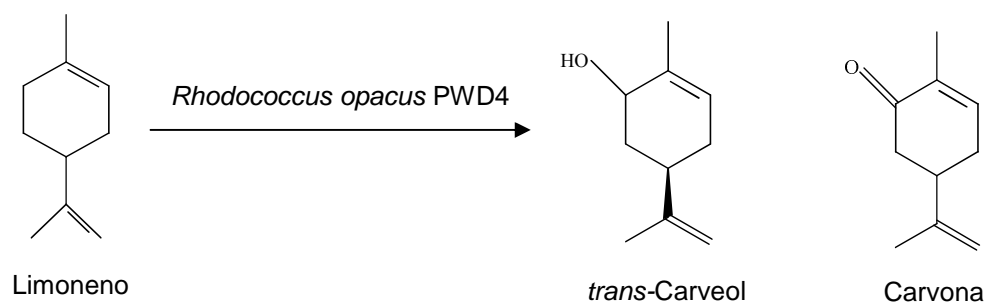
**Esquema 3.** Biotransformaciones realizadas por diferentes cepas de *Rhodococcus*

De otra parte, *Rhodococcus erythropolis* DCL14 ha utilizado el limoneno como su única fuente de carbono y energía, para generar como productos principales el 1-hidroxi-2-oxolimoneno y el ácido 3-isopropenil-6-oxoheptanóico (Van der Werf, 1999) (**Esquema 4**). Esta misma cepa expresa una epóxido hidrolasa que cataliza la hidrólisis de limoneno-1,2-epóxido a limoneno-1,2-diol, así como la enzima carveol deshidrogenasa para biotransformar el carveol en carvona (Barbirato *et al.*, 1998; Van der Werf *et al.*, 1998) (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Reacciones de oxidación realizadas por diferentes enzimas de *Rhodococcus erythropolis* DCL 14

Se ha evaluado *Rhodococcus opacus* PWD4 en la biotransformación de limoneno, produciendo *trans*-carveol y/o carvona (**Esquema 5**), dependiendo del tipo y concentración de la fuente de carbono usada para el crecimiento celular. Las células crecidas sobre glucosa fueron incapaces de llevar a cabo la formación de *trans*-carveol o cualquier otro producto resultante de la oxidación de limoneno, mientras que las células crecidas sobre tolueno como la única fuente de carbono produjeron *trans*-carveol con trazas de carvona (De Carvalho y Da Fonseca, 2003).



**Esquema 5.** Biotransformación de limoneno por células de *Rhodococcus opacus* PWD4

#### ♣ Hongos

Los hongos con más aplicaciones estudiadas en la biotransformación de monoterpenos pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos hongos presentan un potencial de adaptación superior al de otros géneros (De Carvalho y Da Fonseca, 2006; Onken y Berger, 1999).

*Aspergillus* es un género de hongos filamentosos encontrados en la naturaleza, se aíslan comúnmente del suelo, plantas y aire y se ven con frecuencia sobre pan viejo, queso o frutas. Entre las especies empleadas para la biotransformación de terpenos se encuentran *A. niger*, *A. cellulosa* y *A.*

*fumigatus* (Demyttenaere et al., 2004, 2001, 2000; Demyttenaere y De Kimpe, 2001; Demyttenaere y Willemen, 1998; Demyttenaere y De Pooter, 1996).

*Aspergillus niger* es empleado en varios procesos industriales por la variedad de enzimas que produce. Los ácidos cítrico y glucónico son obtenidos comercialmente a partir de este microorganismo. Así mismo, se producen preparaciones enzimáticas y algunos antibióticos. *Aspergillus niger* ATCC 10579 produce inulinasa (endoinulinasa). La cepa ATCC 10864 produce grandes cantidades de maltasa y pequeñas cantidades de  $\alpha$ -amilasa. También produce etanol a partir de almidón de papa cuando se cocultiva con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603 y degrada almidón de papa. Produce acetil-xilan esterasa, acetilesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa (maltasa), amilasa  $\alpha$  1A; glucoamilasa, monoamino oxidasa y enzimas sacarificantes (Scott, 2006).

## **1.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL**

El geraniol (E-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) es un alcohol terpénico encontrado en los aceites esenciales de rosa, geranio, citronela y palmarosa. En algunas especies de palmarosa constituye el 90% del aceite. El geraniol posee aroma a rosa de manera que a menudo se referencia como alcohol de rosa (Shell, 2003).

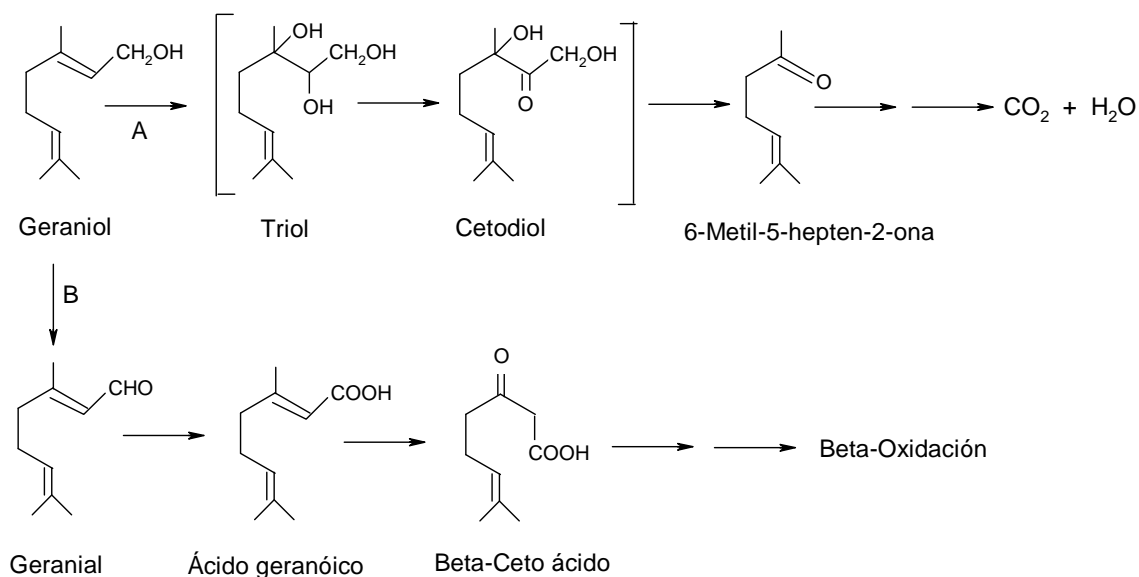
Para la biotransformación de geraniol se han empleado bacterias, hongos y células vegetales.

### **1.2.1 Biotransformación de geraniol empleando bacterias**

Chatterjee, T., (2004) estudió la biotransformación de geraniol usando *Rhodococcus* sp. GR3 aislada del suelo, siendo el ácido geránico [ácido (2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienóico] el único producto de la reacción. El geraniol se agregó

al 1% v/v después de 3 días de crecimiento de la bacteria en un medio de sales minerales que contenían dextrosa y peptona, a temperatura óptima de 30 °C. Se realizaron cinéticas de saturación y se alcanzó un rendimiento final del 50% después de 96 h de biotransformación. Mayores concentraciones de sustrato causaron menores rendimientos debido a los efectos tóxicos del geraniol. No se observó degradación del producto usando esta bacteria.

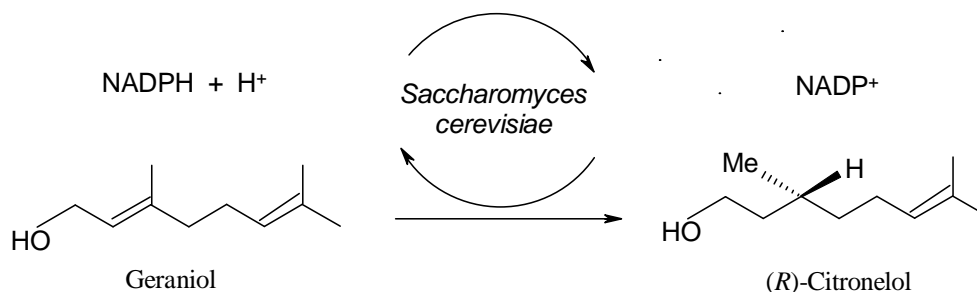
La biotransformación de geraniol con *Pseudomonas incognita* produjo 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO) (Demyttenaere y De Kimpe, 2001) y se han propuesto dos rutas para esta reacción (**Esquema 6**). La ruta A implica un ataque oxidativo sobre el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, formando un epóxido, que luego proporciona un triol, que posteriormente es oxidado al cetodiol. Este cetodiol después es convertido en 6-metil-5-hepten-2-ona por un proceso oxidativo. La ruta B inicia con la oxidación del grupo hidroxil del alcohol primario para producir ácido geránico que es posteriormente  $\beta$ -oxidado (Demyttenaere y Pooter, 1998).



**Esquema 6.** Posibles rutas para la biotransformación de geraniol por *Pseudomonas incognita*

### 1.2.2 Biotransformación de geraniol empleando hongos

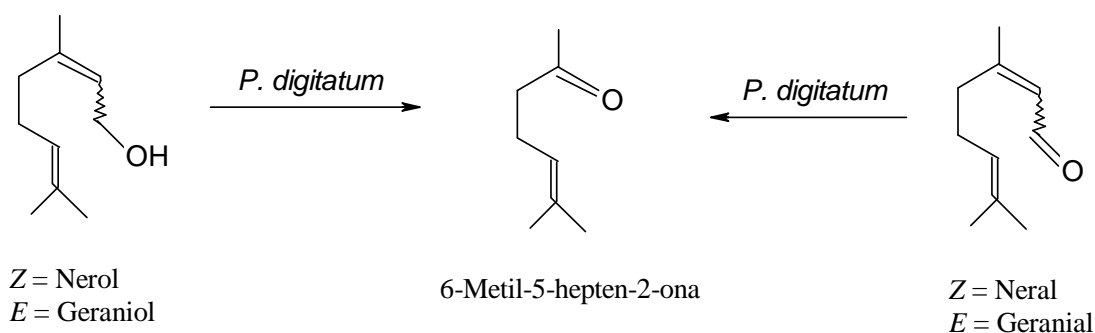
Valadez et al., (2008) utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* y obtuvieron citronelol al emplear como sustrato geraniol (**Esquema 7**).



**Esquema 7.** Reducción de geraniol a *R*-citronelol empleando levaduras de pan

El geraniol fue biotransformado en 6-metil-5-hepten-2-ona empleando las esporas del hongo *Penicillium digitatum*, de las cuales se purificó la enzima citral liasa, ésta es una enzima independiente de cofactores que combina las acciones de un hidratasa con las de una aldolasa (Wolken, 2001).

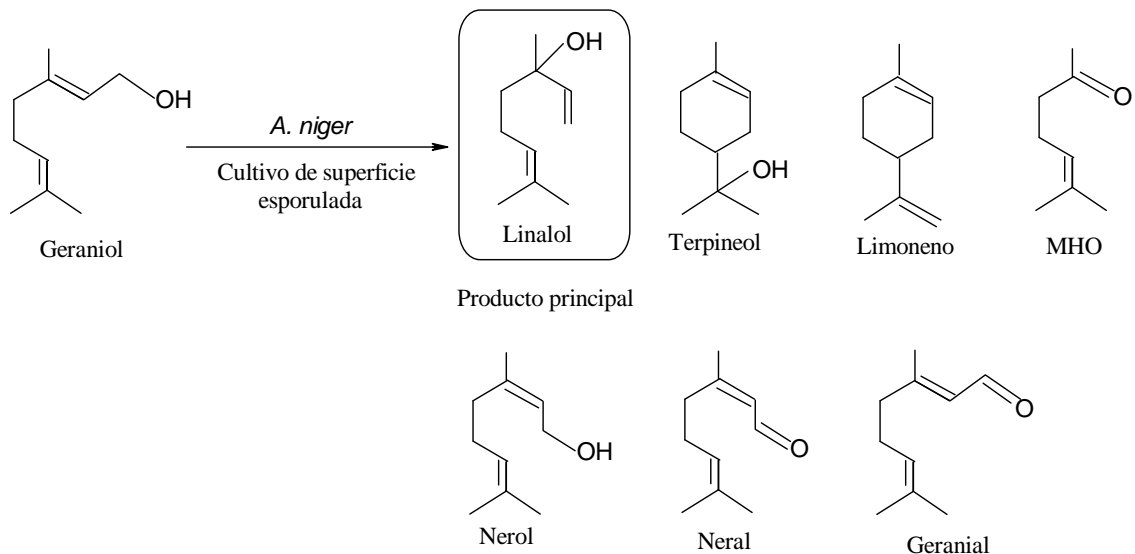
Las mezclas de los alcoholes nerol y geraniol, conocida como citrol, y de los aldehídos terpénicos neral y geranial, denominada citral, fueron convertidas en 6-metil-5-hepten-2-ona mediante cultivos de superficie esporulada de *P. digitatum* (**Esquema 8**). Los alcoholes fueron convertidos con un rendimiento del 83% y del 90% al cabo de 3 y 6 semanas, respectivamente, lo que muestra la capacidad de biotransformación de las esporas (Demyttenaere y De Kimpe, 2001). Sin embargo, la biotransformación por *Penicillium digitatum* parece seguir un mecanismo diferente al propuesto para la reacción con *Pseudomonas incognita* (**Esquema 6**). El estudio completo de las rutas enzimáticas implicadas están en estudio (Demyttenaere y De Kimpe, 2001).



**Esquema 8.** Biotransformación de citrol y citral en 6-metil-5-hepten-2-ona por cultivos de superficie esporulada de *Penicillium digitatum*

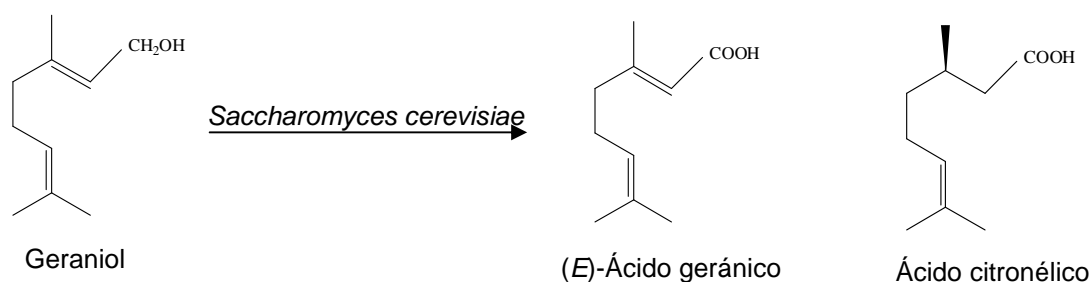
Demyttenaere et al., (2000) estudiaron la biotransformación de geraniol empleando cultivos líquidos sumergidos, cultivos de superficie esporulada y suspensiones de esporas. Se probaron 5 cepas de *A. niger* y tres especies de *Penicillium*: *Penicillium chrysogenum*, *P. lividum* y *P. rugulosum* y en general, todas las cepas fueron capaces de metabolizar el sustrato y biotransformarlo en otros terpenos.

Los principales productos obtenidos en la biotransformación de geraniol por cultivos líquidos sumergidos de *A. niger* fueron linalol,  $\alpha$ -terpineol, 2,6,6-trimetil-2-viniltetrahidropirano (TMVP) y un compuesto no identificado. Cuando la biotransformación se llevó a cabo con cultivos de superficie esporulada los principales productos obtenidos a partir del geraniol fueron linalol, junto con 6-metil-5-hepten-2-ona, limoneno y  $\alpha$ -terpineol (**Esquema 9**). También se notó la isomerización a nerol y posterior oxidación a geranial y neral. La biotransformación con cultivos de superficie esporulada se monitoreó por microextracción en fase sólida (SPME) y se encontró que ésta es una técnica de *screening* muy rápida y eficiente para los experimentos de biotransformación (Demyttenaere et al., 2000).



