



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL EFECTO NEGATIVO  
EJERCIDO POR LA GLUCOSA SOBRE LA  
BIOCONVERSIÓN DE LUTEÍNA EN  
COMPUESTOS CON AROMA

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A:**

M. en Ing. **JOSÉ EDUARDO RODRÍGUEZ  
BUSTAMANTE**

Tutor: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mis padres, Eduardo y Patricia, esto no habría sido posible sin ustedes.

## RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Guillermo Gosset Lagarda	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Roberto Arreguín Espinosa, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de purificación y caracterización del sistema enzimático responsable de la ruptura oxidativa de luteína.

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en B. Beatriz Ruiz, de la Biol. Laura Escalante a y del E. en B. Marco Antonio Ortiz

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACyT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis. Asimismo gracias al DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico) tuve la oportunidad de llevar a cabo una estancia de investigación en la Leibniz Universität Hannover bajo la tutoría de los Drs. Holger Zorn y Ralf G. Berger. Se reconoce el apoyo parcial de CONACyT, a través del SNI, y de los programas PAPIIT y PAEP de la UNAM.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rafael Vázquez Duhalt	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Mariano Gutiérrez Rojas	U. A. Metropolitana-Iztapalapa
Suplente	Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Manuel Jiménez Estrada	Instituto de Química, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por su apoyo en todos los sentidos, sus enseñanzas, su tiempo, su paciencia y sobre todo su cariño. Gracias a ustedes logré llegar hasta aquí y concluir este sueño. Los quiero mucho.

Al Dr. Sergio Sánchez, por su asesoría, su apoyo y su confianza.

Al Dr. Roberto Arreguín, por su valiosa amistad.

Al Dr. Eduardo Bárzana, por acompañarme desde hace algunos años en este maravilloso mundo de la biotecnología.

A los miembros del comité tutorial y del jurado del examen doctoral, por sus valiosas observaciones y acertados comentarios.

A los miembros del laboratorio de Microbiología Industrial, por el excelente ambiente de trabajo.

“Quien a los veinte años no es revolucionario no tiene corazón. Quien a los cuarenta sigue siéndolo, no tiene cabeza.”

Joan Manuel Serrat

# CONTENIDO

---

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1 Efecto de glucosa sobre células microbianas	5
1.2 Represión catabólica en bacterias	5
1.3 Represión catabólica en levaduras	6
1.4 Represión catabólica en hongos filamentosos	8
<b>2. Antecedentes</b>	<b>10</b>
2.1 Industria de aromas	10
2.2 Producción biotecnológica de aromas	11
2.3 Obtención de aromas a partir de carotenoides	13
2.4 Producción de compuestos con aroma a tabaco a partir de luteína	15
<b>3. Objetivos e hipótesis</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos particulares	20
3.3 Hipótesis	20
<b>4. Estrategia general</b>	<b>21</b>
<b>5. Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
5.1 Preparación de la luteína	22
5.2 Medios de cultivo	23
5.3 Preservación de las cepas microbianas	23
5.4 Activación de las cepas microbianas	24
5.5 Preinóculos	24
5.6 Cultivo principal	24
5.7 Cinéticas de cultivo	25
5.8 Identificación de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa	26
5.9 Electroforesis en geles de policacrilamida (PAGE)	27
5.10 Zimogramas	28
5.11 Determinación de los parámetros de máxima actividad de ruptura de luteína	29
5.12 Purificación de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa	29
5.13 Secuenciación de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa y comparación con otras secuencias reportadas	30
5.14 Espectro de absorción de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa	30
5.15 Caracterización del producto de reacción de la prueba <i>in vitro</i> , utilizando la enzima purificada	30
5.16 Cultivos de <i>T. asahii</i> empleando una fuente de carbono no represora	31

	<b>Pág.</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>32</b>
6.1 Caracterización del sustrato (luteína) obtenido del extracto óleo de la flor de cempasúchitl	32
6.2 Efecto de glucosa sobre la mezcla microbiana	33
6.3 Efecto de glucosa sobre <i>T. asahii</i>	34
6.4 Efecto de glucosa sobre <i>P. amylolyticus</i>	39
6.5 Efecto de glucosa sobre la ruptura de luteína	40
6.6 Determinación de los parámetros de máxima actividad de ruptura de luteína	45
6.7 Purificación de la enzima responsable de la degradación de luteína y sensible al efecto negativo de glucosa	46
6.8 Caracterización del producto de reacción del ensayo <i>in vitro</i> , utilizando la enzima purificada	51
6.9 Caracterización parcial de la enzima responsable de la degradación de luteína y sensible al efecto negativo de glucosa	52
6.10 Efecto de una fuente no represora sobre <i>T. asahii</i> y la ruptura de luteína	55
<b>7. Discusión y conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>64</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>65</b>
<b>Anexos</b>	<b>73</b>
Anexo 1: Artículos publicados durante la realización del proyecto doctoral	73
Anexo 2: Medios de cultivo empleados en el trabajo experimental	112



## RESUMEN

---

Además de sus funciones en fotosíntesis, fotoprotección y nutrición, los carotenoides son considerados importantes precursores de varios productos, tales como retinoides, hormonas de plantas y aromas. Generalmente los compuestos con aroma son norisoprenoides de 13 átomos de carbono entre los que se encuentran las iononas, las damasconas y los teaspiranos. La obtención de estos compuestos a partir de carotenoides puede darse mediante dos mecanismos: (1) ruptura no específica y no enzimática por auto-oxidación, foto-oxigenación o degradación térmica, y (2) ruptura específica catalizada por enzimas, principalmente sistemas de oxigenasas.

La generación de compuestos presentes en el aroma a tabaco a través de la ruptura del oxicarotenoide luteína fue efectuada por la acción conjunta de una levadura (*Trichosporon asahii*) y una bacteria (*Paenibacillus amylolyticus*). En los cultivos mixtos de ambos microorganismos, se encontró una relación inversa entre la concentración inicial de glucosa y el título de los compuestos con aroma, es decir, un efecto negativo ejercido por dicho azúcar. Con la finalidad de identificar al organismo sensible al efecto de glucosa, se trabajó con los organismos de manera separada. La presencia de glucosa suprimió la producción de la  $\beta$ -ionona en cultivos de *T. asahii* crecidos con luteína; sin embargo, la biotransformación de la ionona en sus derivados reducidos (7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol) por acción de *P. amylolyticus* no se vio afectada. Estos resultados señalaron a la ruptura de luteína como el blanco del efecto de glucosa. Por otra parte, también se observó que el crecimiento de la levadura resultaba fuertemente inhibido por la presencia de la ionona, lo que traía como consecuencia un decremento en la síntesis del aroma. Para superar dicho problema, se diseñó un sistema que permitiera la remoción del producto hacia la fase gaseosa, para después recuperarlo por adsorción, empleando un material mesoporoso de sílice.

Al enfocarse a la actividad enzimática responsable de la ruptura de carotenoides se decidió probar *in vitro* la degradación de luteína utilizando extractos de proteína y filtrados proteicos libres de células, ambos obtenidos de cultivos de *T. asahii*. Los resultados derivados mostraron que tal actividad se encontraba extracelularmente y sólo fue detectada en los sobrenadantes provenientes de células de levadura crecidas en ausencia de glucosa. Más que una inhibición o un mecanismo que afecte la secreción de la enzima, se piensa que el efecto negativo del azúcar sobre la ruptura del oxicarotenoide se deba a un nivel regulatorio por

represión catabólica por carbono ya que la glucosa representa una fuente más fácilmente metabolizable comparada con la luteína. A continuación se siguió una metodología para el aislamiento de la enzima con dicha actividad y susceptible al efecto de glucosa, alcanzando un rendimiento del 27% con un factor de purificación de 287. Esta proteína exhibió un alto grado de similitud con peroxidasas de hongos, particularmente basidiomicetos, las cuales han sido estudiadas principalmente por su papel en la degradación de lignina. En concordancia con nuestros hallazgos, se ha reportado que las peroxidasas de los hongos *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sapidus* y *Marasmius scorodoni* poseen la capacidad de romper carotenoides. Asimismo, diferentes especies del género *Trichosporon* han sido descritas por su papel en la degradación de lignocelulósicos.

Finalmente, con el objetivo de profundizar nuestro conocimiento sobre el efecto de glucosa, se probó una fuente de carbono no promotora de la represión catabólica, como es el caso de glicerol. A pesar de que el crecimiento de la levadura resultó beneficiado con la adición del glicerol, no se encontró diferencia alguna en el valor calculado para la actividad específica de ruptura de luteína en los sobrenadantes derivados de cultivos de *T. asahii* crecidos en ausencia o presencia de esta fuente de carbono. Lo anterior reforzó nuestra propuesta de que un mecanismo de represión catabólica por carbono esté involucrado en el proceso de bioconversión del carotenoide.