**Esquema 9.** Biotransformación de geraniol por cultivos de superficie esporulada de *Aspergillus niger*

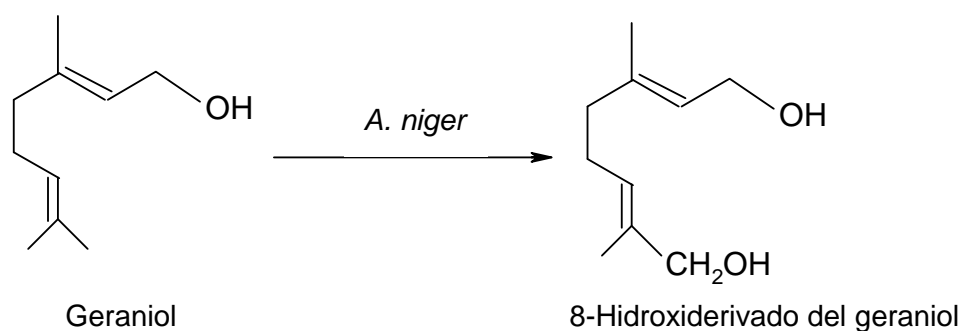
Es de destacar el bioproceso patentado a escala industrial para la producción de ácido geránico utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo condiciones aeróbicas y pH alcalino, el geraniol fue enantioselectivamente oxidado a (*E*)-ácido geránico (85%) y (+)-ácido citronélico (15%) (**Esquema 10**). El ácido geránico alcanzó una concentración máxima de 3.6 g/L después de 48 h de reacción (Whitehead y Ohleyer, 1997).



**Esquema 10.** Biotransformación de geraniol por células de *Saccharomyces cerevisiae*

De otra parte, el geraniol fue transformado en 6-metil-5-hepten-2-ona por cultivos de superficie esporulada de *Penicillium italicum*, con un rendimiento del 76% al cabo de 4 días. En este caso la biotransformación fue monitoreada por técnicas de *headspace* (Demyttenaere y De Pooter, 1996).

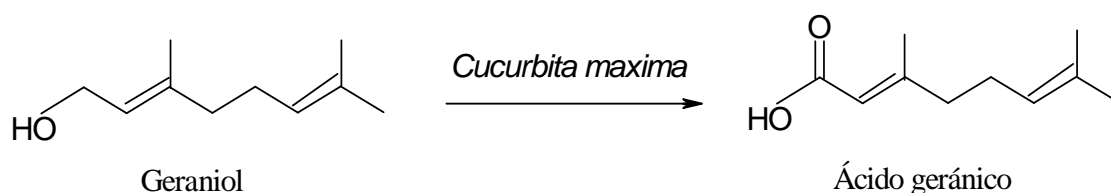
En otro estudio, mediante una  $\omega$ -hidroxilación el geraniol fue transformado regioespecíficamente en su 8-hidroxiderivado (**Esquema 11**) por una cepa de *A. niger* aislada de un suelo de jardín (Madyastha y Krishna, 1988).



**Esquema 11.** Hidroxilación regioespecífica de geraniol por células de *Aspergillus niger*

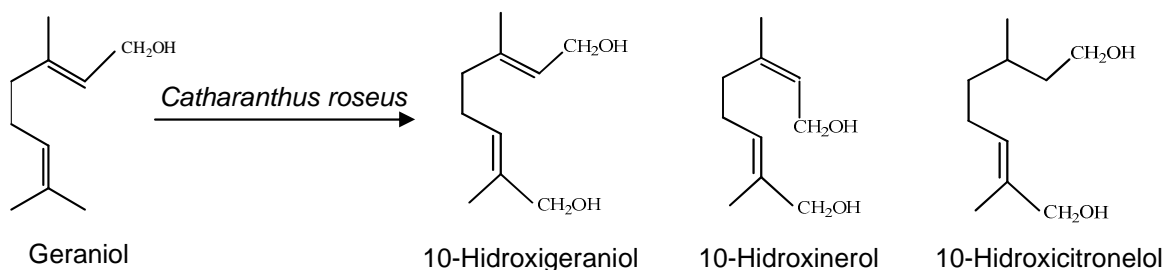
### 1.2.3 Biotransformación de geraniol empleando células vegetales

Utilizando células vegetales de *Cucurbita maxima* el geraniol fue convertido en ácido geránico (5% de cantidad relativa) (**Esquema 12**) (Nagaki et al., 2007).



**Esquema 12.** Biotransformación de geraniol usando cultivos celulares de *Cucurbita maxima*

Las células en cultivo suspendido de *Catharanthus roseus* llevaron a cabo la hidroxilación de geraniol en las posiciones alílicas y redujeron los dobles enlaces y los grupos cetona. Después de 2 días de incubación el geraniol fue transformado en 10-hidroxicitronelol, 10-hidroxinerol y 10-hidroxicitronelol (**Esquema 13**), con rendimientos del 41.8%, 25.3% y 32.9%, respectivamente. La hidroxilación fue en la posición del C-10, indicando selectividad. Además, habían varias posiciones alílicas disponibles, y la reducción del doble enlace ocurrió en la posición 2,3 en los productos identificados, indicando nuevamente selectividad (Hamada et al., 1997).



**Esquema 13.** Biotransformación de geraniol por células de *Catharanthus roseus*

La enzima responsable de llevar a cabo estas hidroxilaciones es la geraniol 10-hidroxilasa (G10H), una monooxigenasa citocromo P450 (Collu et al., 2001).

#### 1.2.4 Principales productos obtenidos en la biotransformación de geraniol

##### ❖ Ácido geránico

Utilizando *Rhodococcus* sp. GR3 (Chatterjee, 2004) y células vegetales de *Cucurbita maxima* en la biotransformación de geraniol, el compuesto obtenido fue

el ácido geránico, reconocido por sus propiedades anticancerígenas debido a que induce la apoptosis y la actividad agonista retinoide (Nagaki et al., 2007).

#### ❖ 10-Hidroxiderivados

El geraniol fue biotransformado en 10-hidroxigeraniol, 10-hidroxinerol y 10-hidroxicitronelol con células vegetales de *Catharanthus roseus*, los 10-hidroxiderivados son precursores de los alcoholes monoterpen-indólicos ajmalicina y serpentina, utilizados en el tratamiento contra la hipertensión, arritmias cardíacas y problemas de circulación sanguínea en el cerebro (Loyola et al., 2004).

#### ❖ $\alpha$ -Terpineol, linalol, 6-metil-5-hepten-2-ona

De otra parte, los principales productos obtenidos en la biotransformación de geraniol empleando hongos son el  $\alpha$ -terpineol, el linalol y la 6-metil-5-hepten-2-ona.

#### $\alpha$ -Terpineol

El  $\alpha$ -terpineol es el alcohol terpénico monocíclico comercialmente más importante, con un consumo anual superior a los 13000 kg/año, que lo ubica entre los 30 compuestos saborizantes con mayor demanda mundial (Tan y Day, 1998). Es usado en cosmética como perfume, en la industria farmacéutica como antifúngico, desinfectante y como agente odorante (Maróstica y Pastore, 2007; Demyttenaere et al., 2001; Tan y Day, 1998) y en la industria alimenticia como conservante natural en alimentos crudos y procesados, debido a que posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Fischer y Phillips, 2008; Sandri et al., 2007; Schelz et al., 2006).

### Linalol

El linalol es un alcohol monoterpénico alílico con agradable olor a lirio, usado enormemente en la industria de las fragancias. Se emplea en cosmetología, fragancias finas, shampoo, jabones, limpiadores y detergentes. Se encuentra naturalmente en plantas y flores como la lavanda, pero en su mayoría se obtiene a partir de  $\alpha$ -pineno. Además, es un intermediario clave para la síntesis de varias vitaminas y productos químicos fragantes como el citral (Da Silva et al., 2006).

### 6-Metil-5-hepten-2-ona

La 6-metil-5-hepten-2-ona es un intermediario de gran valor en la producción de aromatizantes. Se emplea como saborizante natural ya que posee un sabor reminiscente a pera. Se han publicado varias patentes para su síntesis química, partiendo de diferentes sustratos y utilizando temperaturas elevadas y catalizadores de paladio, pero los rendimientos son relativamente bajos y el producto así obtenido no podría considerarse natural (Aquino et al., 2008; Krill et al., 2003; Ember, 1973; Halder y Frick, 1973).

## **1.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE $\alpha$ -PINENO**

Después del limoneno, el pineno es el monoterpeno más abundante y el principal componente del aceite de trementina, obtenido de las resinas de plantas coníferas y como un subproducto de la industria del papel (Yoo y Day, 2001). La industria de fragancias y saborizantes consume aproximadamente 30.000 toneladas de pinenos por año, los cuales se usan para producir un amplio rango de productos, siendo el 84 % de los derivados de los pinenos obtenidos por síntesis química (Toniazzo et al., 2005).

Las biotransformaciones de pineno se han llevado a cabo empleando bacterias, hongos y células vegetales.

### 1.3.1 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando bacterias

Una cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21 llevó a cabo la oxifuncionalización del  $\alpha$ -pineno a óxido de  $\alpha$ -pineno, verbenol y mirtenol. En ese estudio se alcanzó una concentración total de productos de 1 g/L después de sólo 4 h de reacción, siendo el máximo valor reportado para la transformación de este sustrato (Schewe et al., 2009).

También se ha reportado la obtención de verbenol (35% de rendimiento), acetato de dihidrocarveol (20%) y verbenona (10%) a partir de (+)- $\alpha$ -pineno empleando células de *Pseudomonas putida*, mientras que con el (-)- $\alpha$ -pineno y (-)- $\beta$ -pineno no hubo biotransformación (Divyashree et al., 2006).

En otro estudio se utilizó *Pseudomonas* sp. PIN, aislada del suelo y adaptada al sustrato en cultivos enriquecidos con  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, utilizados como la única fuente de carbono y energía. No se encontró inhibición del crecimiento hasta una concentración de sustratos del 10%. Los productos de biotransformación de  $\alpha$ -pineno fueron identificados como limoneno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, alcanfor, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, *endo*-borneol y *p*-cimeno-8-ol. Los productos de biotransformación de  $\beta$ -pineno fueron los mismos excepto por la presencia de fenchil alcohol y la ausencia de alcanfor. La bioconversión total fue del 33.5% de  $\alpha$ -pineno y del 58.8% de  $\beta$ -pineno (Yoo y Day, 2001).

Algunas bacterias termófilas aeróbicas como *Bacillus pallidus* también presentan alta capacidad transformadora para la obtención de metabolitos como  $\beta$ -pineno,

limoneno, pinocarveol, pinocarvona, mirtenol, mirtenal, carveol y carvona (Savithiry, 1998).

Utilizando mutantes de *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 se han producido mirtenol y mirtenal (Colocousi et al., 1996). La biotransformación de  $\alpha$ -pineno con esta cepa se ha estudiado desde los años 80s (Best et al., 1987).

### 1.3.2 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando hongos

Dentro de los hongos, Castellanos et al., (2007) utilizó *A. niger* y reportó la formación de  $\alpha$ -terpineol y *p*-mentano-1,8-diol como productos principales, con borneol y fenchol como productos minoritarios a partir de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando como medio sólido PDA (Potatoe Dextrose Agar); mientras que en medio líquido PDB (Potatoe Dextrose Broth) sólo se obtuvo  $\alpha$ -terpineol. También se ha reportado *A. niger* en diferentes formas y estados de crecimiento, libre e inmovilizado y adicionando el sustrato en fase líquida o gaseosa, para obtener como productos la verbenona y el  $\alpha$ -terpineol (Rozenbaum et al., 2006).

Toniazzo et al., (2005), utilizaron *Aspergillus niger* ATCC 9642 y obtuvieron  $\alpha$ -terpineol (4%) a partir del (-)- $\beta$ -pineno, pero con el (-)- $\alpha$ -pineno no hubo biotransformación.

El *A. niger* ha sido modificado usando ingeniería genética con resultados mejorados, tal es el caso de una cepa superproductora de verbenol, generada por la fusión de dos cepas de *A. niger*, alcanzando un rendimiento máximo de conversión, a partir de  $\alpha$ -pineno, de 48.6 % en sólo 6 h (Vidya y Agrawal, 2003). Limberger et al., (2001) obtuvieron (+)-verbenona (31.7%, 5 días) utilizando como biocatalizador células fúngicas de *Bipolaris sorokiniana* sobre (+)- $\alpha$ -pineno.

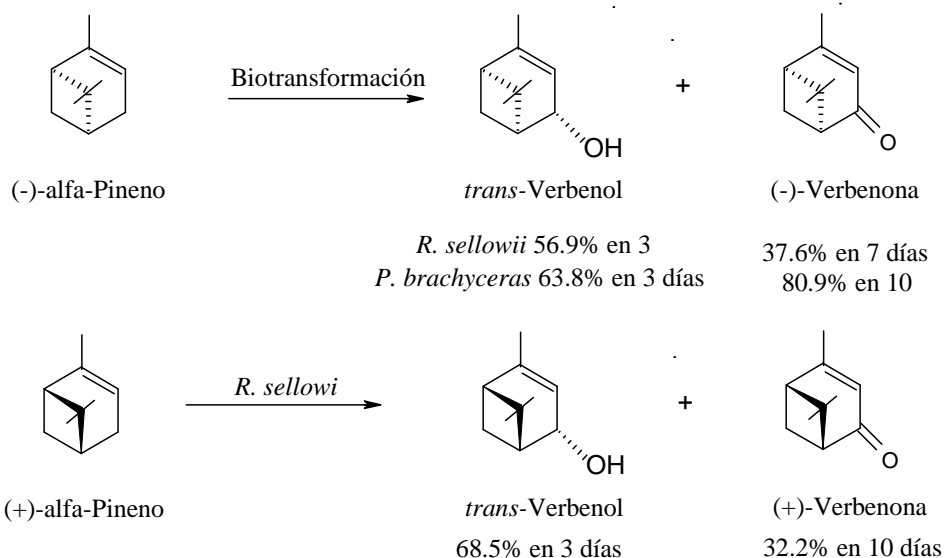
Agrawal y Joseph (2000) lograron la transformación de  $\alpha$ -pineno a verbenona empleando células de una cepa nativa de *Aspergillus niger*. La máxima formación de verbenona fue de 32.8 mg/L, equivalente a un rendimiento molar del sustrato de 16.5%. Las condiciones óptimas de biotransformación fueron: pH 7.0; concentración de sustrato 200 mg/L y tiempo de incubación 6 horas.

Algunas especies menos conocidas como *Hormonema* sp. han catalizado la formación de verbenona y trans-verbenol en concentraciones aproximadas de 0.4 g/L después de 96 horas de reacción (Van Dyk et al., 1998).

### 1.3.3 Biotransformación de $\alpha$ -pineno empleando células vegetales

En cuanto a las células vegetales, para la biotransformación de  $\alpha$ -pineno, Limberger et al., (2007) emplearon como catalizadores células de *Psychotria brachyceras* y *Rauvolfia sellowii* y encontraron que *Psychotria brachyceras* sólo actuó sobre el (-)- $\alpha$ -pineno produciendo *trans*-verbenol y (-)-verbenona, mientras que *Rauvolfia sellowii* actuó sobre el (-)- $\alpha$ -pineno y el (+)- $\alpha$ -pineno, produciendo *trans*-verbenol y (-)-verbenona a partir del (-)- $\alpha$ -pineno; y *trans*-verbenol y (+)-verbenona a partir del (+)- $\alpha$ -pineno. En el **Esquema 14** se indican los mayores porcentajes de rendimiento y los días en los que se obtuvieron.

Vanek et al., (2005) han publicado biotransformaciones de ambos enantiómeros de  $\alpha$ -pineno empleando células vegetales de *Picea abies* inmovilizadas en alginato. Los productos principales fueron *cis/trans* verbenol y verbenona. La transformación empleando células vegetales libres ha demostrado ser más rápida que el empleo de células inmovilizadas (Lindmark, 2004 y 2003).



**Esquema 14.** Biotransformación de  $\alpha$ -pineno mediante células de *Psychotria brachyceras* y *Rauvolfia sellowii*

Lindmark et al., (2003) biotransformaron el (R)- $\alpha$ -pineno empleando células vegetales de *Picea abies* y obtuvieron *trans*-verbenol, *cis*-verbenol, verbenona, *trans*-pinocarveol, mirtenol,  $\alpha$ -terpineol y *trans*-sobrerol como productos principales después de 4 días de biotransformación.

Hirata et al., (1994), estudiaron la biotransformación del 2-pineno empleando suspensiones de células *Nicotiana tabacum* y *Catharanthus roseus*. Los cultivos tuvieron la capacidad de introducir grupos funcionales oxigenados, como hidroxilo y epoxi; la epoxidación ocurrió estereoselectivamente y enantioselectivamente, mientras que la hidroxilación se llevó a cabo regioselectivamente en la posición alílica del doble enlace carbono-carbono.

#### 1.3.4 Principales productos obtenidos en la biotransformación de $\alpha$ -pineno

Como puede observarse, en la biotransformación de  $\alpha$ -pineno se obtiene una amplia gama de productos, sin embargo, los más promisorios por su valor

agregado y por sus propiedades farmacéuticas son el verbenol y la verbenona, cuyo costo promedio es de US\$ 3500/kg (Vidya y Agrawal, 2003) y US\$ 3000/kg, respectivamente, mientras que el precio del  $\alpha$ -pineno es de US\$ 0.0075/kg (Agrawal y Joseph, 2000). Se han reportado varios sistemas para la oxidación alílica de  $\alpha$ -pineno, pero debido al mecanismo de radicales de esta reacción no se ha encontrado un sistema selectivo al verbenol y verbenona (Ancel et al., 2004). Estos compuestos se han sintetizado empleando catalizadores de cobre, cromo, rutenio y titanio (Barrera et al., 2008), pero los productos así obtenidos no pueden considerarse naturales.

#### ❖ Verbenol

El verbenol se usa directamente o como aditivo para producir variedad de compuestos fragantes y vitaminas (Limberger et al., 2007).

#### ❖ Verbenona

La verbenona es un compuesto aromatizante de alto valor. Es el principal constituyente del aroma de hierbabuena, fresas y frambuesas, y en estado puro posee notas fuertes de alcanfor y menta. La (+)-verbenona se utiliza como material de partida en síntesis asimétrica como precursor quiral en la preparación del diterpeno antitumoral taxol, usado en el tratamiento de cáncer de seno y ovario (Maksimchuk et al., 2005). La (-)-verbenona se emplea como material de partida para preparar análogos del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Limberger et al., 2007). La verbenona es el principal componente de *Spanish verbena*, de ahí el nombre de los aceites *Spanish Eucalyptus globulus* y *Spanish Rosmarinus officinalis* (28.9% verbenona) pero la verbenona extraída es costosa e insuficiente para su demanda (Ravid et al., 1997).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Se emplearon cepas certificadas de la bacteria *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y del hongo *Aspergillus niger* DSM 821, las cuales se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ (Braunschweig, Alemania).

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos con *Rhodococcus opacus* DMS 44313 fueron:

- TSB (*Tryptone Soya Broth*). Composición: 1.7% caseína de digestión pancreática, 0.3% hidrolizado de harina de soya, 0.5% cloruro de sodio, 0.25% fosfato de potasio dibásico, 0.25% glucosa. Se adicionaron 15 g de medio en polvo a 500 mL de agua destilada.
- TSA (*Tryptone Soya Agar*). Composición: 1.5% triptona, 0.5% peptona de soya, 0.5% cloruro de sodio, 1.5% agar. Se añadieron 20 g de medio en polvo a 500 mL de agua destilada.
- YGA (*Yeast extract, Glucose, Agar*): Se suspendieron 2.5 g de extracto de levadura, 1 g de glucosa y 7.5 g de agar en 500 mL de agua destilada.
- YG (*Yeast extract, Glucose*): Se adicionaron 2.5 g de extracto de levadura y 1 g de glucosa en 500 mL de agua destilada.

- Medio Mineral: Se disolvieron 2.2 g  $K_2HPO_4$ , 1.7 g  $KH_2PO_4$ , 1.0 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.08 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.005 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0.003 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.013 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.001 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.005 g  $ZnCl_2 \cdot 7H_2O$ , 0.005 g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.001 g  $CuSO_4$ , 0.005 g  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ , 0.43 g  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.001 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.005 g EDTA en 500 mL de agua destilada.

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos con *Aspergillus niger* DSM 821 fueron:

- PDB (*Potato Dextrose Broth*): Se tomaron 50 g de papas lavadas y cortadas en pequeños trozos y se adicionaron 250 mL de agua destilada. Se llevó a ebullición durante una hora, se filtró y se agregó glucosa al 2% p/v.
- PDA (*Potato Dextrose Agar*). Composición: 0.4% extracto de papa, 2.0 % glucosa, 1.5 % agar. Se añadieron 19.5 g de medio en polvo a 500 mL de agua destilada.
- MEA (*Malt Extract Agar*). Composición: 3.0 % extracto de malta, 0.5 % peptona micológica, 1.5 % agar. Se suspendieron 25 g de medio en polvo en 500 mL de agua destilada.
- Czapek. Composición: 0.2% nitrato de sodio, 0.05% cloruro de potasio, 0.05% glicerofosfato de magnesio, 0.001% sulfato ferroso, 0.035% sulfato de potasio, 3.0% sacarosa. Se adicionaron 16.7 g en 500 mL de agua destilada.

Todos los medios se esterilizaron a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos antes de realizar los ensayos. Los medios, excepto el PDB y los compuestos por sales minerales, se obtuvieron de Oxoid (*Hampshire*, Inglaterra) y se prepararon según las especificaciones del proveedor.

Los sustratos geraniol (98%) y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno ( $\geq 97\%$ ) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El *n*-tetradecano, el Tween 80® y los solventes etanol absoluto ( $\geq 99.9\%$ ) y acetato de etilo ( $\geq 99.8\%$ ) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El nitrógeno gaseoso se obtuvo de Aga-Fano (Bucaramanga, Colombia).

Los materiales utilizados fueron: cajas petri, viales de 22 mL, viales ámbar de 15 mL con tapa rosca y sello de PTFE/Silicona, tubos de centrífuga de 15 mL con tapa de rosca y tubos eppendorf de 1.5 mL, asas, mecheros de alcohol, transferpipetas, tubos de ensayo, espátulas, papel parafilm, erlenmeyer y vasos de precipitados, entre otros.

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon los siguientes equipos: incubadora ultravioleta SI-950 marca UVP (Upland, USA), autoclave de vapor MLS-375L marca Sanyo (Tokio, Japón), autoclave de vapor No. 25X marca All American (Hempstead, USA), cabina de seguridad biológica FLC 85 marca C4 Pascal (Cali, Colombia), espectrofotómetro VIS Genesys 20 marca Thermo Spectronic (Rochester, USA), ultracentrífuga refrigerada marca Kubota (Tokio, Japón), centrífuga Rotofix 32 marca Hettich (Alemania), placa de calentamiento MR Hei-Tec marca Heidolph (Schwabach, Alemania), shaker orbital vibramax 100 marca Heidolph (Schwabach, Alemania), vórtex SG 23 marca Schott (Alemania), estufa marca Binder (Alemania), pH-metro marca Schott (Alemania) y balanza analítica AB204-S Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Suiza).

## **2.2 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA *Rhodococcus opacus* DSM 44313**

### **2.2.1 Reactivación, crecimiento y mantenimiento de la bacteria**

La cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313, adquirida en forma liofilizada, se reactivó según el procedimiento recomendado por DSMZ. Se separó la punta de vidrio, se removió el material aislante y se retiró el vial interior. Se flameó en llama la cabeza del vial y luego se adicionó 1 mL de medio de cultivo TSB. Se dejó rehidratar durante 60 minutos y posteriormente se agitó el contenido transfiriendo la mezcla a un tubo de ensayo con 9 mL de TSB a 30 °C.

Para el crecimiento de la bacteria se probaron los medios TSA y YGA, también se ensayó un medio de sales minerales en el que se utilizaron glucosa o geraniol al 2% p/v como fuentes de carbono. En todos los casos, la bacteria fue sembrada por superficie en caja de petri. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento también se tuvo en cuenta, dejando cajas inoculadas a temperatura ambiente e incubando otras a 30 °C y a 37 °C. Una vez crecida la cepa se almacenó a 5 °C para subcultivos cada 8 días.

### **2.2.2 Cinéticas de crecimiento bacteriano**

Después de 4 días de crecimiento de la cepa bacteriana en los medios TSA y YGA a 30 °C, se extrajo una colonia de cada medio y se resuspendió en 15 mL de medios líquidos TSB y YG, respectivamente, dejándose crecer a 30 °C durante 4 días. Posteriormente se tomaron 5 mL de suspensión de células a partir de los medios TSB y YG y se resuspendieron de nuevo en 25 mL de los mismos. Estos cultivos, denominados preinóculos, se incubaron a 30 °C durante 24 h, tiempo después del cual se resuspendieron en 225 mL de medios TSB y YG, los cultivos se mantuvieron en agitación a 200 rpm con temperatura controlada a 30 °C. A

partir del momento en el que se resuspendieron los preinóculos ( $t = 0$ ), de cada cultivo se tomaron muestras por duplicado, 1.5 mL para determinar la biomasa por peso seco y 3.5 mL para medir la densidad celular por turbidimetría, y se procedió a centrifugar de la siguiente manera: los 1.5 mL a 18000 x  $g$  a 4 °C durante 15 min y los 3.5 mL a 4320 x  $g$  a 4 °C durante 30 min, los sobrenadantes obtenidos en ambos casos se descartaron, los pellets fueron lavados sucesivamente dos veces, resuspendiendo en agua destilada y agitando en vórtex. Los pellets obtenidos en los 1.5 mL de suspensión se secaron a 80 °C durante 24 h, mientras que los obtenidos en los 3.5 mL de suspensión celular se resuspendieron en agua destilada y se determinaron sus absorbancias a 600 nm. Las alícuotas de resuspensión se tomaron cada 4 ó 6 h, durante 4 días, y se correlacionaron las medidas de absorbancia y de peso seco con el tiempo.

## **2.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA *Rhodococcus opacus* DSM 44313**

### **2.3.1 Procedimiento general de biotransformación**

Los bioensayos se realizaron en viales de 22 mL con tapa rosca, en los que se adicionaron el sustrato y 5 mL de suspensión celular tomada en diferentes fases de crecimiento de la bacteria. La mezcla se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm y trascurridas 12, 24 y 48 h de reacción se extrajeron los productos y los sustratos remanentes, siguiendo el protocolo establecido en el numeral **2.5**. En todos los casos se realizaron blancos de biomasa (suspensión de células en el medio de reacción sin sustrato) y blancos de sustrato (medio de reacción y sustrato sin suspensión de células). Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

### **2.3.2 Efecto de la fase de crecimiento de la bacteria**

Se realizó el procedimiento descrito en el numeral **2.2.2** y una vez obtenidos los 250 mL de resuspensión celular en los medios TSB y YG, se empezaron a contabilizar los tiempos y cuando la bacteria se encontraba en la etapa media y en la etapa final de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria, se tomaron los inóculos y se mezclaron con el sustrato (20 mM). La mezcla se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm y trascurridas 12, 24 y 48 h de reacción se extrajeron los productos y los sustratos remanentes, siguiendo el protocolo establecido en el numeral **2.5**.

### **2.3.3 Evaluación del efecto del etanol como cosolvente de los sustratos**

Se prepararon soluciones etanólicas de cada sustrato al 10% y se agregaron determinados volúmenes en los medios de reacción, de manera que la concentración de sustrato fuera 20 mM. Los otros parámetros como las fases de crecimiento de la bacteria, la agitación y los tiempos de reacción fueron los indicados en el numeral **2.3.2**.

### **2.3.4 Evaluación de la concentración de sustrato y cinética de la reacción**

Una vez establecida la fase de crecimiento de la bacteria, el medio de cultivo, la forma de adicionar el sustrato (puro o disuelto en etanol) y el tiempo de reacción en el que se obtuvieron las mayores concentraciones de productos, tanto para el geraniol como para el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato (5, 20, 35 y 50 mM) en el medio de reacción.

El rendimiento de los productos se determinó con base en las moles de carbono de cada compuesto obtenido, respecto a las moles de carbono en la concentración inicial de sustrato:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{moles C en el producto}}{\text{moles C en el sustrato inicial}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Posteriormente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos previos se monitoreó la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno cada 24 h durante 8 días.

### **2.3.5 Biotransformación en un medio mineral**

Se tomaron 5 mL de suspensión de células crecidas en el medio que favoreció la biotransformación de cada uno de los sustratos y en la fase de crecimiento celular que permitió la mayor formación de productos, se centrifugaron, se lavaron tres veces y los pellets se resuspendieron en 5 mL de medio mineral. Los sustratos se agregaron en la concentración de 20 mM y se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos respecto al efecto del cosolvente y el tiempo de reacción con los que se produjeron las mayores concentraciones de productos.

## **2.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA *Aspergillus niger* DSM 821**

Previo a los experimentos de biotransformación se llevó a cabo la reactivación de la cepa *Aspergillus niger* DSM 821 siguiendo el procedimiento recomendado por DSMZ. Se separó la punta de vidrio, se removió el material aislante y se retiró el vial interior. Se flameó en llama la cabeza del vial y luego se adicionó 1 mL de medio PDB. Se dejó rehidratar por 60 minutos y posteriormente se agitó el contenido transfiriendo la mezcla a un tubo de ensayo con 9 mL de medio PDB.

Una vez reactivada la cepa se sembró en el medio PDA y cuando llevaba 7 días de crecimiento se hizo un repique en el medio MEA, realizando posteriores

siembras en este medio cada 10 días, debido a que estudios anteriores indican que en el medio MEA el hongo crece más rápido y presenta mejor esporulación (Castellanos et al., 2007).

En este caso la cinética de crecimiento del hongo se determinó midiendo cada 24 h el radio del *A. niger* crecido en medio MEA e incubado a 29 °C.

Para la obtención de la suspensión de esporas que se usaría posteriormente como inóculo, se preparó una solución salina estéril que contenía NaCl (0.85%) y Tween 80 (0.1%), de la cual se tomaron 10 mL y se adicionaron sobre el hongo crecido en medio MEA; la superficie esporulada del *Aspergillus niger* se frotó con espátula estéril y la suspensión se transfirió a un tubo. La concentración de esporas se determinó mediante la técnica de recuento en cámara de Neubauer.

#### **2.4.1 Procedimiento general de biotransformación**

Los bioensayos se realizaron en viales de 22 mL en los que se agregaron 5 mL de medio Czapek y el volumen necesario de suspensión de esporas de manera que su concentración en el medio de reacción fuera de  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Inicialmente los tubos se taparon con torundas de gasa y algodón, se suministró agitación orbital a 200 rpm y el micelio se dejó crecer durante 3 días, tiempo después del cual se agregaron los sustratos y a los tubos se les puso la tapa rosca. Cada 24 h durante 14 días se extrajeron los productos y los sustratos remanentes siguiendo el protocolo establecido en el numeral **2.5**. Todos los experimentos se hicieron por duplicado y para garantizar que los compuestos obtenidos fueran productos de las biotransformaciones, se realizaron blancos de biomasa (suspensión de esporas en el medio de reacción sin sustrato) y blancos de sustrato (medio de reacción y sustrato sin suspensión de esporas).

#### **2.4.2 Efecto de la fase de crecimiento del hongo**

Se realizaron experimentos de biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con esporas recuperadas cuando el hongo estaba en la etapa media de su fase de crecimiento exponencial y cuando estaba finalizando esa fase, los productos se extrajeron a los 7 y 14 días de reacción y con base en los resultados se realizaron los experimentos posteriores.

#### **2.4.3 Evaluación de la concentración de sustrato**

Se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato (5, 20, 35, 50 y 65 mM) en el medio de reacción y se determinó la conversión en cada caso mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Conversión} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

$C_i$  = Concentración inicial de sustrato

$C_f$  = Concentración final de sustrato

#### **2.4.4 Evaluación del efecto del etanol como cosolvente**

Se prepararon soluciones etanólicas de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno al 10% y al 40% y se agregaron determinados volúmenes en los medios de reacción de manera que la concentración de cada sustrato fuera aquella con la que se obtuvo la mayor conversión.

## 2.5 EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS

Los productos y sustratos remanentes en las reacciones de biotransformación se extrajeron con acetato de etilo, para ello se agregaron 2.5 mL de solvente, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se extrajo la fase orgánica, este proceso se hizo por triplicado y se reunieron las extracciones.