## SUMMARY

---

In addition to their functions in photosynthesis, photoprotection and nutrition, carotenoids are considered to be important precursors of various products, such as retinoids, plant hormones and aromas. Generally the compounds with aroma are C<sub>13</sub>-norisoprenoids, among which, ionones, damascones, and theaspiranes represent the most commonly found in nature. The obtention of these compounds from carotenoids may proceed via two mechanisms: (1) non-specific and non-enzymatic cleavage (auto-oxidation, photo-oxygenation, or thermal degradation), and (2) specific cleavage catalyzed principally by oxygenase systems.

Compounds from the tobacco aroma note were generated via the cleavage of the oxicarotenoid lutein by the combined action of a yeast (*Trichosporon asahii*) and a bacterium (*Paenibacillus amylolyticus*). In mixed cultures, an inverse correlation between the initial glucose concentration and the titer of aroma compounds was found. In order to identify the organism sensitive to the glucose effect, both the yeast and the bacterium were cultivated separately. The presence of glucose suppressed the production of  $\beta$ -ionone by *T. asahii* grown with lutein. However, the biotransformation of the ionone into its reduced derivatives (7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol) by the action of *P. amylolyticus* was not affected by the sugar. These findings signaled lutein cleavage, as the target of the glucose effect. It was also observed that the ionone strongly inhibited yeast growth and therefore, constrained the synthesis of the aroma. Growth inhibition was overcome by using a mesoporous silicate material as a sorbent device in a fermentation system that allowed product removal from the culture medium by headspace manipulation.

*In vitro* studies with crude extracts and concentrated cell-free medium, both obtained from *T. asahii* cultures, showed that the carotenoid breakdown enzymatic activity was located extracellularly and only detected in supernatants from yeast cells grown in the absence of glucose. Rather than an inhibition or a mechanism affecting the enzyme secretion, the sugar effect on lutein degradation comprised another regulatory level, presumably, carbon catabolite repression, as glucose represents a preferred carbon source compared to lutein. Further experiments enabled the isolation of the enzyme responsible for carotenoid breakdown and susceptible to the sugar effect attaining a 27% yield and a purification factor of 287. This protein exhibited a high degree of identity to fungal peroxidases, particularly

from basidiomycetes, studied as well for their involvement in lignin degradation. Supporting our findings, carotenoid cleaving activity has been reported in peroxidases from the fungi *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sapidus*, and *Marasmius scorodoni* and different *Trichosporon* species have been described for their role in lignocellulosics degradation.

Finally, in order to deepen our knowledge on the effect of glucose over lutein cleavage, a non-repressive carbon source, such as glycerol, was assayed. Even though the yeast growth resulted benefited by glycerol, no difference was observed in the calculated specific activities for the enzymatic cleavage of carotenoids from supernatants derived from *T. asahii* cultures grown in the absence or the presence of glycerol. This reinforced our proposal that a carbon catabolite repressive mechanism might be involved in the bioconversion process.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Efecto de glucosa sobre células microbianas

En los sistemas microbianos, todo proceso metabólico se encuentra sujeto a alguna forma de regulación que permita asegurar los niveles adecuados de cada metabolito, evitando así gastos de energía innecesarios. La glucosa representa un nutriente ubicuo en procariontes y eucariontes, que en términos generales, al ser la fuente de carbono y de energía preferida por la mayoría de las células, el uso de otras fuentes de carbono más complejas se encuentra regulado por ésta. Para el caso de microorganismos, al encontrarse presentes dos o más fuentes de carbono en el medio y una de ellas (en general la glucosa) es preferentemente utilizada, el uso secuencial de las mismas se garantiza mediante la represión de la síntesis de enzimas catabólicas alternativas. A dicho fenómeno se le conoce como represión catabólica por fuente de carbono (RCC) y puede definirse como la inhibición de la expresión genética originada por la presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables que permiten un crecimiento más rápido (Ronne, 1995; Saier, 1996; Gancedo, 1998; Carlson, 1999; Stülke y Hillen, 1999; Deutscher *et al.*, 2006). A continuación, se describen brevemente los aspectos más relevantes de la RCC en distintas células microbianas.

## 1.2 Represión catabólica en bacterias

En células bacterianas, la RCC representa una de las formas de regulación más importante, ya que del 5 al 10% de todos los genes bacterianos se encuentran sujetos a ella (Görke y Stülke, 2008). La represión catabólica por carbono es un proceso complejo, regulado a través de varios mecanismos, siendo el sistema de fosfotransferasas dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) de Enterobacteriaceae (*Escherichia* y *Salmonella*) y Firmicutes (*Bacilli*, *Staphylococci* y *Lactobacilli*), uno de los más estudiados (Deutscher, 2008). Mediante la fosforilación en cadena de proteínas, partiendo de fosfoenolpiruvato (PEP) como el donador del grupo fosfato [Fig. 1.1], el PTS transporta numerosos carbohidratos, dependiendo del estado energético de la célula. Para el caso de Enterobacteriaceae, el sensor central de la RCC es la proteína específica para glucosa EIIA, la cual en presencia de glucosa o de otros sustratos del PTS, pasa su grupo fosfato al azúcar. Esta proteína, al estar fosforilada, activa a la adenilato ciclasa (AC), responsable de la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), molécula que a su vez dicha molécula se une a la proteína



(Gancedo, 1998). Además, las fuentes de carbono fermentables como el caso de la glucosa son metabolizadas mediante la glicólisis y el piruvato derivado de ello puede ser metabolizado a través del ciclo de Krebs. Sin embargo, en levaduras, esto no tiene lugar ya que las funciones mitocondriales se encuentran reprimidas por glucosa e incluso, en las células crecidas en este azúcar las mitocondrias están casi ausentes, por lo cual, el piruvato es descarboxilado y reducido a etanol. Una vez que la glucosa ha sido consumida, la producción de enzimas mitocondriales comienza y el etanol será metabolizado, dándose también una transición entre glicólisis y gluconeogénesis (Ronne, 1995).

El organismo modelo de represión catabólica en levaduras ha sido *Saccharomyces cerevisiae* aunque también se han hecho estudios en *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis* (Flores *et al.*, 2000). El sistema de regulación de *S. cerevisiae* se encuentra constituido por sensores (transportadores de hexosas, Hxt), activadores para el uso de otras fuentes de carbono (Gal4, complejo proteico Hap, Mal63, etc.) represores (Mig1) y elementos intermedios (complejos Snf1 y Glc7/Reg1). En la figura 2.2 se esquematiza el fenómeno de represión catabólica en levaduras (Gancedo, 1998). Para que la glucosa ejerza su papel regulatorio se requiere su fosforilación, la cual es catalizada por tres cinasas: la glucocinasa (Glc1) y las hexocinasas (Hxk) 1 y 2; sin embargo, la represión por glucosa necesita específicamente a Hxk2, proteína que transmite la señal del azúcar. El sensor central de la RCC en levaduras es el complejo Snf1, conformado por tres proteínas: Snf1, Brp y Snf4. En altas concentraciones de glucosa, los dominios catalítico (DC) y regulatorio (DR) de Snf1 interaccionan, anulando la actividad de cinasa del complejo. Por otro lado, en ausencia de glucosa, Snf4 interacciona con el DR de Snf1, con lo cual, la actividad de cinasa se conserva y el represor Mig1 puede ser fosforilado, manteniendo su localización en el citoplasma. Mig1 es una proteína de unión a DNA con dedos de zinc (Cis<sub>2</sub>His<sub>2</sub>) que al estar desfosforilada, por acción de la fosfatasa Glc7/Reg1, posee una localización nuclear y reprime la transcripción de genes involucrados en la utilización de otras fuentes de carbono. Homólogos de esta proteína han sido encontrados en *K. lactis* (Cassart *et al.*, 1995), *C. utilis* (Delfin *et al.*, 2001) y *Schwanniomyces occidentalis* (Carmona *et al.*, 2002). Estudios recientes han mostrado que en el núcleo, Hxk2 es capaz de unirse a Mig1, lo que refuerza su capacidad represora al impedir que la RNA polimerasa se pegue al promotor del gen regulado (Gancedo, 2008).