Los extractos se concentraron con nitrógeno gaseoso, se les adicionó n-tetradecano como estándar interno y se aforaron a 1 mL para su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

## 2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Los análisis por GC-MS se realizaron en un cromatógrafo *Agilent* modelo 6890N (Paloalto, CA, USA). Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-WAX (60 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25  $\mu$ m grosor de la película). La programación de temperatura fue desde 45  $^{\circ}$ C mantenidos por 10 min, con velocidad de calentamiento de 3  $^{\circ}$ C/min, hasta 220  $^{\circ}$ C que mantenidos por 30 min. Se empleó un detector selectivo de masas *Agilent* modelo 5975C (Paloalto, CA, USA) con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV) y analizador de masas cuadrupolar operado en modo de barrido completo desde 40 hasta 400 Dalton (m/z). La relación de split fue 1:13 y se usó un inyector automático modelo HP 7683 Series. La identificación de componentes se hizo empleando el sistema de datos HP *Enhanced Chemstation* G1701BA y comparando los espectros de masas de los productos con aquellos contenidos en las bases de datos espectrales ADAMS 01, NIST 05 y WILEY 138.

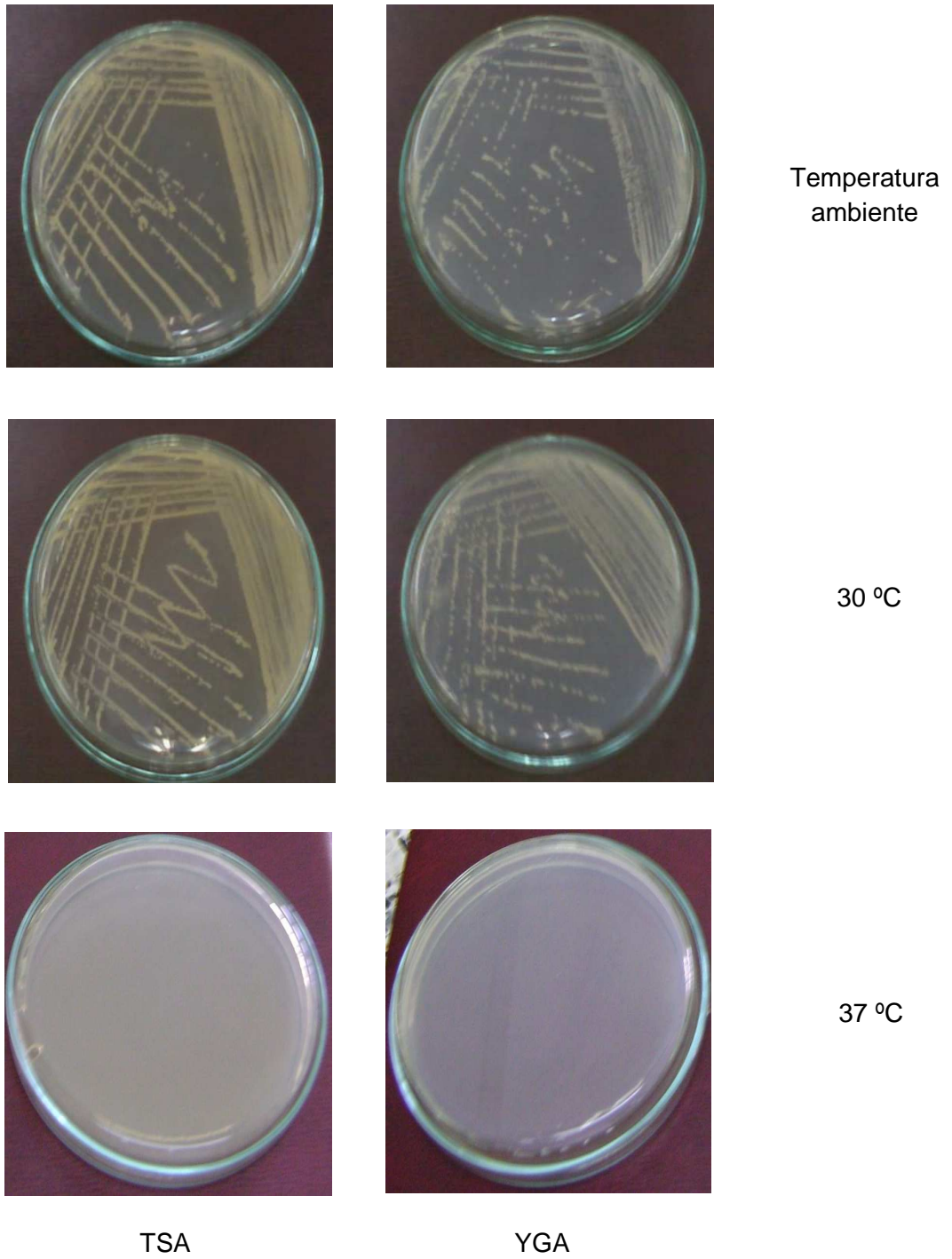
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y *Aspergillus niger* DSM 821.

#### 3.1 SELECCIÓN DE CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO DE LA CEPA *Rhodococcus opacus* DSM 44313

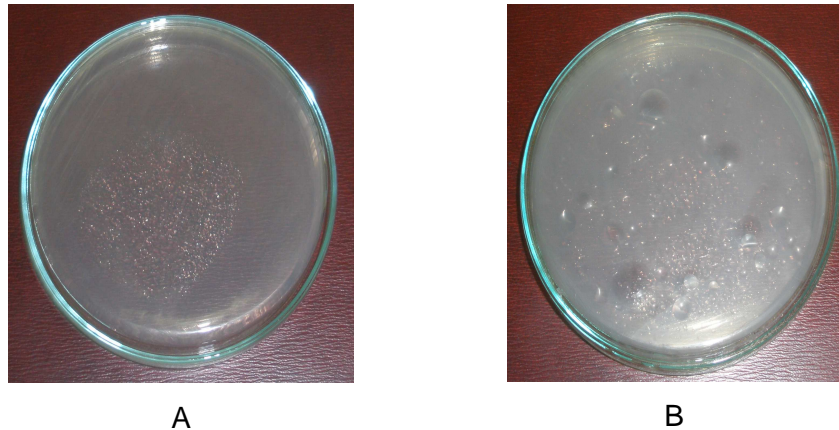
Inicialmente se evaluaron las condiciones de crecimiento del microorganismo. En la **Figura 1**, se observan fotografías de la cepa bacteriana después de 4 días de incubación a diferentes temperaturas en los medios TSA y YGA. Se aprecia que la bacteria creció en los dos medios evaluados a temperatura ambiente ( $\approx 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pero las colonias crecidas a temperatura ambiente necesitaron un día más para alcanzar la apariencia de las incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es decir, la incubación a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  favoreció el crecimiento de las colonias. De otra parte, el incremento de la temperatura a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inhibió totalmente el crecimiento, y al cuarto día no se observaron colonias en ninguno de los dos medios.

Por lo anterior, se escogió la temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el crecimiento de la bacteria en los medios TSA y YGA, además de un medio mineral en el que la fuente de carbono fue glucosa o geraniol al 2% p/v (**Figuras 2A y 2B**), en éste último caso para determinar el efecto inductor del sustrato.



**Figura 1.** *Rhodococcus opacus* DSM 44313 después de 4 días de incubación a diferentes temperaturas utilizando los medios TSA y YGA

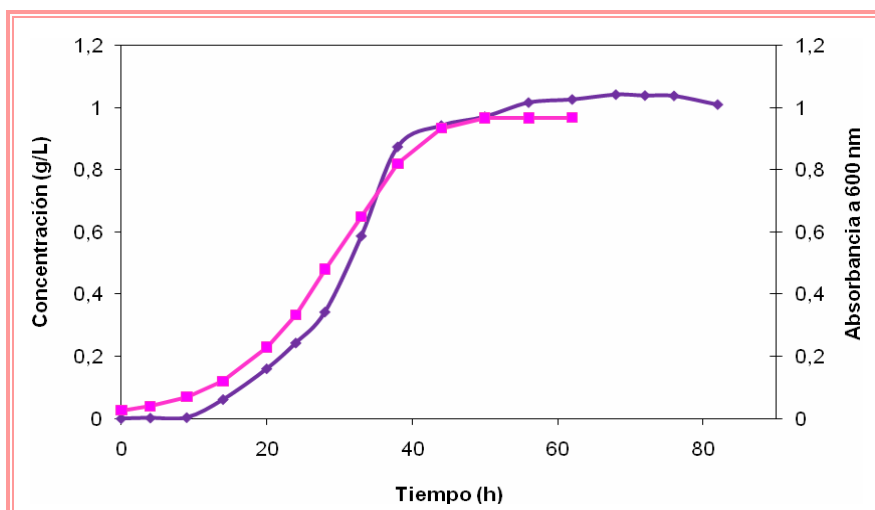
En el medio mineral después de 4 días de incubación no se observó crecimiento, por lo cual se descartó como medio para el crecimiento de la bacteria.



**Figura 2.** *Rhodococcus opacus* DSM 44313 después de 4 días de incubación en medio mineral. Fuente de carbono: (A) glucosa 2% p/v; (B) geraniol 2% p/v

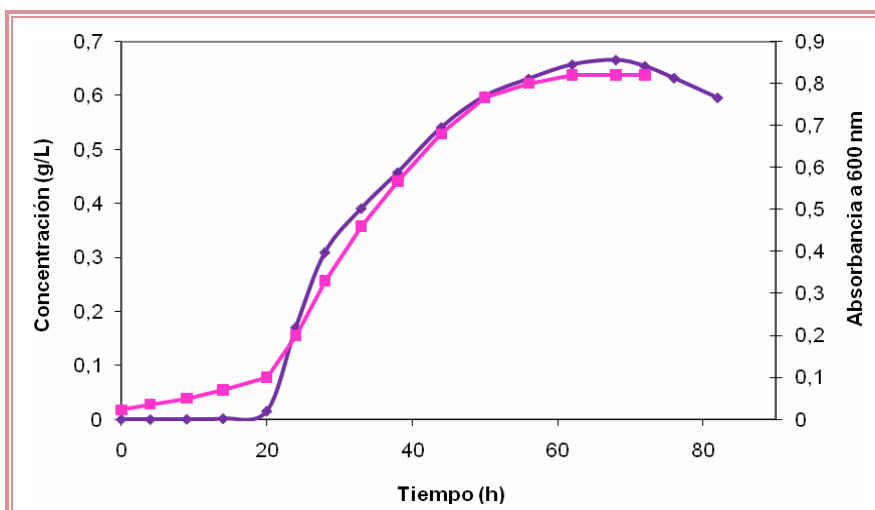
Posteriormente, teniendo en cuenta que la bacteria creció en los medios TSA y YGA, se realizaron las cinéticas de crecimiento bacteriano en los medios TSB y YG, las cuales se presentan en las **Figuras 3 y 4**.

La cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 presentó una fase de latencia de 20 h en el medio YG, mientras que en el medio TSB la fase de latencia duró 9 h, debido probablemente a que éste último medio es más enriquecido. En la **Figura 3**, se observa que en el medio TSB a las 31 h la bacteria se encontraba en la etapa media de su fase de crecimiento exponencial, con una concentración de biomasa de 0.6 g/L; mientras que a las 44 h estaba en la etapa final del crecimiento exponencial, alcanzando 0.9 g/L; y a las 56 h se encontraba en la fase estacionaria, presentando una concentración de biomasa de 1.0 g/L.



**Figura 3.** Curva de crecimiento de la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 en el medio TSB. — Concentración (g/L); — Absorbancia

En el medio YG (**Figura 4**), a las 33 h la bacteria se encontraba en la etapa media de su fase de crecimiento exponencial, presentando una concentración de biomasa de 0.5 g/L; a las 56 h estaba finalizando el crecimiento exponencial, alcanzando 0.8 g/L; y a las 68 h estaba en la fase estacionaria, con una concentración de biomasa de 0.8 g/L.



**Figura 4.** Curva de crecimiento de la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 en el medio YG. — Concentración (g/L); — Absorbancia

Los datos obtenidos fueron utilizados para determinar los tiempos en los que debían tomarse las suspensiones celulares para ser usadas como inóculos al evaluar el efecto de la fase de crecimiento del microorganismo en los procesos de biotransformación.

### **3.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL UTILIZANDO LA CEPA *Rhodococcus opacus* DSM 44313**

Se realizó la biotransformación de geraniol utilizando la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 en los medios TSB y YG, evaluando en cada uno de ellos el efecto de la fase de crecimiento de la bacteria, del etanol como cosolvente del sustrato y del tiempo de reacción. Empleando las condiciones que condujeron a los mejores resultados de biotransformación, se procedió a evaluar el efecto de la concentración de sustrato y se realizó la cinética de la reacción.

Adicionalmente, se llevó a cabo el proceso de biotransformación en un medio mineral con geraniol (20 mM) como única fuente de carbono. El medio mineral se inoculó con células que se encontraban en el medio y en la fase de crecimiento en la que se obtuvieron los mejores resultados después de evaluar los medios TSB y YG. El sustrato se adicionó puro o disuelto en etanol de acuerdo a las mayores concentraciones de productos obtenidas en los otros dos medios evaluados.

#### **3.2.1 Biotransformación en el medio TSB**

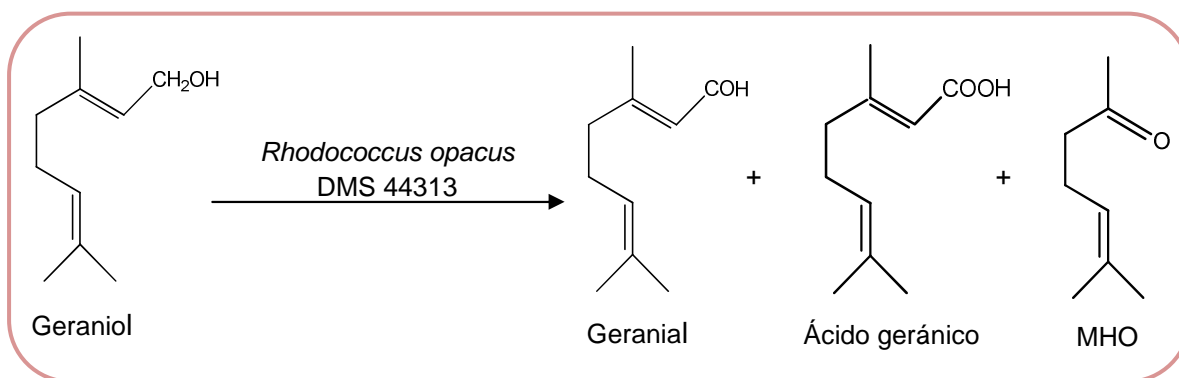
En la **Tabla 1**, se presentan los productos de la biotransformación de geraniol en el medio TSB. En ella se observa que con células tomadas en la etapa media de la fase exponencial se produjeron geraniol y ácido geránico, mientras que en la etapa final de esa fase se obtuvo además la 6-metil-5-hepten-2-ona.

**Tabla 1.** Productos de la biotransformación de geraniol en el medio TSB inoculado con *R. opacus* en la fase de crecimiento exponencial, 27 °C, 200 rpm, pH 7.2, concentración inicial de sustrato 20 mM

Productos (mg/L)	Etapa media de la fase exponencial			Etapa final de la fase exponencial		
	Tiempo de reacción (h)					
	12	24	48	12	24	48
6-metil-5-hepten-2-ona	ND.	ND.	ND.	2.3	3.1	5.3
Geranial	72.4	76.5	78.9	44.3	48.9	78.1
Ácido geránico	11.8	11.8	22.5	33.2	41.4	47.6

ND: No detectable. Geraniol adicionado puro.

El producto mayoritario fue el geranial (*E*-3,7-dimetil-2,6-octadienal), es decir, la bacteria oxidó el sustrato que es un alcohol y lo convirtió en su forma aldehídica (**Esquema 15**). Las mayores concentraciones de geranial se obtuvieron con células tomadas en la etapa media de la fase exponencial. El segundo compuesto en abundancia fue el ácido geránico (ácido (*2E*)-3,7-dimetilocta-2,6-dienóico), producto de la inserción de un átomo de oxígeno y la remoción de dos átomos de hidrógeno en la molécula de sustrato (**Esquema 15**).