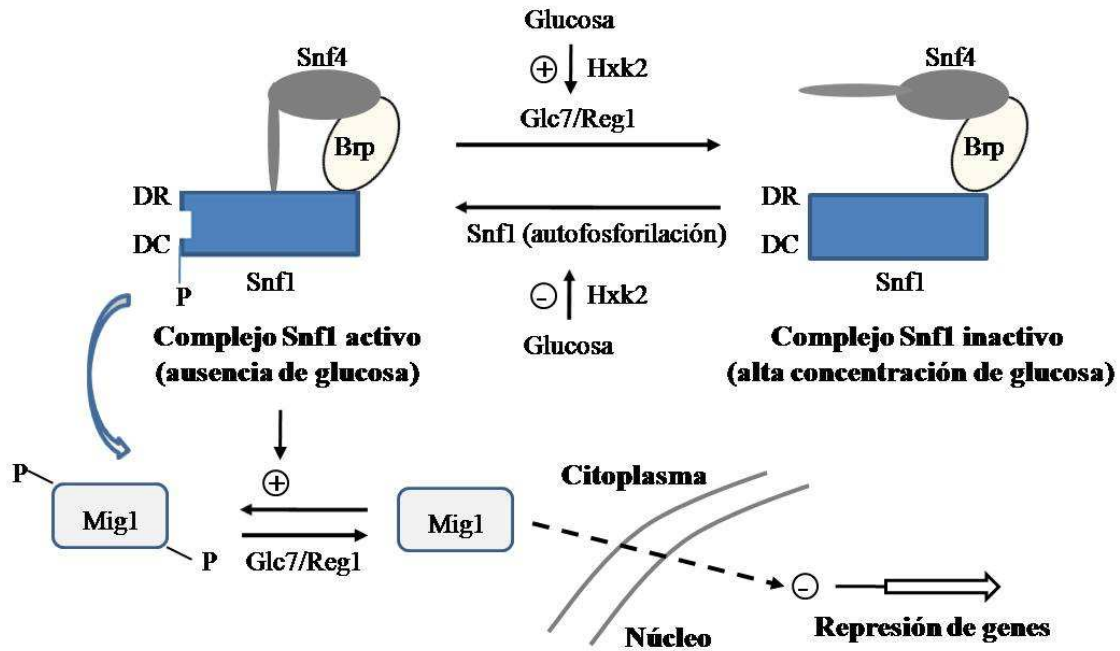


Fig. 1.2 Esquema de represión catabólica en *S. cerevisiae* (Gancedo, 1998)

#### 1.4 Represión catabólica en hongos filamentosos

El ajuste del catabolismo de fuentes de carbono, de acuerdo a las condiciones prevalecientes, responde también al fenómeno de represión catabólica, denominado por muchos autores para el caso de hongos filamentosos, como represión por carbono (Ronne, 1995; Ruijter y Visser, 1997). En muchos ascomicetos, la represión por glucosa se encuentra mediada por el factor CreA, siendo *Aspergillus nidulans* el organismo sobre el cual se han realizado mayores estudios sobre este mecanismo (Aro *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2008). De manera análoga a Mig1 en levaduras, CreA es una proteína con motivos de unión a DNA tipo dedos de zinc ( $Cis_2His_2$ ). Además de *A. nidulans* (Dowzer y Kelly, 1989), homólogos de este represor han sido encontrados en *A. niger* (Drysdale *et al.*, 1993), *Trichoderma reesei* (Strauss *et al.*, 1995; Takashima *et al.*, 1996), *Humicola grisea* (Takashima *et al.*, 1998), *Sclerotinia sclerotiorum* (Vautard *et al.*, 1999), *Gibberella fujikuroi* y *Botrytis cinerea*, (Tudzynski *et al.*, 2000) y *Cochliobolus carbonum* (Tonukari *et al.*, 2003).

El catabolismo de etanol, en *A. nidulans*, ha sido ampliamente investigado [Fig. 1.3] (Felenbok *et al.*, 2001). El alcohol puede ser empleado como fuente de carbono vía su conversión a acetaldehído por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente, la subsecuente transformación de este compuesto en acetato por la enzima



aldehído deshidrogenasa (ALDH). El acetato puede entrar a metabolismo central al convertirse en acetil-CoA gracias a la acetil-CoA sintetasa (ACS). En presencia de fuentes de carbono fácilmente metabolizables como la glucosa, el represor CreA impide la transcripción de los genes *alcA*, que codifica para la ADH, y *alcR*, el cual codifica para la proteína activadora AlcR. Sólo en ausencia de glucosa y en presencia de un coinductor, AlcR es capaz de activar su propia transcripción y la de los genes *alcA* y *aldA*, que codifica para la ALDH.

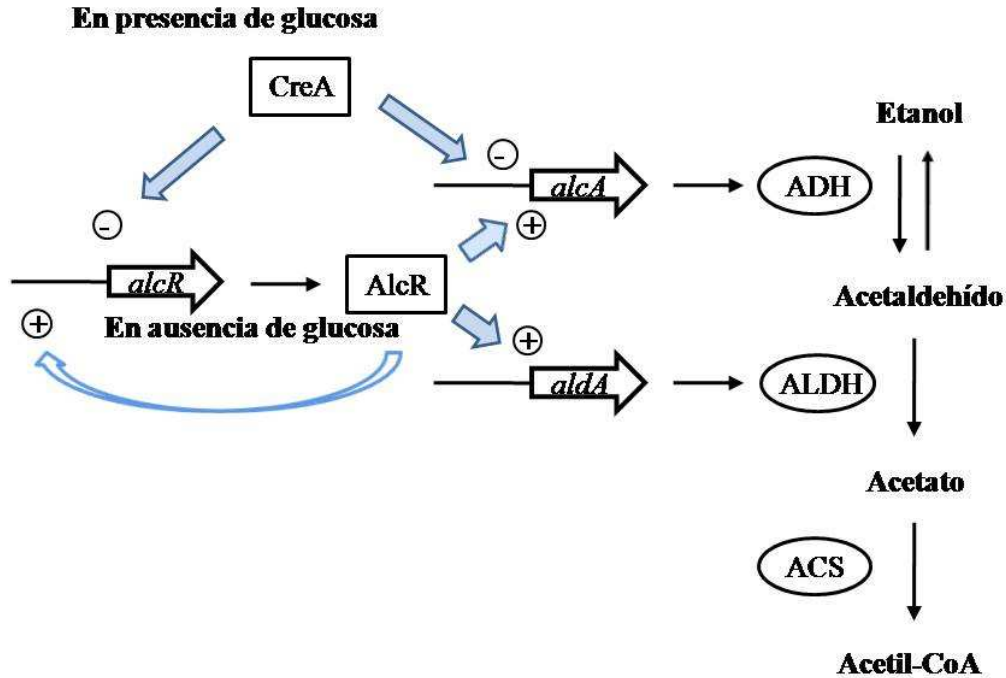


Fig. 1.3 Esquema para el catabolismo de etanol en *A. nidulans* (Felenbok, et al., 2001)

Se ha visto que varias enzimas responsables de la degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas (celulosa, hemicelulosa y pectina) están reguladas por proteínas Cre en especies de *Aspergillus* y en *T. reesei* (Aro et al., 2005). La lignina, otro componente de paredes celulares de plantas, es un polímero fenólico degradado por basidiomicetos responsables de la podredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera* sp. y *P. eryngii*). Hasta ahora, no han sido clonados genes *cre* de ningún basidiomiceto e incluso, en el genoma de *P. chrysosporium* no se ha encontrado ningún posible homólogo a la proteína CreA de *A. nidulans*. Se sabe que los genes que codifican para enzimas ligninolíticas, en general no se expresan durante el crecimiento en glucosa; sin embargo, el mecanismo de RCC en estos hongos falta por estudiarse y representa un campo completamente nuevo.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 Industria de aromas

El uso de sustancias olorosas con diferentes fines (placenteros, religiosos o medicinales) es tan antiguo como la humanidad misma (Guentert, 2007). La preparación de sabores y aromas provenientes de fuentes naturales (plantas o animales), a nivel artesanal, comenzó desde la antigüedad, obteniendo primordialmente una enorme variedad de compuestos (Serra *et al.*, 2005; Longo y Sanromán, 2006). El aislamiento de benzaldehído y cinamaldehído, la producción de cumarina y, principalmente, la síntesis química de la vainillina (Krings y Berger, 1998) marcaron el inicio de la industria de aromas. La estructura de esta industria resulta relativamente complicada debido a la falta de homogeneidad dentro de la misma; sin embargo, en términos generales puede ser dividida en tres sectores (Somogyi, 1996):

- Aceites esenciales y extractos naturales, los cuales se definen como materiales aromáticos obtenidos de fuentes vegetales o animales
- Compuestos químicos con aroma, que son compuestos orgánicos cuya estructura química es definida y su producción se lleva a cabo mediante síntesis o bien, por aislamiento de los aceites esenciales
- Fragancias formuladas, definidas como mezclas complejas de materiales aromáticos (más de 100 constituyentes) tales como aceites esenciales y sus derivados naturales, así como aromas sintéticos

El consumo de sabores y aromas en el 2003 fue estimado en 15 billones de dólares, mientras que en el 2007 fue valuado en 19 billones de dólares (Leffingwell y Asociados, 2008). Debido al tamaño del mercado y a la creciente demanda de los mismos, calculada entre un 5 y 6% anual (Somogyi y Kishi, 2001), la búsqueda de nuevas tecnologías para la producción de aromas y el mejoramiento de procesos ya establecidos, continúan siendo dos de los puntos principales dentro de la investigación y el desarrollo de dicha industria. A pesar de que la producción de materias primas para la elaboración de fragancias ha sido dominada por los fabricantes europeos, la incursión de compañías norteamericanas y japonesas en este

rubro ha tenido cabida. Hoy en día existen 10 compañías internacionales que participan de manera significativa en el mercado de ventas [Tabla 2.1].

*Tabla 2.1 Ventas estimadas en 2003 y 2007 de las principales compañías fabricantes de aditivos que proporcionan sabor y aroma (tomado de Leffingwell y Asociados, 2008)*

<b>COMPAÑÍA</b>	<b>Ventas en 2003 (mdd)</b>	<b>% del total de ventas</b>	<b>Ventas en 2007 (mdd)</b>	<b>% del total de ventas</b>
<b>Givaudan</b>	2,194	14.3	3,647	18.3
<b>Firmenich</b>	1,597	10.4	~2,627	13.2
<b>IFF</b>	1,901	12.3	2,277	11.4
<b>Symrise</b>	1,462	9.5	1,861	9.3
<b>Takasago</b>	898	5.8	1,112	5.6
<b>Sensient flavors</b>	452	2.9	~572	2.9
<b>Mane SA</b>	310	2.0	449	2.3
<b>T. Hasegawa</b>	434	2.8	448	2.3
<b>Frutarom</b>	139	0.9	368	1.8
<b>Robertet SA</b>	255	1.6	352	1.7
<b>SUBTOTAL</b>	<b>9,642</b>	<b>62.5</b>	<b>13,713</b>	<b>68.8</b>
<b>Otras</b>	5,745	37.5	6,197	31.2
<b>TOTAL</b>	<b>15,387</b>	<b>100.0</b>	<b>19,910</b>	<b>100.0</b>

## 2.2 Producción biotecnológica de aromas

En las últimas décadas, todo producto relacionado con lo “natural” y recientemente, lo etiquetado como “orgánico” poseen una preferencia del consumidor debido a su asociación con la buena salud. De acuerdo a legislaciones norteamericanas y europeas, el término “saborizante natural” se aplica a cualquier sustancia (aceite esencial, oleorresina, esencia o extracto, destilado o hidrolizado de proteína) derivada de fuentes vegetales, animales o microbianas mediante procesos físicos, microbiológicos o enzimáticos, cuya función primordial es la de ser aditivo (EC, 1988; CFR, 1990). Además de conferir la categoría de “naturales”, la producción biotecnológica de compuestos con aroma ofrece numerosas ventajas (Krings y Berger, 1998; Longo y Sanromán, 2006):

- Independencia de la agricultura y pérdidas potenciales ocasionadas por las condiciones locales de producción, tales como clima, variaciones estacionales, enfermedades, plagas, restricciones de venta e inestabilidad sociopolítica del país donde se produce

- Sistema definido que permite un escalamiento ascendente, garantizando un abastecimiento continuo de materias primas, una eficiente recuperación de los productos, una producción alta y un rendimiento uniforme
- Posibilidad de mejorar los procesos de producción ya sea siguiendo métodos clásicos como el diseño de experimentos o métodos más modernos como la ingeniería metabólica

El enfoque biotecnológico, esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama [Fig. 2.1], comprende tres opciones: (1) cultivos microbianos (Schrader, 2007), (2) cultivos vegetales (Scragg, 2007) o (3) enzimas derivadas de ellos (Menzel y Schreier, 2007), y se lleva a cabo a través de síntesis *de novo* o bioconversiones/ biotransformaciones.

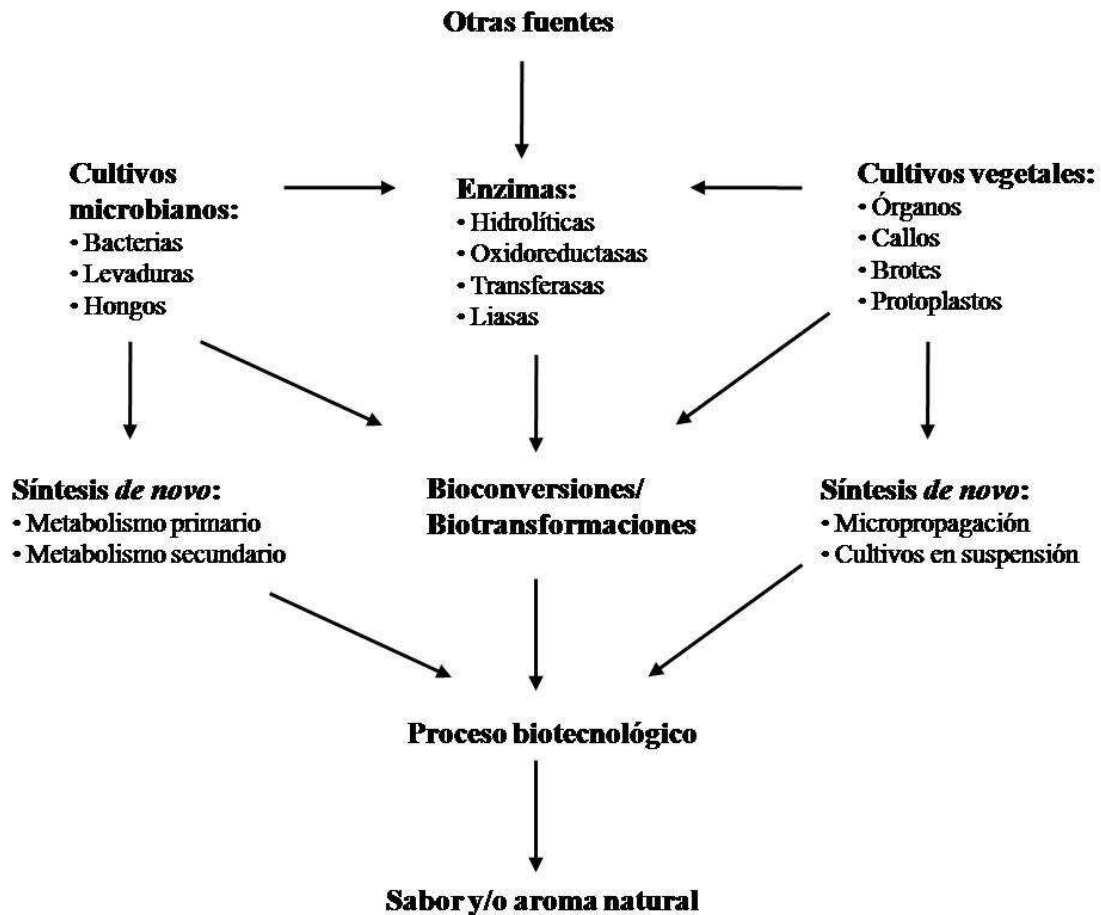


Fig. 2.1 Opciones biotecnológicas (cultivos microbianos, cultivos vegetales o enzimas) y sus respectivas técnicas para la producción de sabores y aromas “naturales”

## 2.3 Obtención de aromas a partir de carotenoides

Los tetraterpenoides de 40 átomos de carbono, conocidos como carotenoides, son los pigmentos naturales más diversos y ampliamente distribuidos en la naturaleza. Tradicionalmente han sido divididos en carotenos, que son compuestos hidrocarbonados, y xantofilas, que son derivados oxigenados de los carotenos (Karnaukhov, 1990). Estos compuestos se encuentran formados por un esqueleto de 8 isoprenos, arreglados mediante la unión de dos unidades de 20 átomos de carbono en forma cabeza-cabeza [Fig. 2.2] (Goodwin, 1993). Con respecto a los extremos de la molécula, los carotenoides pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos; sin embargo, todos contienen una cadena larga de dobles enlaces conjugados en la parte central [Fig. 2.2].