**Esquema 15.** Biotransformación de geraniol utilizando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313

La producción de ácido geránico, compuesto más importante por sus propiedades anticancerígenas, aumentó con el tiempo, siendo mayor a las 48 h de reacción (47.6 mg/L) con células tomadas en la etapa final de la fase de crecimiento exponencial. El otro compuesto obtenido, la 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO), se produjo sólo cuando la bacteria estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial y en concentraciones de 5.3 mg/L. En la fase de crecimiento estacionaria no se detectó ningún producto, debido probablemente a la inhibición de la capacidad de biotransformación de la bacteria.

De otra parte, las reacciones de biotransformación en las que el geraniol se agregó disuelto en etanol al 10% conllevaron a la formación de productos por autooxidación, debido a que se encontraron los mismos compuestos tanto en los blancos de sustrato como en los experimentos que contenían suspensión de células, es decir, utilizando células crecidas en el medio TSB, hubo biotransformación de geraniol únicamente cuando el sustrato se adicionó puro.

### **3.2.2 Biotransformación en el medio YG**

Las reacciones de biotransformación de geraniol llevadas a cabo en el medio YG condujeron a la formación de productos distintos a los obtenidos en el medio TSB (6-metil-5-hepten-2-ona, geranial y ácido geránico), posiblemente debido a las diferencias en la composición de cada medio, que pudieron afectar el metabolismo de la bacteria.

Los compuestos producidos fueron geranial, neral y nerol, cuando se emplearon células tomadas en la fase estacionaria y usando el sustrato puro, y neral y geranial también con células en fase estacionaria pero adicionando el geraniol como una solución etanólica al 10%. En todos los casos los productos de reacción se obtuvieron en bajas concentraciones, como se muestra en la **Tabla 2**, y no corresponden a productos de valor agregado.

**Tabla 2.** Productos de la biotransformación de geraniol en el medio YG inoculado con *R. opacus* en diferentes fases de crecimiento, 27 °C, 200 rpm, pH 6.9, concentración inicial de sustrato 20 mM

Sustrato	Productos (mg/L)	Etapa media de la fase exponencial			Etapa final de la fase exponencial			Fase estacionaria		
		Tiempo de reacción (h)								
		12	24	48	12	24	48	12	24	48
Puro	Neral	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.4	7.8	10.9
	Geranial	4.4	4.4	4.6	4.1	4.2	4.8	4.2	4.5	4.7
	Nerol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.8	10.2	40.4
Sin etanólica 10%	Neral	4.1	5.0	5.2	5.8	8.2	8.8	9.4	9.5	11.2
	Geranial	3.8	3.9	4.0	3.7	4.8	5.8	6.1	8.1	12.8

ND: No detectable.

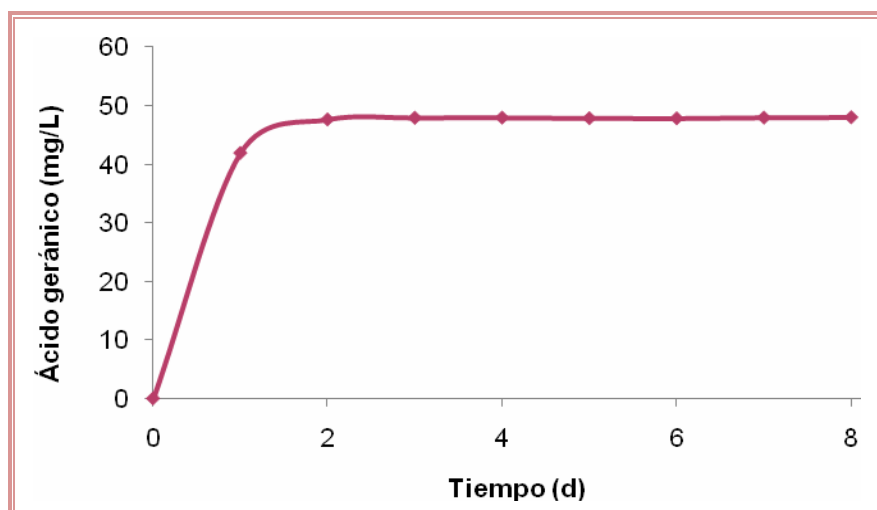
### 3.2.3 Efecto de la concentración de sustrato y cinética de la biotransformación

Para evaluar estos parámetros se empleó el medio TSB, teniendo en cuenta que la mayor concentración de ácido geránico se obtuvo usando una suspensión celular obtenida cuando la bacteria estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial. Para ello se agregaron diferentes concentraciones de geraniol puro y se dejaron transcurrir las reacciones durante 48 h. Se encontró que a una concentración de geraniol de 20 mM se saturó la capacidad de biotransformación de la bacteria, sin embargo, el mayor rendimiento de ácido geránico (3.2%) se alcanzó cuando la concentración de sustrato fue 5 mM (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Producción de ácido geránico en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol utilizando *R. opacus*, medio TSB, 27 °C, 200 rpm, pH 7.2

Concentración de geraniol (mM)	Concentración de ácido geránico (mg/L)	Rendimiento (%)
5	27.2	3.2
20	47.7	1.4
35	49.8	0.8
50	50.3	0.6

De otra parte, en la **Figura 5**, se observa que la concentración de ácido geránico, principal producto de la biotransformación de geraniol, no aumentó después de 2 días de reacción, razón por la cual ese fue el tiempo establecido para ésta biotransformación.



**Figura 5.** Cinética de producción de ácido geránico en la biotransformación de geraniol (20 mM) utilizando *R. opacus* DSM 44313, medio TSB, 27 °C, 200 rpm, pH 7.2

### 3.2.4 Biotransformación en un medio mineral

Para este ensayo se usó un medio mineral inoculado con bacterias finalizando su fase de crecimiento exponencial en el medio TSB y adicionando el geraniol puro en la concentración de 20 mM, la reacción se dejó transcurrir 48 h. En estas condiciones no se obtuvo ningún producto, lo que permite suponer que el microorganismo no tuvo la capacidad de biotransformar en presencia de geraniol como única fuente de carbono.

Finalmente, los resultados obtenidos en el numeral 3.2 indican que la biotransformación de geraniol con células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 condujo a la formación de geranial, ácido geránico y 6-metil-5-hepten-2-ona en el medio TSB, y de geranial, neral y nerol en el medio YG. De los compuestos producidos el más importante por su valor agregado es el ácido geránico debido a que posee propiedades anticancerígenas (Nagaki et al., 2007). El geranial, compuesto que se produjo en mayor concentración (78.9 mg/L), se usa en perfumería, y en la síntesis de la Vitamina A (Sell, 2003).

El ácido geránico se ha producido con una cantidad relativa del 5% por biotransformación de geraniol mediante células vegetales de *Cucurbita maxima*, empleando una concentración inicial de sustrato de 6.0 mM y un tiempo de reacción de 20 días (Nagaki et al., 2007). Sin embargo, las cantidades relativas no permiten establecer comparaciones con los resultados obtenidos en este trabajo.

Chatterjee, T., (2004) estudió la biotransformación de geraniol usando la cepa *Rhodococcus* sp. GR3 aislada del suelo y el único producto de la reacción fue el ácido geránico. El geraniol se agregó al 1% v/v (57 mM) y se alcanzó un rendimiento final del 50% después de 96 h de biotransformación. Mayores concentraciones de sustrato generaron menores rendimientos de conversión

debido a los efectos tóxicos del geraniol. En ese estudio, el rendimiento de ácido geránico fue significativamente mayor al obtenido en nuestro trabajo (3.2%), a pesar de que en ambos casos se utilizó una bacteria del género *Rhodococcus*.

Whitehead y Ohleyer (1997) patentaron un bioproceso a escala industrial para la producción de ácido geránico utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo condiciones aeróbicas y pH alcalino, el geraniol fue enantioselectivamente oxidado a (*E*)-ácido geránico (85%) y (+)-ácido citronélico (15%) (**Esquema 10**). El ácido geránico alcanzó una concentración máxima de 3.6 g/L después de 48 h.

En el presente trabajo la máxima concentración de ácido geránico fue 0.05 g/L, lo que permite establecer que la capacidad de biotransformación de la bacteria bajo las condiciones evaluadas fue baja.

### **3.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA *Rhodococcus opacus* DSM 44313**

Se realizó la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313 en los medios TSB y YG, evaluando en cada uno de ellos el efecto de la fase de crecimiento de la bacteria, del etanol como cosolvente del sustrato y del tiempo de reacción. Empleando las condiciones que condujeron a los mejores resultados de biotransformación, se procedió a evaluar el efecto de la concentración de sustrato y se realizó la cinética de la reacción.

También se realizó el proceso de biotransformación en medio mineral, con (R)-(+)- $\alpha$ -pineno (20 mM) como única fuente de carbono, inoculado con células crecidas en el medio y en la fase de crecimiento en la que se obtuvieron los mejores resultados después de evaluar los medios TSB y YG. El sustrato se adicionó puro o disuelto en etanol de acuerdo a las mayores concentraciones de productos obtenidas en los otros dos medios evaluados.

### 3.3.1 Biotransformación en el medio TSB

El único compuesto obtenido en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando células de *Rhodococcus opacus* en el medio TSB fue el *cis*-verbenol. En la **Tabla 4**, se presentan las concentraciones de este producto y se observa que la mayor concentración se obtuvo a las 48 h de reacción utilizando la suspensión celular obtenida en la etapa media de la fase exponencial y adicionando el sustrato como una solución etanólica al 10%. En todos los casos la concentración de *cis*-verbenol aumentó con el tiempo.

Cuando la suspensión celular se tomó en la fase estacionaria no se produjo *cis*-verbenol ni agregando el sustrato puro ni disuelto en etanol.

**Tabla 4.** Producción de *cis*-verbenol (mg/L) en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en el medio TSB inoculado con *R. opacus* en la fase de crecimiento exponencial, 27 °C, 200 rpm, pH 7.2, concentración inicial de sustrato 20 mM

Sustrato	Etapa media de la fase exponencial			Etapa final de la fase exponencial		
	Tiempo de reacción (h)					
	12	24	48	12	24	48
Puro	27.5	30.8	33.2	16.1	35.5	46.7
Disuelto en etanol al 10%	25.8	33.8	71.9	18.6	27.7	63.5

### 3.3.2 Biotransformación en el medio YG

Contrario a lo obtenido en el medio TSB, en el medio YG se obtuvieron varios productos, pero el mayoritario fue el *cis*-verbenol (**Tabla 5**). Sin embargo, la

concentración de éste compuesto fue menor (48.0 mg/L) a la alcanzada cuando se usó el medio TSB (71.9 mg/L). En los dos medios de cultivo la concentración de *cis*-verbenol fue mayor cuando el sustrato se adicionó como una solución etanólica al 10%, pero en el medio YG ésta concentración se alcanzó cuando la bacteria estaba en la fase estacionaria.

**Tabla 5.** Productos de la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en el medio YG inoculado con *R. opacus* en diferentes fases de crecimiento, 27 °C, 200 rpm, pH 6.9, concentración inicial de sustrato 20 mM

Sustrato	Productos (mg/L)	Etapa media de la fase exponencial			Etapa final de la fase exponencial			Fase estacionaria		
		Tiempo de reacción (h)								
		12	24	48	12	24	48	12	24	48
Puro	Canfeno	6.9	8.2	8.7	8.7	9.5	10.4	ND	ND	ND
	Tujol	ND	ND	ND	6.2	7.9	12.1	6.6	12.3	17.2
	<i>Cis</i> -verbenol	12.8	17.0	19.7	3.0	6.7	12.7	5.9	11.9	20.4
Sin etanólica 10%	Canfeno	6.6	8.9	10.5	10.6	11.0	11.5	ND	ND	ND
	Tujol	ND	ND	ND	9.4	11.5	13.9	15.9	16.0	16.1
	<i>Cis</i> -Verbenol	12.9	15.2	16.8	13.7	14.2	14.7	4.8	10.4	48.0

ND: No detectable

### 3.3.3 Efecto de la concentración de sustrato y cinética de la reacción

Para evaluar el efecto de la concentración de sustrato, se tomó la suspensión celular en el medio TSB cuando la bacteria estaba en la mitad de su fase de crecimiento exponencial, se agregaron diferentes concentraciones de sustrato disuelto en etanol al 10% y se dejó transcurrir la reacción durante 48 h. Se

encontró que la bacteria se saturó con una concentración de sustrato de 35 mM y el mayor rendimiento de *cis*-verbenol se obtuvo cuando la concentración de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno fue 5 mM (**Tabla 6**).

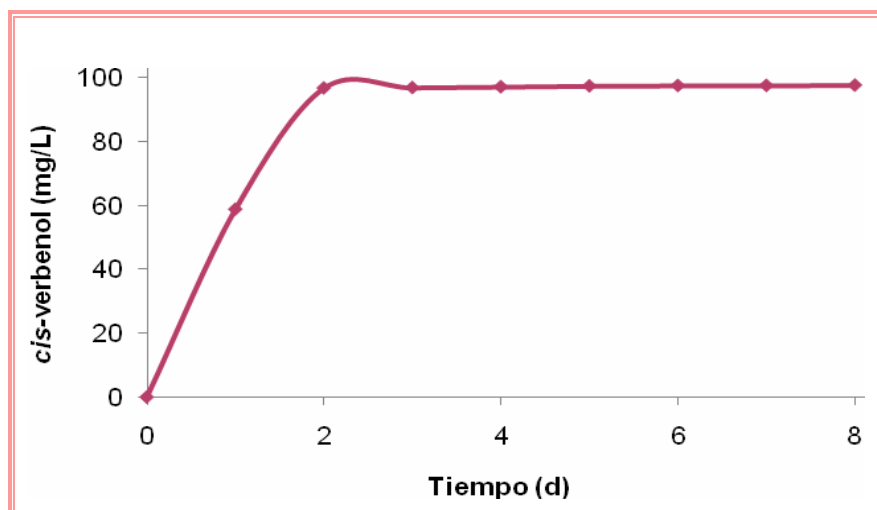
**Tabla 6.** Producción de *cis*-verbenol en la biotransformación de diferentes concentraciones de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, 27 °C, medio TSB, 200 rpm, pH 7.2, 48 h

Concentración de pineno (mM)	Concentración de <i>cis</i> -verbenol (mg/L)	Rendimiento (%)
5	25.8	3.4
20	69.5	2.3
35	96.9	1.8
50	100.8	1.3

La cinética de biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se realizó durante 8 días, empleando una concentración de sustrato de 35 mM con células tomadas en la mitad de su fase de crecimiento exponencial en el medio TSB. En la **Figura 6**, se observa que la concentración de *cis*-verbenol no aumentó después de 2 días de reacción, por lo tanto, se estableció ese tiempo como el más adecuado para la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno.

### 3.3.4 Biotransformación en un medio mineral

Para este ensayo se usó un medio mineral inoculado con bacterias en la etapa media de la fase de crecimiento exponencial en el medio TSB y adicionando el sustrato como una solución etanólica al 10% en la concentración de 20 mM, la reacción se dejó transcurrir 48 h. En estas condiciones el único compuesto obtenido fue el *cis*-verbenol, pero su concentración fue menor (30.0 mg/L) a la producida en los medios TSB (71.9 mg/L, **Tabla 4**) y YG (48.0 mg/L, **Tabla 5**).



**Figura 6.** Cinética de producción de *cis*-verbenol en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno (35 mM) utilizando *R. opacus* DSM 44313, medio TSB, 27 °C, 200 rpm, pH 7.2

Contrario a lo obtenido en el caso del geraniol, la bacteria mostró capacidad para biotransformar el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en este medio, aunque en menor proporción a la presentada usando medios más enriquecidos.

Los resultados obtenidos en el numeral 3.3 permiten establecer que la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 condujo a la formación principalmente de *cis*-verbenol, un compuesto que se usa directamente como aditivo o para producir variedad de sustancias fragantes y vitaminas (Limberger et al., 2007) y cuyo costo promedio es de US\$ 3500/kg (Vidya y Agrawal, 2003) en comparación con el precio del  $\alpha$ -pineno que es de US\$ 0.0075/ kg (Agrawal y Joseph, 2000).

El *cis*-verbenol se obtuvo en los tres medios de cultivo evaluados (TSB, YG y mineral), su concentración fue mayor empleando células que se encontraban en la etapa media de la fase de crecimiento exponencial en el medio TSB. La adición del sustrato como una solución etanólica al 10% y un tiempo de reacción

de 48 h conllevaron a una mayor formación de producto. En este caso, como el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno es un hidrocarburo insoluble en agua, el etanol favoreció su disolución en el medio de reacción. El mayor rendimiento de *cis*-verbenol (3.4%) se obtuvo cuando la concentración de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno fue 5 mM.

En la bibliografía no se ha publicado la biotransformación de este sustrato con células de *Rhodococcus opacus*, por lo que no es posible establecer comparaciones.

Con otras bacterias, sin embargo, sí hay publicaciones respecto a la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno. Schewe et al., 2009, emplearon una cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21 y obtuvieron óxido de  $\alpha$ -pineno, verbenol y mirtenol en una concentración total de productos de 1 g/L después de sólo 4 h de reacción, siendo el máximo valor publicado para la transformación de este sustrato.

También se ha publicado la obtención de verbenol (35% de rendimiento), acetato de dihidrocarveol (20%) y verbenona (10%) empleando células de *Pseudomonas putida* (Divyashree et al., 2006).

En otro estudio se utilizó *Pseudomonas* sp. PIN, aislada del suelo y adaptada al sustrato en cultivos enriquecidos con  $\alpha$ -pineno, utilizado como la única fuente de carbono y energía. Los productos de biotransformación fueron limoneno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, alcanfor, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, *endo*-borneol y *p*-cimeno-8-ol. La bioconversión total de  $\alpha$ -pineno fue del 33.5% (Yoo y Day, 2001).

Lo anterior indica que los rendimientos obtenidos en el presente trabajo (3.4%) fueron inferiores a los publicados por otros autores, posiblemente debido a las diferencias en el biocatalizador y a las condiciones de reacción empleadas,

especialmente las relacionadas con la disponibilidad de oxígeno en el medio de biotransformación.

En la **Tabla 7**, se relacionan las condiciones en las cuales se obtuvieron los mayores rendimientos de ácido geránico y *cis*-verbenol, productos de mayor valor agregado obtenidos en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, respectivamente. En ella se observa que el medio TSB favoreció la biotransformación de ambos sustratos, pero el ácido geránico se obtuvo sólo en ese medio, mientras que el *cis*-verbenol se produjo en los tres medios evaluados, es decir, la bacteria mostró especificidad hacia la producción de *cis*-verbenol a pesar de las diferencias en los medios de cultivo.

La fase exponencial de crecimiento favoreció la biotransformación de los dos sustratos, aunque en el caso del geraniol los mejores resultados se obtuvieron finalizando esa fase y en el caso del (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en la mitad de la misma.

Las diferencias observadas en la forma de adicionar los sustratos pueden deberse al efecto de la solubilidad de los mismos. El (R)-(+)- $\alpha$ -pineno tiene baja solubilidad (0.026 mmol/L) (Van der Werf, 1997), por lo que la presencia de etanol puede facilitar el proceso de biotransformación debido a que lo solubiliza en el medio de reacción; mientras que el geraniol por ser un alcohol es más soluble en agua y con ese sustrato el etanol podría ejercer un efecto tóxico sobre las células.

La concentración de sustrato a la que se obtuvieron los mayores rendimientos de productos fue la misma para el geraniol y para el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno (5 mM), pero la capacidad de biotransformación de la bacteria se saturó a una menor concentración en el caso del geraniol (20 mM). El mejor tiempo de reacción para los dos sustratos fue 48 h.

**Tabla 7.** Condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313

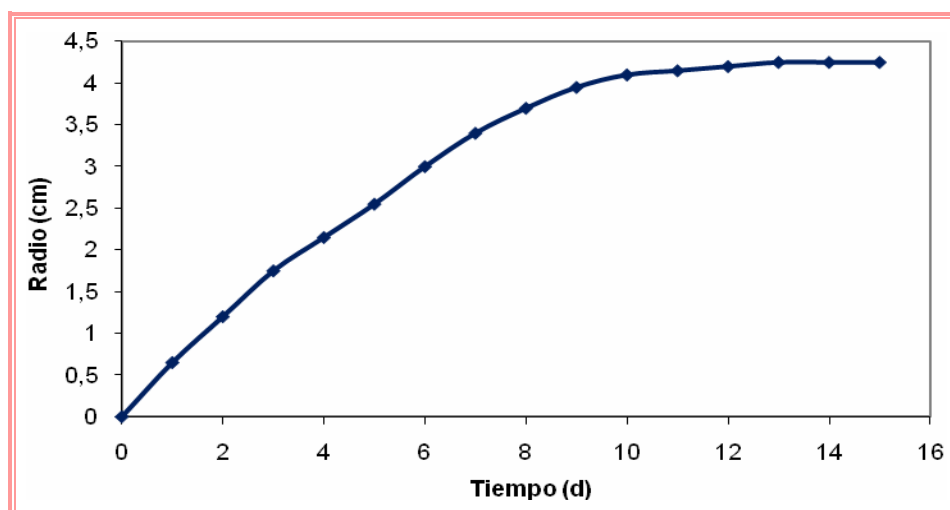
Condición	Geraniol	(R)-(+)- $\alpha$ -pineno
Medio de cultivo	TSB	TSB
Fase de crecimiento	Etapa media de la fase exponencial	Etapa final de la fase exponencial
Sustrato en el medio	Puro	Solución etanólica al 10%
Concentración de sustrato	5 mM	5 mM
Tiempo de reacción	48 h	48 h
Producto de valor agregado (Rendimiento)	Ácido geránico (3.2%)	<i>cis</i> -verbenol (3.4%)

En las condiciones indicadas los rendimientos obtenidos en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 fueron bajos, por lo que se procedió a evaluar la biotransformación de los mismos sustratos con células de *Aspergillus niger* DSM 821.

### 3.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL UTILIZANDO LA CEPA *Aspergillus niger* DSM 821

Para establecer la cinética de crecimiento del microorganismo se emplearon las condiciones seleccionadas por Castellanos et al., (2007). En la **Figura 7**, se muestran los resultados obtenidos. En ella se observa que a los 5 días el hongo se encontraba en la etapa media de la fase de crecimiento exponencial y a los 8 días estaba finalizando esa fase.

Para evaluar el efecto de la edad del hongo se emplearon esporas tomadas en la etapa media de la fase exponencial y finalizando esa fase. En los dos casos las células de *Aspergillus niger* DSM 821 mostraron especificidad hacia la producción de linalol, siendo éste el único compuesto obtenido en la biotransformación. En la **Tabla 8**, se muestran las concentraciones de linalol alcanzadas a los 7 y 14 días y se observa que las mayores concentraciones de producto se alcanzaron tomando las esporas cuando el hongo estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial (8 días).

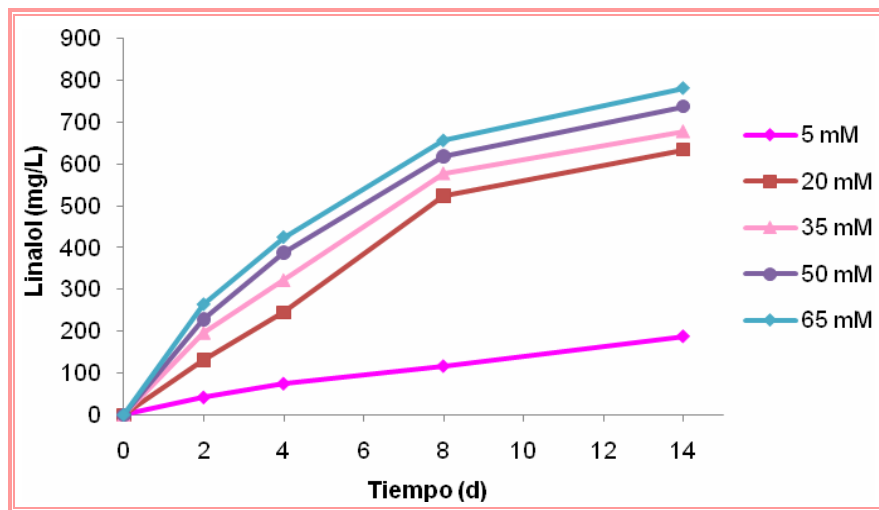


**Figura 7.** Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* DSM 821 en medio MEA a 29 °C

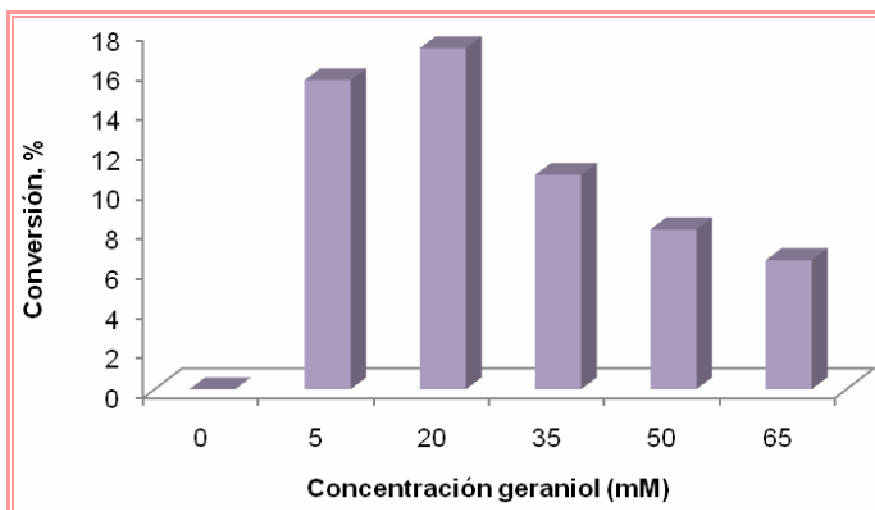
**Tabla 8.** Concentración de linalol (mg/L) en la biotransformación de geraniol con esporas recuperadas en diferentes días de crecimiento de *A. niger*, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7

Fase de crecimiento exponencial	Tiempo de reacción (d)	
	7	14
<b>Etapa media de la fase exponencial</b>	358.0	604.3
<b>Etapa final de la fase exponencial</b>	429.5	610.4

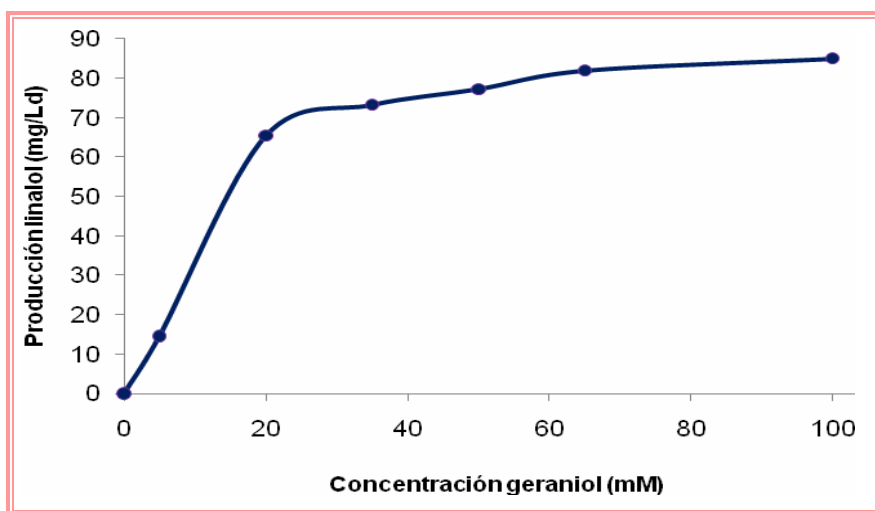
Al evaluar el proceso usando diferentes concentraciones de geraniol se encontró que la concentración de linalol aumentó con la concentración de sustrato, presentando una tendencia lineal hasta los 8 días de biotransformación, tiempo a partir del cual la velocidad de producción de linalol disminuyó (**Figura 8**). La conversión de geraniol aumentó al pasar de una concentración de 5 mM (15%) a una de 20 mM (17%) pero a concentraciones superiores la conversión se redujo considerablemente, siendo 6.5% cuando la concentración de geraniol fue 65 mM (**Figura 9**). Lo anterior se confirmó al considerar la velocidad de producción de linalol y su evolución con la concentración de sustrato, de donde se estableció que las células de *A. niger* se saturaron con una concentración de geraniol de 65 mM (**Figura 10**).



**Figura 8.** Concentraciones de linalol en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol empleando la cepa *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7

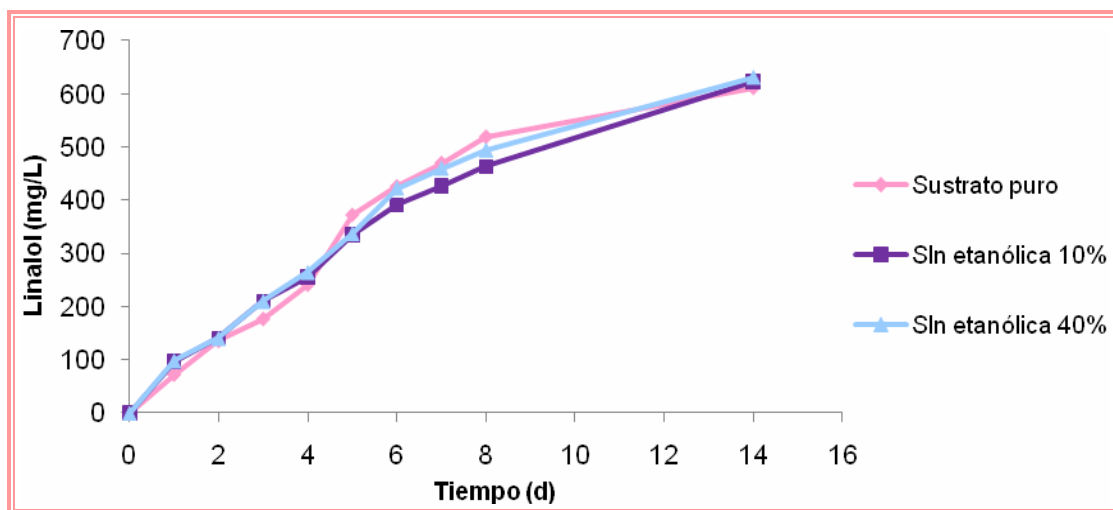


**Figura 9.** Conversión de geraniol en la biotransformación de diferentes concentraciones de sustrato utilizando *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7, 8 días de reacción



**Figura 10.** Producción de linalol en la biotransformación de diferentes concentraciones de geraniol utilizando la cepa *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7, 8 días de reacción

Respecto a la forma como se adicionó el sustrato en el medio de reacción, se encontró que la concentración de linalol producido no presentó diferencias significativas al adicionarlo puro o disuelto en etanol al 10% o al 40% (**Figura 11**), es decir, podría adicionarse puro y se evitaría la presencia del solvente orgánico.



**Figura 11.** Efecto del etanol como cosolvente del sustrato en la biotransformación de geraniol utilizando la cepa *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7, concentración inicial de geraniol 20 mM

El linalol ya ha sido obtenido como producto mayoritario a partir de geraniol empleando células de *Aspergillus niger*, con un rendimiento del 4.3% después de 7 días de reacción (Demyttenaere et al., 2000). En el presente estudio ese compuesto se obtuvo con un rendimiento del 15.2% en el mismo tiempo, es decir, en este trabajo se alcanzó un rendimiento 3.5 veces superior al publicado en la bibliografía, sin embargo, el linalol no constituye actualmente un producto de valor agregado.

En la **Tabla 9**, se muestran las investigaciones publicadas para la biotransformación de geraniol con hongos. Se observa que al emplear células de *Aspergillus niger*, además del linalol se han obtenido 6-metil-5-hepten-2-ona, limoneno, geraniol y  $\alpha$ -terpineol, pero en bajos rendimientos (Demyttenaere et al., 2000), mientras que al utilizar hongos del género *Penicillium* el único compuesto obtenido y con altos rendimientos es la 6-metil-5-hepten-2-ona.