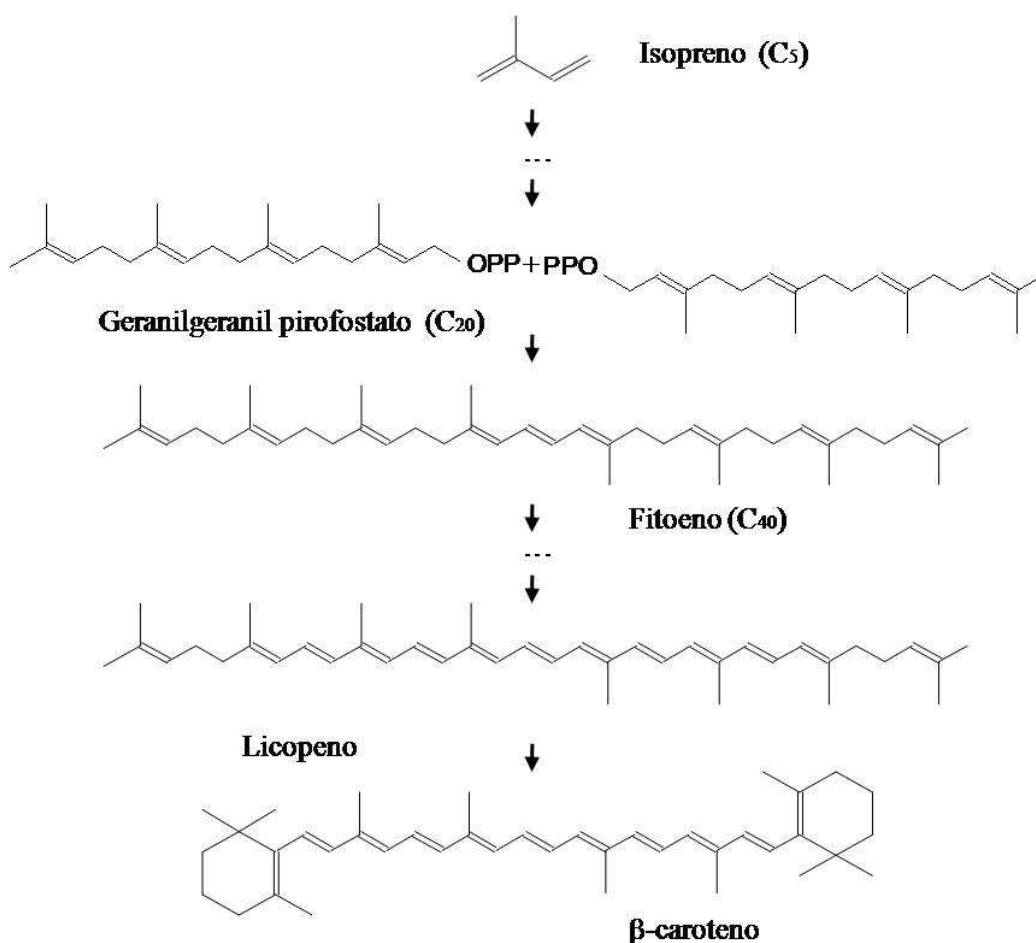


Fig. 2.2 Fórmula química del isopreno, unidad estructural de los carotenoides y síntesis de licopeno y posteriormente, de β-caroteno, a partir de fitoeno, mediante la unión cabeza-cabeza de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato

Además de conferirles una coloración que va del amarillo brillante al rojo intenso, la presencia de dobles enlaces conjugados hace a los carotenoides susceptibles a ruptura oxidativa. Dicha ruptura, la cual involucra oxígeno molecular, los convierte en precursores de diversos compuestos, denominados apocarotenoides, entre los que destacan: los retinoides, las hormonas de plantas y los compuestos con aroma (Kloer y Schulz, 2006). Dependiendo del carotenoide precursor y de la posición en la cual la ruptura oxidativa se lleve a cabo, una enorme diversidad de compuestos con aroma de 9 a 13 átomos de carbono pueden generarse [Fig. 2.3].

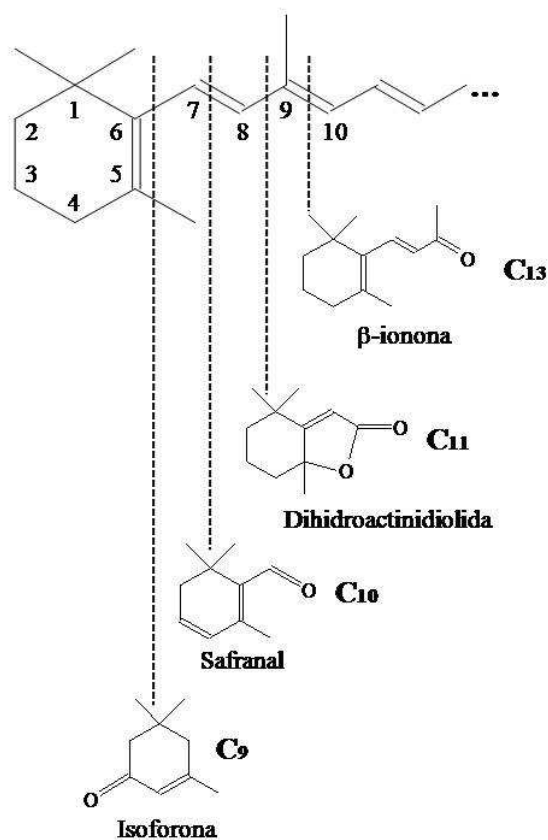


Fig. 2.3 Síntesis de compuestos con aroma, de 9 a 13 átomos de carbono de acuerdo a la posición donde se lleve a cabo la ruptura oxidativa del carotenoide

A partir de carotenoides, la producción de compuestos con aroma puede llevarse mediante métodos enzimáticos (oxidasas y sistemas de oxigenasas) o no enzimáticos (foto-oxigenación, auto-oxidación o degradación térmica) (Winterhalter y Rouseff, 2002). Entre las enzimas cuya función biológica es la ruptura de carotenoides, se encuentran los sistemas de dioxigenasas, de los cuales los correspondientes a plantas han recibido la mayor atención. A

pesar de que la producción microbiana de fragancias en general, ha sido ampliamente estudiada, aún son escasos los reportes referentes a compuestos con aroma derivados de carotenoides por la acción de microorganismos. La capacidad de llevar a cabo la ruptura oxidativa de carotenoides ha sido observada en bacterias, principalmente por la acción de dioxigenasas encontradas en cianobacterias (Jüttner y Höflacher, 1985; Ruch *et al.*, 2005; Marasco *et al.*, 2006; Scherzinger *et al.*, 2006; Scherzinger y Al-Babili, 2008), y en hongos (Zorn *et al.*, 2003a): basidiomicetos (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003; Zorn *et al.*, 2003b; Scheibner *et al.*, 2008), ascomicetos (Prado-Cabrero *et al.*, 2007; Saelices *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009) y zigomicetos (Burmester *et al.*, 2007). Sin embargo, la generación de volátiles a partir de dicho rompimiento, no tiene lugar en todos los casos. Específicamente para basidiomicetos (*P. eryngii*, clasificado erróneamente como *Lepista irina*, y *Marasmius scorodonius*), la acción de peroxidasas sobre la producción de  $\beta$ -ionona a partir de  $\beta$ -caroteno ha sido estudiada (Zorn *et al.*, 2003b; Scheibner *et al.*, 2008). Con el fin de profundizar en este campo, se invita al lector a consultar el artículo de revisión realizado durante los estudios doctorales del autor de esta tesis (Rodríguez-Bustamante y Sánchez, 2007) [Anexo 1.1].

## **2.4 Producción de compuestos con aroma a tabaco a partir de luteína**

En el laboratorio del Dr. Sánchez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, se aislaron 19 colonias microbianas por su habilidad de crecer en luteína como única fuente de carbono. De estas colonias, únicamente dos fueron capaces de formar compuestos volátiles en cultivo sumergido; sin embargo, sólo en una se percibió un fuerte aroma a tabaco (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000). Dicha colonia estaba compuesta por dos microorganismos, una bacteria y una levadura, en una proporción de 100 a 1, respectivamente, identificados en un principio como *Bacillus* sp. y *Geotrichum* sp. (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000) Al reexaminar la taxonomía utilizando la técnica de biología molecular de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), mediante la comparación de secuencias de los genes que codifican para RNA ribosomal, los organismos fueron reclasificados por Marco Antonio Ortiz como *Paenibacillus amylolyticus* para el caso de la bacteria y *Trichosporon asahii* para la levadura. Al seguir en el tiempo la degradación de luteína y la aparición de compuestos volátiles, una posible ruta para la bioconversión del carotenoide fue propuesta (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000) [Fig. 2.4]. En este proceso, la luteína es primeramente deshidroxilada para después se lleve a cabo la ruptura oxidativa entre

los carbonos 9 y 10 del anillo  $\beta$ . En este segundo paso se genera  $\beta$ -ionona, norisoprenoide de 13 átomos de carbono con un olor floral, que es el precursor de los compuestos con aroma a tabaco. A continuación, la ionona es transformada a través de dos reacciones consecutivas de la siguiente manera: (1) reducción del doble enlace entre los carbonos 7 y 8 para formar la 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y (2) reducción del grupo carbonilo para generar el 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol. Al final del proceso cuatro compuestos fueron caracterizados en las siguientes proporciones:  $\beta$ -ionona (9.4%), 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona (3.5%), 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol (84.2%) y 3-hidroxi- $\beta$ -ionona (2.9%); de la aparición de éste último producto no se dio una explicación (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000).

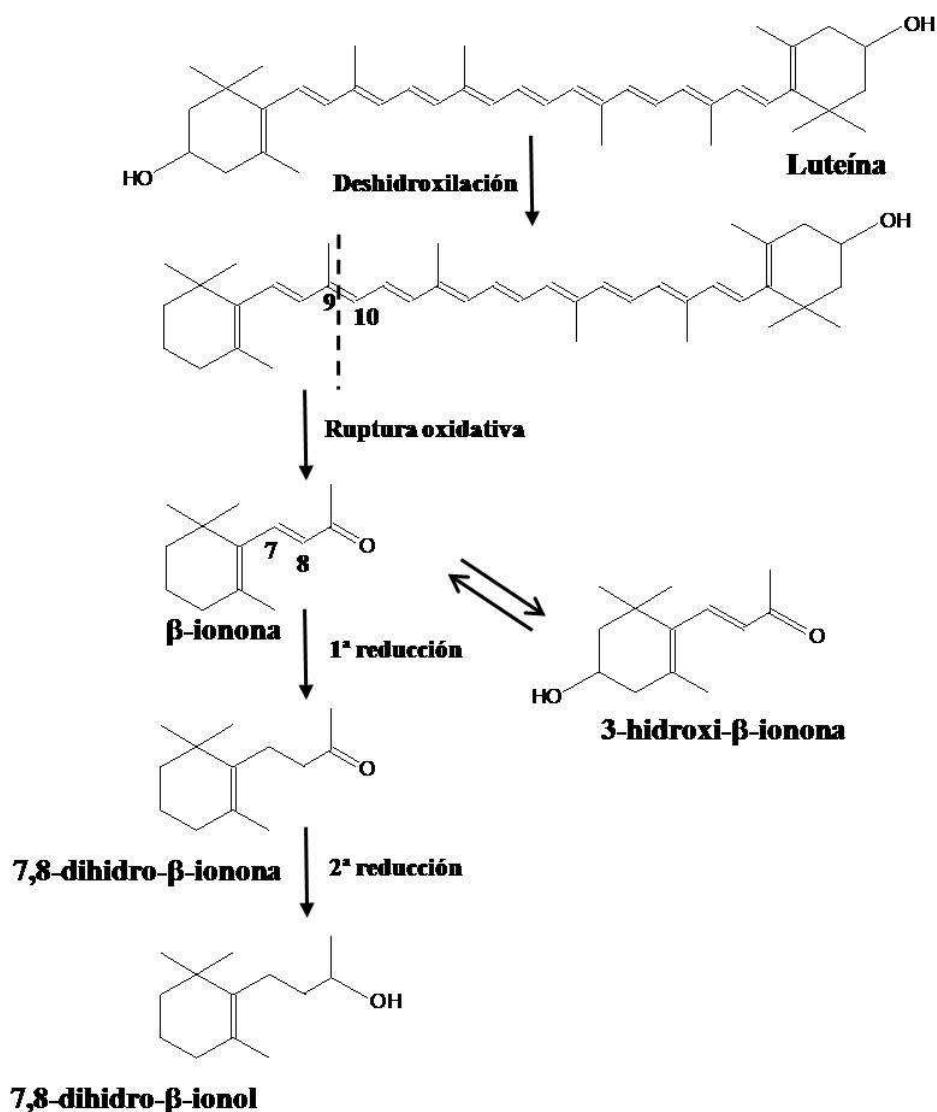


Fig. 2.4 Ruta propuesta para el proceso de bioconversión de luteína en compuestos con aroma a tabaco (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000)



Con el fin de elucidar el papel de cada microorganismo dentro del proceso, la bacteria y la levadura fueron cultivados en forma independiente, teniendo como referencia a la mezcla microbiana (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003). Para la producción de los compuestos con aroma a tabaco la participación de ambos organismos resultó indispensable. En el caso de *T. asahii*, únicamente se encontró  $\beta$ -ionona en cultivos suplementados con luteína; sin embargo, la formación de los productos reducidos de este compuesto no fue detectada. Por otro lado, la producción de  $\beta$ -ionona en cultivos de *P. amylolyticus* nunca fue observada, a diferencia de la síntesis de los compuestos con aroma a tabaco al adicionar la ionona al cultivo bacteriano. De lo anterior se concluyó que el proceso de bioconversión de luteína puede dividirse en dos etapas [Fig. 2.5]:

- La oxidación del carotenoide para la obtención de la ionona, llevada a cabo por la levadura
- La hidrogenación de dicho compuesto para la generación de sus derivados reducidos, de lo cual es responsable la bacteria

En el trabajo realizado por Maldonado-Robledo y colaboradores (2003) no se encontró a la 3-hidroxi- $\beta$ -ionona Cabe mencionar que la  $\beta$ -ionona posee propiedades antimicrobianas (Larroche *et al.*, 1995; Anzaldi *et al.*, 1999), lo cual se corroboró en este estudio para ambos microorganismos (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003). Sin embargo, *T. asahii* mostró ser más susceptible a bajas concentraciones de este compuesto, por lo cual, la asociación entre la bacteria y la levadura resulta de mayor beneficio para esta última. Una vez establecido el papel de *P. amylolyticus* en el proceso, la purificación de la enzima responsable de la transformación de la  $\beta$ -ionona en 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona se llevó a cabo (Maldonado Robledo, 2004). Con esto se apoyó la idea de que para la conversión de la ionona en 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol se requieren dos reacciones de reducción, en las cuales están implicadas dos enzimas diferentes [Fig. 2.5].

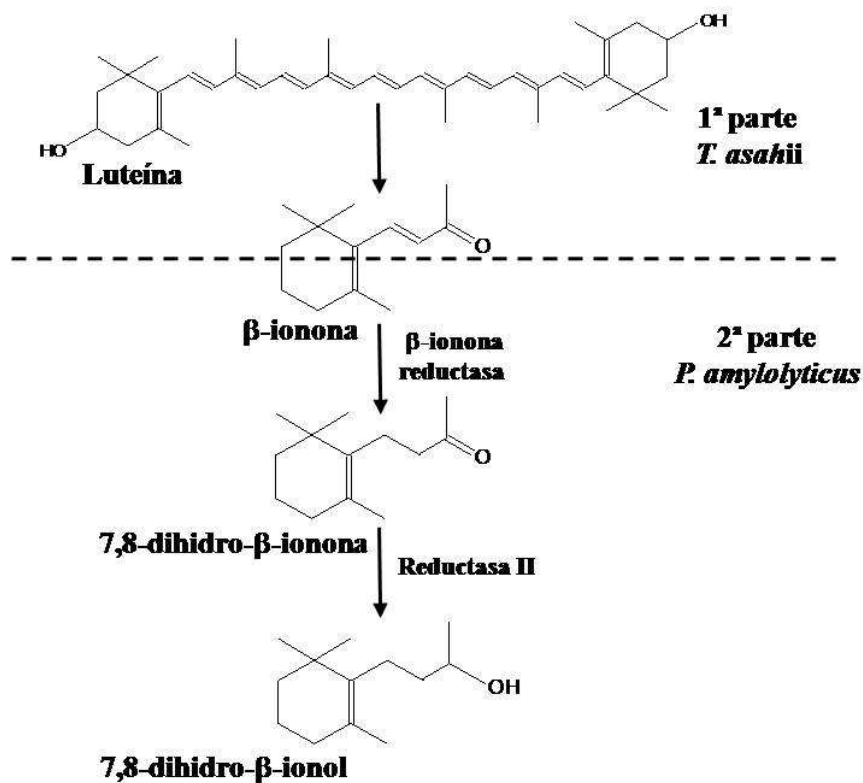


Fig. 2.5 Etapas del proceso de acuerdo al microorganismo (*T. asahii* o *P. amylolyticus*) que las realiza (Maldonado-Robledo et al., 2003), incluyendo a las dos enzimas de la bacteria que participan en la reducción de la  $\beta$ -ionona (Maldonado Robledo, 2004)

Con la finalidad de maximizar la producción de los compuestos con aroma a tabaco, empleando a la mezcla microbiana, se siguió una metodología clásica de diseño de experimentos (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005). Los componentes del medio de cultivo fueron seleccionados como posibles candidatos que ejercieran alguna influencia, positiva o negativa, sobre el proceso, para después aplicar modelos de optimización, específicamente de búsqueda de títulos máximos [Fig. 2.6]. Dicho medio representa una modificación del denominado YTN [Anexo 2] (Dasek *et al.*, 1973) y está compuesto por los siguientes nutrientes: extracto de levadura (Y), triptona (T), cloruro de sodio (N), glucosa (glc) y elementos traza (ET). Para la obtención del aroma, fue indispensable la adición de luteína (L) al medio, antes de que éste fuera inoculado, [Fig. 2.6].