**Tabla 9.** Investigaciones publicadas para la biotransformación de geraniol empleando hongos

Productos	Microorganismo	Referencias
Citronelol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Valadez et al., 2008
6-metil-5-hepten-2-ona (rendimiento: 83.1% en 3 semanas)	<i>Penicillium digitatum</i>	Demyttenaere y De Kimpe, 2001
6-metil-5-hepten-2-ona (0.9 mM en 6 h)	<i>Penicillium digitatum</i>	Wolken y Van Der Werf, 2001
Linalol (4.3%), 6-metil-5-hepten- 2-ona (1.1%), limoneno (1.1%), geranial (0.6%), $\alpha$ -terpineol (0.2%). Rendimientos después de 7 días de reacción.	<i>Aspergillus niger</i>	Demyttenaere et al., 2000
Ácido geránico (85%), ácido citronélico (15%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Whitehead y Ohleyer, 1997
6-metil-5-hepten-2-ona (76% en 4 días)	<i>Penicillium italicum</i>	Demyttenaere y De Pooter, 1996
8-hidroxigeraniol	<i>Aspergillus niger</i>	Madyastha y Krishna, 1988

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se pudo establecer que las células de *Aspergillus niger* fueron altamente selectivas hacia la producción de linalol y se saturaron con una concentración de sustrato de 65 mM. El etanol no ejerció ningún efecto en la concentración de linalol producido, por lo que se puede adicionar puro en el medio de reacción. La mayor conversión se obtuvo

agregando el sustrato en una concentración de 20 mM y en un tiempo de 8 días de biotransformación.

### 3.5 BIOTRANSFORMACIÓN DE (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO UTILIZANDO LA CEPA *Aspergillus niger* DSM 821

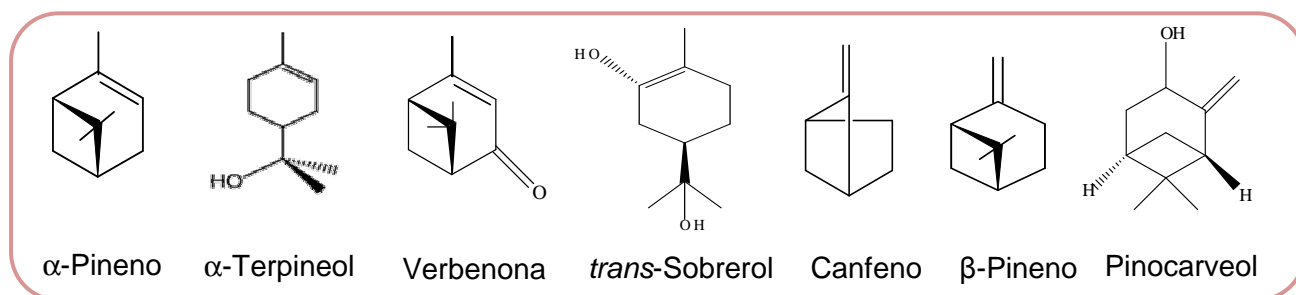
Para evaluar el efecto de la edad del hongo sobre la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, se emplearon esporas tomadas en la etapa media de la fase de crecimiento exponencial y finalizando esa fase. En la **Tabla 10**, se muestran las concentraciones de  $\alpha$ -terpineol y verbenona producidas a los 7 y 14 días de biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno. Se observa que las mayores concentraciones de productos se alcanzaron tomando las esporas cuando el hongo estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial (8 días).

**Tabla 10.** Concentraciones de  $\alpha$ -terpineol y verbenona (mg/L) en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con esporas recuperadas en diferentes días de crecimiento de *A. niger*, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7

Fase de crecimiento	$\alpha$ -terpineol		verbenona	
	Tiempo de reacción (días)			
	7	14	7	14
Fase exponencial media	39.5	72.7	ND	6.5
Fase exponencial final	55.9	162.2	29.9	60.2

En la **Figura 12**, se observan las estructuras de los compuestos producidos en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, y en la **Figura 13**, se muestra el efecto de la concentración de sustrato y del tiempo de reacción sobre las concentraciones

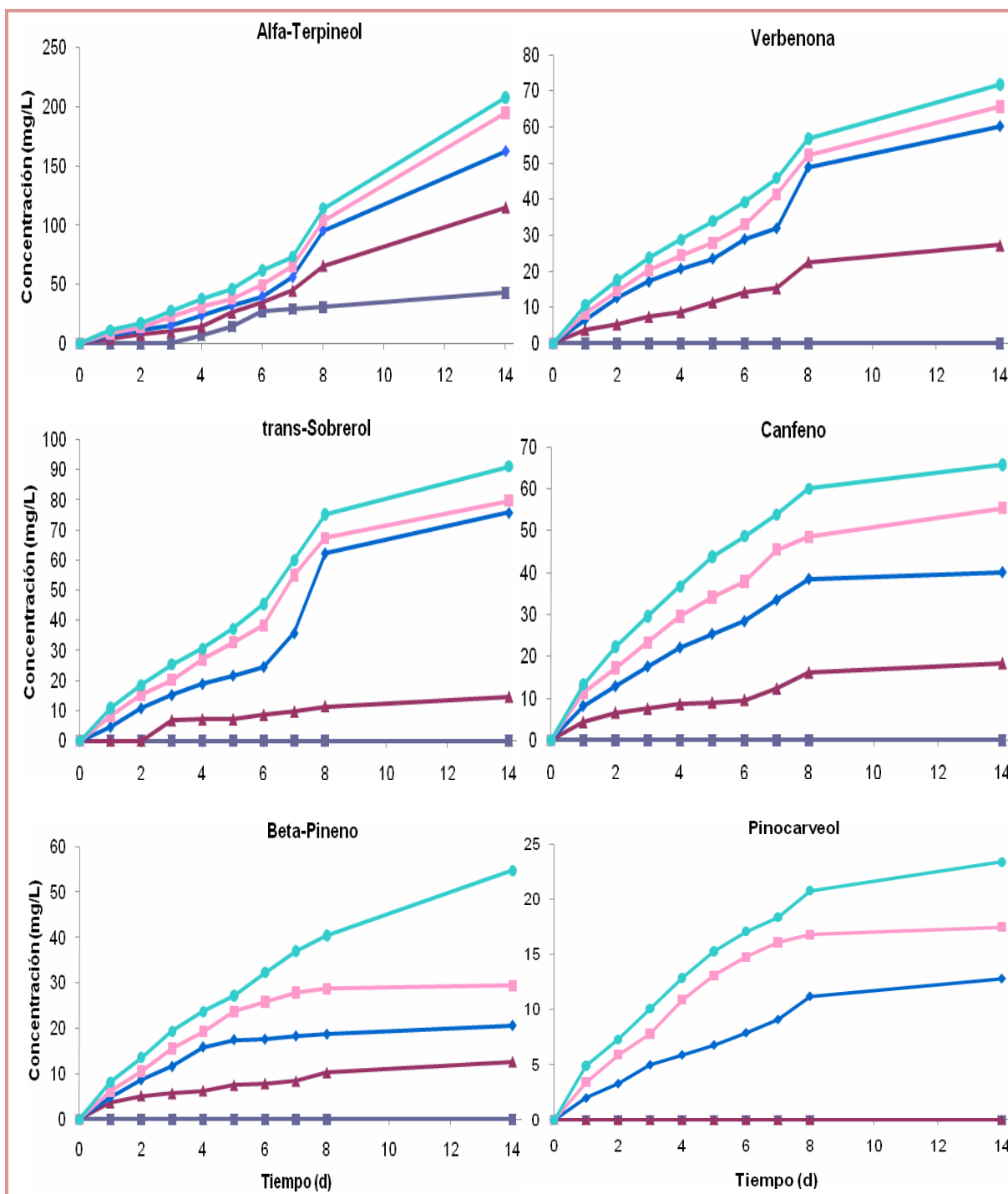
de estos compuestos. En todos los casos la concentración de productos aumentó con el transcurso de la reacción, pero después de 8 días las concentraciones de verbenona, *trans*-sobrerol, canfeno,  $\beta$ -pineno y pinocarveol no incrementaron significativamente.



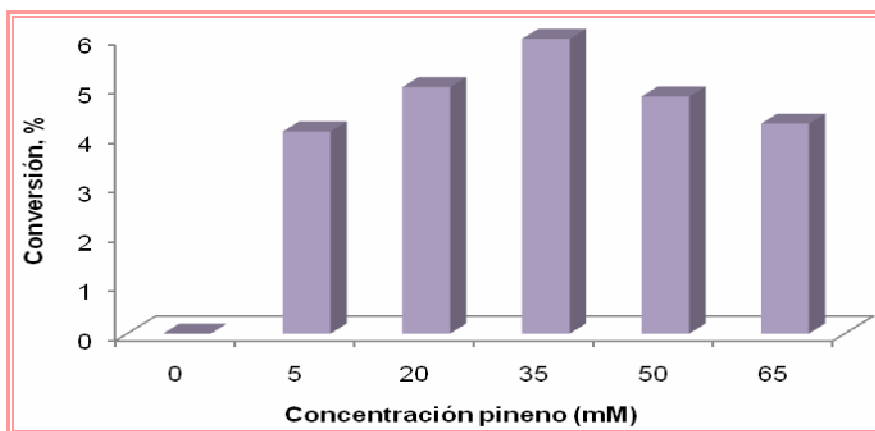
**Figura 12.** Estructura del  $\alpha$ -pineno y de los compuestos obtenidos durante su biotransformación utilizando células de *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7

Cuando la concentración de sustrato en el medio de biotransformación fue 5 mM, el único compuesto que se produjo fue el  $\alpha$ -terpineol después de 4 días de reacción, a partir de esta concentración aumentó el número de productos generados.

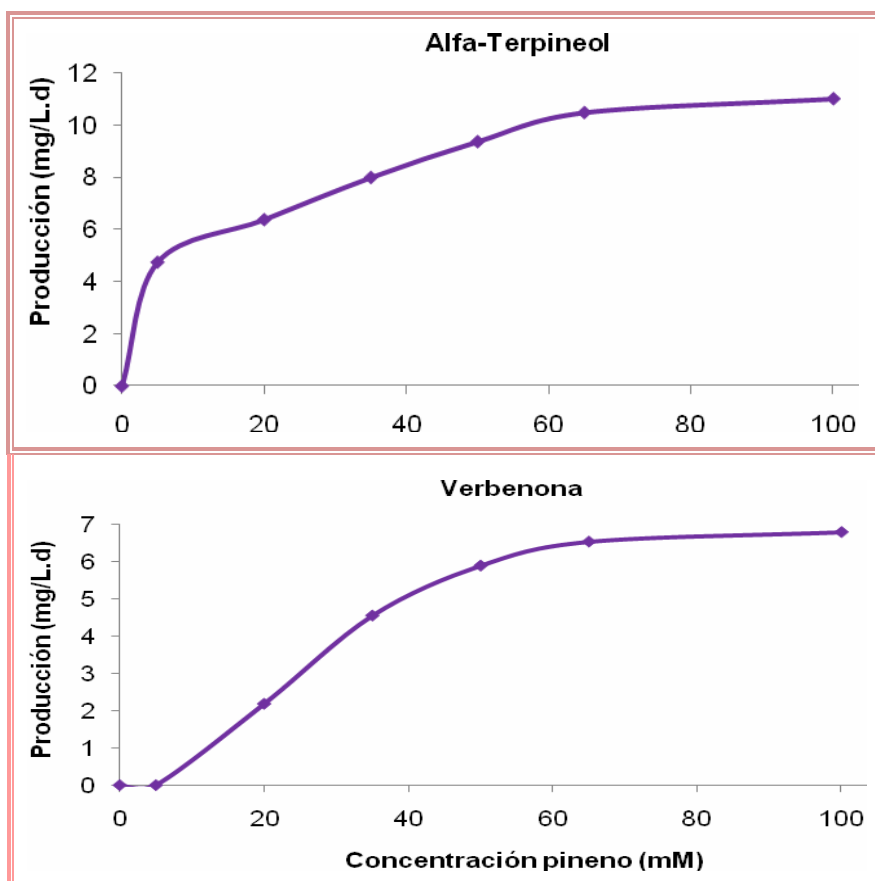
En cuanto al efecto de la concentración de sustrato, la mayor conversión se obtuvo con una concentración de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno de 35 mM (**Figura 14**), aunque las células de *A. niger* toleraron concentraciones superiores y se saturaron cuando la concentración de sustrato en el medio de reacción fue 65 mM (**Figura 15**).



**Figura 13.** Efecto de la concentración de sustrato y del tiempo de reacción en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno mediante células de *Aspergillus niger* DSM 821. Concentración de sustrato (mM): — 5, — 20, — 35, — 50, — 65, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7



**Figura 14.** Conversión de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno en la biotransformación de diferentes concentraciones de sustrato utilizando *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7, 7 días



**Figura 15.** Producción de  $\alpha$ -terpineol y verbenona en la biotransformación de diferentes concentraciones de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando la cepa *A. niger* DSM 821, 29 °C, 200 rpm, pH 3.7, 7 días de reacción

La adición del sustrato como una solución etanólica tuvo un efecto positivo en la biotransformación del (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, las mayores concentraciones de producto se obtuvieron cuando se utilizó una solución al 10% (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Efecto del cosolvente en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de *Aspergillus niger* DSM 821, 29°C, 200 rpm, pH 3.7, 8 días de reacción

Sustrato (35 mM)	$\alpha$ -terpineol	verbenona
Puro	99.7	51.4
10% en etanol	177.9	78.0
40% en etanol	105.8	53.9

En la **Tabla 12**, se muestran las investigaciones publicadas para la biotransformación de pineno empleando hongos, y se observa que al igual que en éste trabajo, se han obtenido  $\alpha$ -terpineol, verbenona y pinocarveol como productos de reacción.

Entre los productos obtenidos en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno el más importante por sus aplicaciones farmacéuticas y valor agregado es la verbenona. La verbenona extraída es costosa e insuficiente para su demanda. Este compuesto se ha sintetizado empleando catalizadores de cobre, cromo, rutenio y titanio (Divyashree et al., 2006), pero los productos así obtenidos no pueden considerarse naturales.

Rozembaum et al., (2006), obtuvieron 35 mg/L de verbenona después de 3 días de biotransformación de  $\alpha$ -pineno (63 mM) con células de *Aspergillus niger*, mientras que en este estudio la concentración de verbenona a los 3 días de reacción a partir de una concentración de sustrato de 65 mM, fue 23.7 mg/L.

**Tabla 12.** Investigaciones publicadas para la biotransformación de  $\alpha$ -pineno empleando hongos

Productos	Microorganismo	Referencias
Verbenol (5/72) <sup>a</sup> verbenona (11/35) mirtenol (5/15) $\epsilon$ -pinocarveol (11/9.2) fenchol (11/0.3) $\alpha$ -terpineol (11/12) 3-pinanona (5/3.5)	<i>Penicillium solitum</i>	Pescheck et al., 2009
$\alpha$ -terpineol, borneol, fenchol <i>p</i> -mentano-1,8-diol	<i>Aspergillus niger</i>	Castellanos, 2007
Verbenona (3/35)	<i>Aspergillus niger</i>	Rozembaum et al., 2006
Verbenol (48.6% en 6 horas)	<i>Fusión de dos cepas de A. niger</i>	Vidya y Agrawal, 2003
Verbenona (25% en 10 días) 3 $\beta$ -hidroxi(-)- $\alpha$ -pineno (10%) 9-hidroxi(-)- $\alpha$ -pineno (12%) 3 $\beta$ -hidroxi(-)- $\alpha$ -pinen-6-ona (16%)	<i>Botrytis cinerea</i>	Farooq et al., 2002
(+)-Verbenona (31.7% en 5 días)	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Limberger, 2001
Verbenona (16.7% en 6 horas)	<i>Aspergillus niger</i>	Agrawal y Joseph, 2000
Verbenona (4/300) <sup>a</sup> <i>trans</i> -verbenol (4/400)	<i>Hormonema sp.</i>	Van Dyk et al., 1998

<sup>a</sup>Tiempo de reacción (días)/concentración de producto (mg/L) <sup>b</sup>Porcentaje de rendimiento

Empleando células de *Hormonema* sp., Van Dyk et al., (1998) obtuvieron una alta concentración de verbenona (300 mg/L), pero los resultados no fueron fácilmente reproducibles, según lo publicado por Schewe et al., 2009.