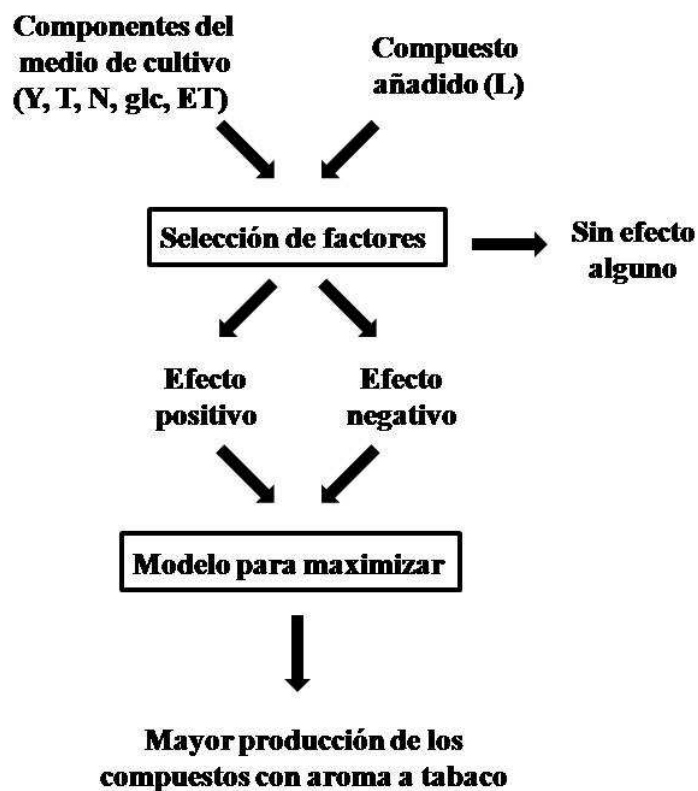


Fig. 2.6 Metodología utilizada para la maximización de la producción de compuestos con aroma (Rodríguez-Bustamante et al., 2005)

Los resultados de este estudio sugirieron la posible existencia de mecanismos de regulación tanto por carbono como por nitrógeno, sobre la producción del aroma a tabaco (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005). Particularmente para el caso de glucosa, se vio que dicho compuesto ejercía un fuerte efecto negativo sobre la bioconversión de luteína, a pesar de su baja concentración con respecto a los demás nutrientes. Dado lo anterior y debido a su importancia fisiológica, tanto en el aspecto nutricional como en el regulatorio, el azúcar fue tratado en forma separada, siguiendo un método clásico de variación de un factor. A medida que la cantidad inicial del azúcar en el medio de cultivo aumentaba, se registraron mayores valores de concentración de biomasa. Sin embargo, con respecto al consumo de luteína y la generación de los compuestos con aroma, se observó una tendencia opuesta: mientras mayor era la concentración inicial de glucosa, tanto la degradación del carotenoide como el título de los productos disminuían (Rodríguez Bustamante, 2005).

## 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

---

### 3.1 Objetivo general

El presente trabajo pretende sentar las bases que permitan comprender el mecanismo, ya sea debido a la inhibición de la actividad de algún sistema enzimático de *T. asahii* y/o de *P. amylolyticus*, o bien por una regulación que actúe a otro nivel, mediante el cual la glucosa ejerce su efecto negativo sobre el proceso de bioconversión de luteína en compuestos con aroma a tabaco.

### 3.2 Objetivos particulares

- Para determinar la existencia de alguna actividad enzimática bajo el efecto de glucosa, primeramente se debe identificar al microorganismo (*T. asahii* o *P. amylolyticus*) sensible a dicha influencia, conociendo así el paso dentro de la ruta de bioconversión del carotenoide afectado por la presencia del azúcar.
- Purificar dicho sistema enzimático y caracterizarlo parcialmente para conocer el tipo de proteína relacionada con este efecto.
- Probar una fuente de carbono distinta a glucosa para saber si el efecto negativo sobre la producción de compuestos con aroma a tabaco es exclusivo de azúcares, los cuales pueden ejercer un fenómeno de represión por carbono.

### 3.3 Hipótesis

Al pensar que la regulación por glucosa se podría deber a un fenómeno de represión catabólica y conociendo que la luteína es utilizada como fuente de carbono, lo más probable es que la actividad enzimática susceptible a dicho efecto sea aquella involucrada en la ruptura del carotenoide, de lo cual es responsable *T. asahii*. Por otra parte, se cree que dicha regulación no se presentaría en *P. amylolyticus* debido a que la  $\beta$ -ionona no se emplea como fuente de carbono y más aún, la conversión de esta molécula en sus derivados reducidos (7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol) podría tratarse de un cometabolismo.

## 4. ESTRATEGIA GENERAL

---

Para llevar a cabo el proyecto doctoral, alcanzar los objetivos propuestos y probar la hipótesis planteada, se desarrolló la siguiente metodología, esquematizada a continuación [Fig. 4.1]:

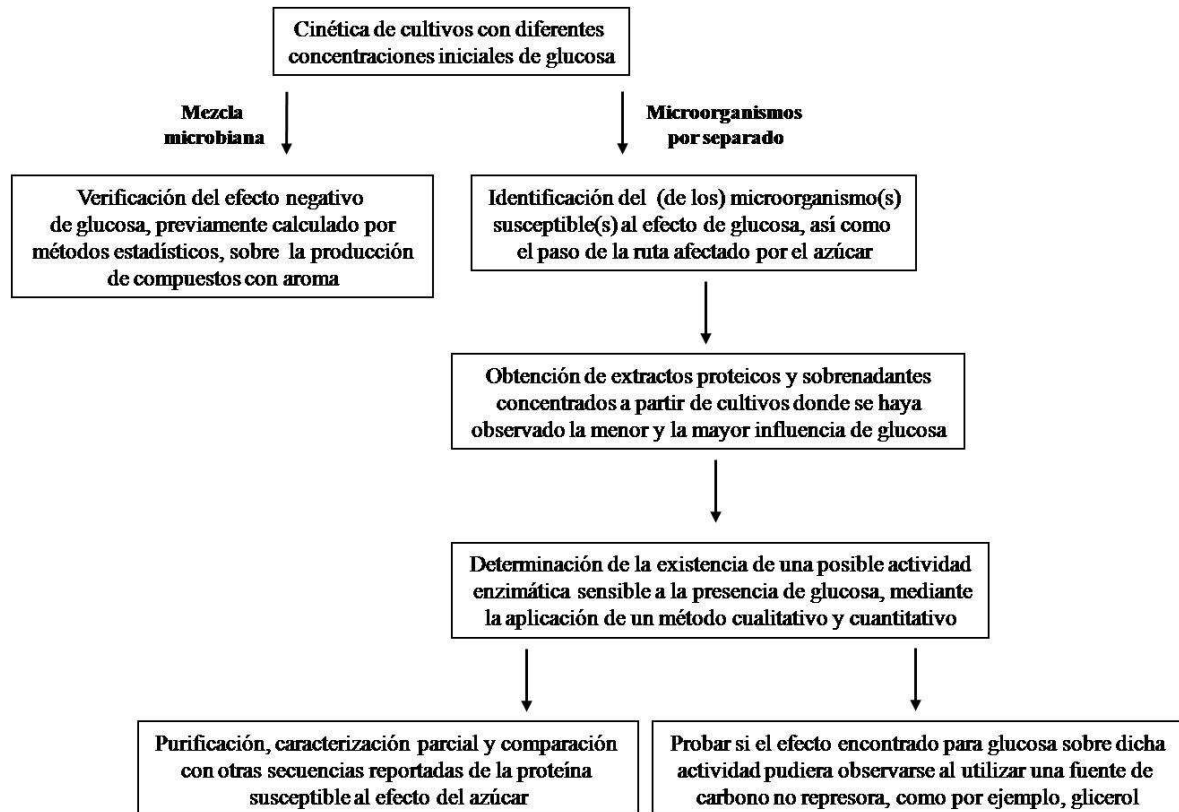


Fig. 4.1 Metodología experimental del presente trabajo

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Artículo experimental derivado del proyecto doctoral

En el artículo escrito por Rodríguez-Bustamante y colaboradores (2009) [Anexo 1.3] se muestran con mayor detalle las metodologías empleadas durante el proyecto doctoral. Asimismo se incluyen los procedimientos no descritos en dicho trabajo.

#### 5.1 Preparación de la luteína

Para utilizar a la luteína como sustrato para el proceso de bioconversión, un extracto óleo de la flor de cempasúchitl (eofc), rico en el carotenoide (89%) y generosamente donado por Industrial Orgánica S.A. de C.V., Nuevo León, México, fue sometido a un tratamiento para desesterificarlo (Rodríguez-Amaya, 2001). Todo el proceso se llevó a cabo en ausencia de la luz para evitar la descomposición de la luteína. 500 mg del eofc fueron completamente disueltos en 100 mL de éter de petróleo y a esta solución se le añadieron tres volúmenes de hidróxido de potasio (KOH) al 10% w/v en metanol. La mezcla se sometió a agitación muy leve a 4°C durante toda la noche para posteriormente transferirla a un embudo de separación de 1-L. El álcali fue retirado lavando varias veces con agua ultra-pura, previamente agitando de manera vigorosa, y a continuación, se esperó a que las fases (acuosa y orgánica) se separaran. La interfase fue desechada, inclusive aunque exhibiera un poco de color anaranjado, y se conservó la fase orgánica que exhibía un color rojo intenso. A esta última se le agregó sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro para quitar el excedente de agua, se filtró (Whatman 40) y a continuación, se transfirió a un matraz bola de 250-mL para remover el solvente (éter de petróleo) mediante el uso de un rotavapor (Jobling Laboratory Division) bajo presión reducida y a 40°C. El material sólido obtenido fue recolectado en un frasco ámbar, pasando una corriente suave de nitrógeno para desplazar el aire. A continuación, el material fue disuelto en 1 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) lo cual fue aplicado empleando un tubo capilar a una cromatoplaqa preparativa (20x20 cm) recubierta con gel de sílice malla 60 Merck y eluída en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetato de etilo (AcOEt) (80/20). Como control se aplicó un estándar de luteína (xantofila de alfalfa, Sigma 70% de pureza) en un extremo de la placa. La luteína del eofc fue detectada como una intensa y abundante mancha amarilla que mostró el mismo registro (Rf) del estándar, procediendo a raspar el segmento de sílice correspondiente al extracto. El carotenoide fue extraído utilizando 10 mL de acetona y

posteriormente 20 mL de una mezcla de éter de petróleo/dietiléter (1:1). La sílice fue retirada por filtración (Whatman 40), colectando la luteína nuevamente en un frasco ámbar, para después eliminar al solvente mediante una corriente suave de nitrógeno.