En la **Tabla 13**, se establece una comparación entre las concentraciones de verbenona,  $\alpha$ -terpineol y pinocarveol publicadas por Pescheck et al., (2009) empleando células de *Penicillium* sp., una concentración de sustrato de 47 mM y un tiempo de reacción de 11 días, y las obtenidas en el presente estudio a partir de una concentración de  $\alpha$ -pineno de 50 mM y un tiempo de reacción de 8 días. Las mayores concentraciones de productos se obtuvieron en nuestro estudio, en el que se usaron células de *Aspergillus niger*. Es de destacar que la concentración de  $\alpha$ -terpineol fue 8.7 veces superior en nuestro trabajo y la de verbenona 1.5 veces. El trabajo de Pescheck es el reporte más reciente respecto a la biotransformación de  $\alpha$ -pineno.

**Tabla 13.** Comparación entre las concentraciones de productos obtenidas por Pescheck et al., (2009) y el presente trabajo

Producto	Concentración (mg/L) Pescheck y col (2009)	Concentración (mg/L) nuestro trabajo
Verbenona	35	52.2
$\alpha$ -Terpineol	12	104.0
Pinocarveol	9.2	16.8

En resumen, los resultados publicados en el numeral 3.5 permiten concluir que la mayor conversión de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se obtuvo a partir de una concentración de sustrato de 35 mM, agregada como una solución etanólica al 10%, en un tiempo de reacción 8 días.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en los numerales 3.4 y 3.5, se puede establecer que con los dos sustratos, geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, se obtuvo mayor conversión recuperando las esporas a los 8 días de crecimiento del hongo en medio MEA. Con ambos sustratos el tiempo de biotransformación establecido fue 8 días. En el caso del geraniol el hongo mostró especificidad hacia la producción de linalol porque fue el único compuesto obtenido y la mayor conversión se logró agregando el sustrato puro en una concentración de 20 mM. En la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno disminuyó la especificidad de producto porque se obtuvieron 6 compuestos, y a diferencia de lo encontrado con el geraniol, la mayor conversión se obtuvo agregando el sustrato como una solución etanólica al 10% en la concentración de 35 mM. En ambos casos las células de *Aspergillus niger* DSM 821 se saturaron con una concentración de sustrato de 65 mM.

En la **Tabla 14** se relacionan las condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno con células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y *Aspergillus niger* DSM 821. En ella se observa que las células fúngicas biotransformaron mayores concentraciones de sustrato, pero con la bacteria se obtuvieron mayores productividades. A pesar de tratarse de dos microorganismos completamente distintos, mostraron el mismo comportamiento respecto a la adición de los dos sustratos, en forma pura o como solución etanólica.

**Tabla 14.** Condiciones con las cuales se alcanzaron los mayores rendimientos en la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y *Aspergillus niger* DSM 821

	<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 44313		<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	
	Geraniol	(R)-(+)- $\alpha$ -pineno	Geraniol	(R)-(+)- $\alpha$ -pineno
Sustrato en el medio	Puro	Sln etanólica 10%	Puro	Sln etanólica 10%
Concentración de sustrato	5 mM	5 mM	20 mM	35 mM
Productos mayoritarios (mg/L)	Geraniol (58.5)	<i>cis</i> -verbenol (25.8)	Linalol (518.8)	Terpineol (177.9)
Productos de valor agregado (mg/L)	Ác. Geránico (27.2)	<i>cis</i> -verbenol (25.8)	-	Verbenona (78.0)
Productividad* (mg/L.d)	13.6	12.9	-	9.75
Rendimiento* (%)	3.2	3.4	-	1.5

\*De los productos de valor agregado

A pesar de obtener compuestos de valor agregado como el ácido geránico, el *cis*-verbenol y la verbenona, sus rendimientos fueron bajos, por lo cual se deben evaluar otros procesos de obtención, especialmente en condiciones de aireación mejoradas.

## CONCLUSIONES

- ♣ La cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* DSM 44313, para un mismo sustrato generó diferentes compuestos dependiendo del medio de cultivo. Con geraniol se produjeron geranial, ácido geránico y 6-metil-5-hepten-2-ona en el medio TSB, y geranial, neral y nerol cuando la biotransformación se realizó en el medio YG. Con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno la bacteria produjo *cis*-verbenol en los medios TSB y mineral y cuando la biotransformación se realizó en el medio YG, además del *cis*-verbenol se produjeron canfeno y tujol.
- ♣ La concentración de productos obtenidos se vio influenciada por la fase de crecimiento de la bacteria, por la forma de adicionar el sustrato al medio (puro o disuelto en etanol) y por la concentración de sustrato. Así, el ácido geránico, un importante compuesto con propiedades anticancerígenas, se obtuvo cuando la biotransformación de geraniol se llevó a cabo en el medio TSB y usando el sustrato puro, y su concentración fue mayor utilizando células que se encontraban en la etapa final de la fase de crecimiento exponencial. El *cis*-verbenol obtenido a partir de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se produjo mayoritariamente en el medio TSB y agregando el sustrato disuelto en etanol sobre células que se encontraban en la etapa media de la fase exponencial.
- ♣ El único producto en la biotransformación de geraniol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821 fue el linalol, mientras que con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se produjeron  $\alpha$ -terpineol, verbenona, *trans*-sobrerol, canfeno,  $\beta$ -pineno y pinocarveol, siendo el producto mayoritario el  $\alpha$ -terpineol, y la verbenona el compuesto de mayor valor agregado. En estos casos, la concentración de los productos obtenidos se vio

influenciada por la fase de crecimiento del hongo, por la forma de adicionar el sustrato al medio (puro o disuelto en etanol) y por la concentración de sustrato.

♣ Las cepas *Rhodococcus opacus* DSM 44313 y *Aspergillus niger* DSM 821 llevaron a cabo la biotransformación de geraniol y de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, produciendo compuestos con importantes aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística, sin embargo, los rendimientos de los productos fueron bajos.

## RECOMENDACIÓN

Llevar a cabo la biotransformación de geraniol y de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno utilizando la cepa *Rhodococcus opacus* DSM 44313, enfocada hacia la producción de ácido geránico y *cis*-verbenol, así como la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando la cepa *Aspergillus niger* DSM 821 para producir verbenona, en las condiciones seleccionadas pero a un volumen superior, de manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción sea mayor, debido a que los productos de valor agregado obtenidos en estos procesos corresponden a la inserción de uno o dos átomos de oxígeno en el sustrato, y la eficiencia de las biotransformaciones puede verse limitada por una concentración insuficiente de oxígeno.

## BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, A.; DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE KIMPE, N. Biotransformation of **(R)-(+)** y **(S)-(-)**-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of culture conditions. *Food Chem.* **2003**; *80*: 525-534.

AGRAWAL, R.; JOSEPH, R. Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells os *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**; *53*: 335-37.

ANCEL, J.E.; et al. Kinetic peculiarities of  $\alpha$ -pinene oxidation by molecular oxygen. *Appl. Catal. A: Gen.* **2004**; *272*: 109-114.

AQUINO, F.; BONRATH, W.; CREVATIN, A. Process for the preparation of methylheptenone. **2008**. US. P. 7.319.172.

BARBIRATO, F.; et al. The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases. *FEBS Lett.* **1998**; *438*: 293-296.

BARRERA, R.J.; et al. Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona. *Ingeniería y Competitividad.* **2008**; *10*(1):43-63.

BEST, D.J.; et al. Initial enzymatic steps in the degradation of *alpha*-pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis.* **1987**; *1*: 147-59.

CASTELLANOS, F.E.; PEREA, A, ORTIZ, C.C. Biotransformación de  $\alpha$ -pineno empleando *Aspergillus niger*. *Scientia et Technica.* **2001**; *33*: 71-74.

CHATTERJEE, T. Biotransformation of geraniol by *Rhodococcus* sp. strain GR3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**; 39: 303-306.

COLLU, G.; et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* **2001**; 508: 215-20.

COLOCOUSI, A.; SAQIB, K.M.; LEAK, D.J. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 defective in the catabolism of  $\alpha$ -pinene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**; 45: 822-30.

DA SILVA, J.G.; et al. Rhodium Catalyzed hydroformylation of Linalool. *Appl. Catal. A: Gen.* **2006**; 309: 169-176.

DE CARVALHO, C.C.R.; DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* **2006**; 24: 134-142.

DE CARVALHO, C.C.R.; DA FONSECA, M.M.R. Towards the bio-production of *trans*-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2003**; 14: 3925-3931.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; BELLEGHEM, K.V.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry.* **2001**; 57: 199-208.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; BELLEGHEM, K.V.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry.* **2001**; 57: 199-208.

DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2001**; *11*: 265-570.

DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N.; HERRERA, M.C. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surfaces cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry.* **2000**; *55*: 363-373.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE POOTER, H.L. Biotransformation of citral and nerol by spores of *Penicillium digitatum*. *Flav. Fragr. J.* **1998**; *13*: 173-176.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; DE POOTER, H.L. Biotransformation of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry.* **1996**; *41*: 1079-1082.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)- citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *J. Chrom. A.* **2004**; *1027*: 137-146.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; WILLEMEN, H.M. Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry.* **1998**; *47*: 1029-1036.

DIVYASHREE, MS.; GEORGE, J.; AGRAWAL, R. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *J. Food Sci. Tech.* **2006**; *43(1)*: 73-76.

EMBER, George. Preparation of 6-methyl-5-hepten-2-one. **1973**. US. P. 3.864.403.

FAROOQ, A.; et al. Biotransformation of (-)- $\alpha$ -Pinene by *Botrytis cinerea*. *Z Naturforsch.* **2002**; *57*: 686-90.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Tr. Food Sci. Tech.* **2008**; *19*: 156-164.

FLITSCH, S.L.; et al. Biohydroxylation reactions catalyzed by enzymes and whole cell systems. *Bioorg. Chem.* **1999**; *27*: 81-90.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* **2005**; *23*: 471-499.

GIRI, A.; et al. Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **2001**; *19*: 175-199.

HALDER, N.; FRICK, H. Preparation of methylheptenone. **1973**. US. P. 3.911.019.

HAMADA, H.; et al. Biotransformation of geraniol, nerol and (+)-and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry.* **1997**; *44(4)*: 615-621.

HAYAISHI, O. 2004. Oxygenases. In: Lennarz, W.J., Lane, M.D. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press, Amsterdam. **2004**; *3*: 178-182.

HIRATA, T.; et al. Introduction of oxygenated functional groups into 3-carene and 2-pinene by cultured cells. *Phytochemistry.* **1994**; *37(2)*: 401-403.

KRILL, S.; KRETHZ, S.; SCHNEIDER, A. Preparation of 6-methylheptanone. **2003**. US. P. 6.605.746.

LARKIN, J.M.; KULAKOV, L.A.; ALLEN, C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**. 16: 282-290.

LIMBERGER, R.P. Chemical composition of essential oil from Myrciinae (Myrtaceae) and terpenoids biotransformation. *Caderno de Farmácia*. **2001**; 118: 34-35.

LIMBERGER, R.P.; et al. Bioconversion of (+)-and (-)-alpha-pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**; 10(4): 500-507.

LINDMARK, M.; et al. Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *J. Biotechnol.* **2004**; 107: 173-184.

LINDMARK, M.; et al. Transformation of  $\alpha$ -Pinene using *Picea abies* suspension culture. *J. Nat. Prod.* **2003**; 66: 337-343.

LOYOLA, V.; et al. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. **2004**; 48: 67-94.

MADYASTHA, K.M.; KRISHNA, N.S.R. Transformations of acetates of citronellol, geraniol and linalool by *Aspergillus niger*: regiospecific hydroxylation of citronellol by a cell-free system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**; 28: 324-329.

MAKSIMCHUK, N.V.; MELGUNOV, M.S.; MROWIEC-BIALON, J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based allylic oxidation of  $\alpha$ -pinene over different single site catalysts. *J. Catal. A: Gen.* **2005**; 235: 175-183.

MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)- $\alpha$ -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chem.* **2007**; 101: 345–350.

NAGAKI, M.; et al. Biotransformation of prenyl alcohols by cultured cells of *Cucurbita maxima*. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2007**; 47: 33-36.

ONKEN, J.; BERGER, R.G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J. Biotechnol.* **1999**; 69: 168-168.

PESCHECK, M.; et al. Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp. by use of a closed gas loop bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2009**; 36-827-36.

PINHEIRO, L.; MARSAIOLI, A.J. Microbial monooxygenase applied to fragrance compounds. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2007**; 44: 78-86.

RAVID, U.; et al. Identification of (1R)(+)-verbenone in essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. *Flav. Frag. J.* **1997**; 12(2):109-12.

ROMÁN, M.; et al. Synthesis of terpineol from  $\alpha$ -pinene by homogeneous acid catalysis. *Catalysis Today.* **2005**; 107-108: 310-314.

ROZENBAUM, H.F.; et al. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Braz. J. Chem. Eng.* **2006**; 23(03): 273-279.

SANDRI, I.G.; et al. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chem.* **2007**. *103*: 821-828.

SAVITHIRY, N.; et al. Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation.* **1998**; *9*: 337-41.

SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* **2006**; *77(4)*: 279-285.

SCHEWE, H.; HOLTMANN, D.; SCHRADER, J. P450<sub>BM-3</sub>-catalyzed whole-cell biotransformation of  $\alpha$ -pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009**; *83*:849-57.

SCOTT, EB. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med. Mycology.* **2006**; *44*: 17-21.

SELL, Charles. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Cambridge: *The Royal Society of Chemistry.* **2003**. 410 p.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Tr. Biotechnol.* **2005**; *23(4)*: 193-198.

STRAATHOF, A.J.J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**; *13*: 548-556.

TAN, Q.; DAY, D.F. Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to (R)-(+)- $\alpha$ -terpineol. *Proc. Biochem.* **1998**; *33*: 755-761.

TAN, Q.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Proc. Biochem.* 1998; 33: 29-37.

TONIAZZO, G.; et al. Biotransformation of (-)- $\beta$ -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2005; 121: 837-844.

VALADEZ, R.; et al. A membrane bioreactor for biotransformations of hydrophobic molecules using organic solvent nanofiltration (OSN) membranes. *J. Memb. Sci.* 2008; 317: 50-64.

VAN DER GEIZE, R.; DIJKHUIZEN, L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004; 7: 255-261.

VAN DER WERF, M.; BONT, J.A.M.; LEAK, D.J. Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes. *Adv. Biochem. Engin.* 1997; 55: 147-177.

VAN DER WERF, M.; OVERKAMP, K.M.; DE BONT, J.A.M. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. *J. Bacteriol.* 1998; 180(19): 5052-5057.

VAN DER WERF, M.; SWARTS, H.J.; DE BONT, J.A.M. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Env. Microbiol.* 1999; 2092-2102.

VAN DYK, M.S.; VAN RENSBURG, E.; MOLELEKI, N. Hydroxylation of (+)limonene, (-) $\alpha$ -pinene and (-) $\beta$ -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnol Lett.* 1998; 20(4): 431-36.

VANEK, T.; et al. Formation of *trans*-verbenol and verbenone from  $\alpha$ -pinene catalysed by immobilised *Picea abies* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**; 69: 321-25.

VIDYA, C.M.; AGRAWAL, R. Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2003**; 62: 421-22.

WHITEHEAD, I.M.; OHLEYER, E. Process for the production of carboxylic acids from alcohols using *Saccharomyces*. **1997**; US P. 5.599.700.

WOLKEN, W.; VAN DER WERF, M. Geraniol biotransformation – pathway in spores of *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**; 57: 731-737.

YOO, S.K.; DAY, D.F. Bacterial metabolism of  $\alpha$ - and  $\beta$ - pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Proc. Biochem.* **2001**; 36: 925–32.

YOO, S.K.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of  $\alpha$ - and  $\beta$ - pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Proc. Biochem.* **2001**; 36: 925–932.