Con la finalidad de cerciorarse que el material purificado se trataba de un carotenoide, una mínima fracción del mismo fue disuelta en etanol absoluto y su espectro de absorción fue obtenido utilizando un espectrofotómetro UV-Vis 160U Shimadzu equipado con un programa que varía las longitudes de onda ( $\lambda$ ). Dado que varios carotenoides exhiben valores muy parecidos de sus  $\lambda_{\text{max}}$ , el material además fue caracterizado por espectrometría de masas. Esta técnica se llevó a cabo en un aparato acoplado (Hewlett-Packard modelo 5945 A), mediante impacto electrónico ( $\text{EI}^+$ ) para posteriormente compararlo con estándares contenidos en la base de datos de espectros de masa del NIST/EPA/NIH (1992).

## **5.2 Medios de cultivo**

La composición y la preparación de los medios de cultivo empleados en este trabajo se muestra en el Anexo 2. El medio utilizado para la preservación de las cepas microbianas, su activación y los preinóculos fue el YTN formulado por Dasek y colaboradores (1973). Para los cultivos principales, se empleó un medio desarrollado en un trabajo previo, siguiendo una metodología clásica de diseño de experimentos con la finalidad de maximizar la producción de los compuestos con aroma (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005). A este medio de cultivo se le denominó “medio Y mejorado”. De forma simultánea, con la finalidad de evaluar el efecto de glucosa sobre la producción de  $\beta$ -ionona, se probó un medio mínimo para levaduras.

## **5.3 Preservación de las cepas microbianas**

Para preservar las cepas, se emplearon placas de medio YTN sólido. Por separado, los microorganismos (*T. asahii* y *P. amylolyticus*) fueron sembrados por extensión en las placas, incubándolos a 29°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, las cajas se rasparon con un asa bacteriológica, traspasando a los microorganismos a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de rosca que contenía 5 mL de medio YTN con glicerol al 40%. Una vez homogenizado, el medio conteniendo al microorganismo fue distribuido en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5-mL, los cuales fueron almacenados a -20°C.

## 5.4 Activación de las cepas microbianas

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

## 5.5 Preinóculos

Para la preparación de los preinóculos, utilizando un asa bacteriológica, se raspó al microorganismo de las placas empleadas para activar a las cepas por separado. El microorganismo fue resuspendido en 5 mL de solución salina estéril al 0.85% w/v hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.3 a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D). De esta suspensión basal, se sembraron 2.0 mL en matraces Erlenmeyer de 250-mL con deflectores inferiores, los cuales contenían 50 mL de medio YTN líquido. Los inóculos fueron incubados durante 24 h a 29°C con agitación rotatoria a 180 rpm (New Brunswick Scientific).

## 5.6 Cultivo principal

Según el caso (mezcla microbiana o microorganismos por separado), se emplearon dos sistemas diferentes. Los inóculos conservaron la proporción microbiana encontrada en el aislado original. Los cultivos con la mezcla microbiana y los microorganismos por separado se llevaron a cabo en botellas de vidrio con capacidad de 500-mL [Fig. 5.1a], conteniendo 300 mL del medio Y mejorado (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005) [Anexo 2]. En ausencia de la bacteria, se ha observado que la  $\beta$ -ionona inhibe fuertemente el crecimiento de la levadura (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003). Por ello, *T. asahii* fue crecido en un sistema formado por un matraz Erlenmeyer de 250-mL con deflectores inferiores, que contenían 50 mL del medio mejorado o del medio mínimo, diseñado especialmente para la remoción del norisoprenoide [Fig. 5.1b]. El desarrollo de dicho sistema permitió la publicación de un primer artículo experimental, el cual se incluye en la sección de anexos (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2006) [Anexo 1.2].



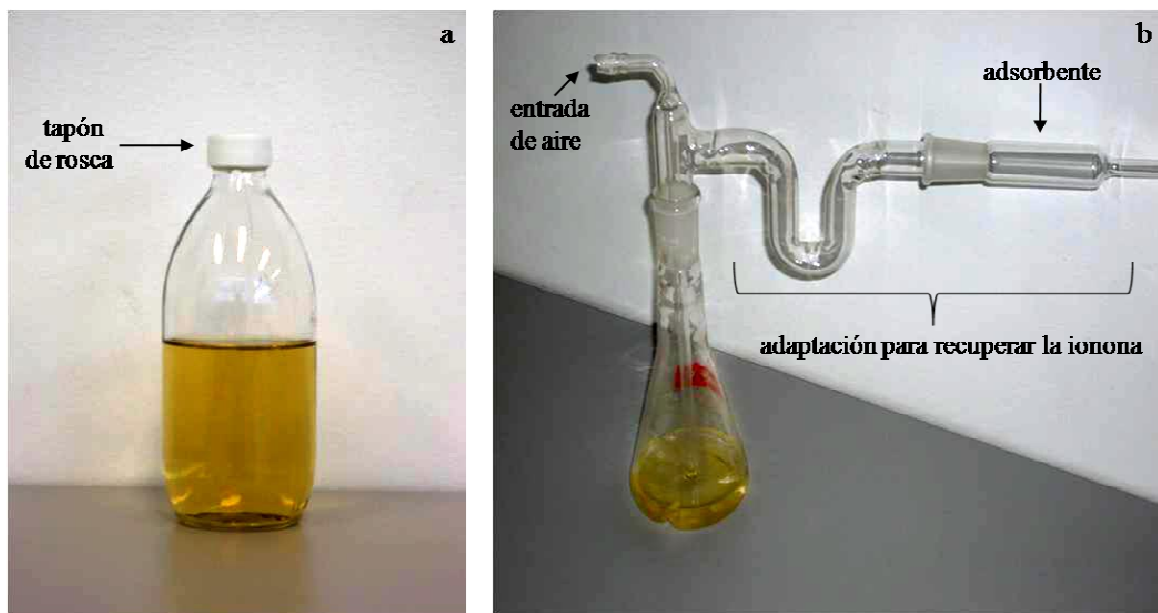


Fig. 5.1 Sistemas de fermentación empleados para llevar a cabo el proceso de bioconversión de luteína. Botella donde se cultivaron la mezcla microbiana y *P. amylolyticus* (a) y matraz adaptado para la remoción y recuperación de  $\beta$ -ionona al trabajar con *T. asahii* (b)

Para conocer la influencia de glucosa sobre el proceso, se probaron cuatro condiciones: una sin la hexosa y tres con distintas concentraciones iniciales de la misma (5, 10 y 20 g/L). Al trabajar con ambos microorganismos y con *T. asahii* por separado, el eofc fue añadido al medio de cultivo justo antes de ser inoculado, a una concentración de 190 mg/L, a partir de una solución stock (22.4 mg/mL) preparada en etanol absoluto y esterilizada por filtración (membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m). En el caso de la bacteria, la luteína fue sustituida por  $\beta$ -ionona (Sigma 95% de pureza), la cual fue también esterilizada por filtración (membranas Millipore de 0.45 mm) y suplementada a una concentración de 20 mg/L.

## 5.7 Cinéticas de cultivo

Cada 12 h se tomaron muestras para dar seguimiento al proceso de bioconversión del carotenoide. Los parámetros a medir fueron la concentración de biomasa, la concentración glucosa residual, la degradación de luteína, la formación/conversión de  $\beta$ -ionona y la producción de sus derivados reducidos (7,8-dihidro-  $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro-  $\beta$ -ionol). Los detalles para la determinación de cada parámetro se encuentran descritos en el artículo citado al inicio de este capítulo (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2009) [Anexo 1.3].

Al observar que la levadura *T. asahii* se veía muy afectada cuando era cultivada en la botella sin la presencia de *P. amylolyticus*, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento mediante cuenta en placa. Cada 12 h se tomó una muestra de 1 mL, haciendo diluciones seriales base 10 hasta la dilución  $10^{-8}$  en tubos de ensaye con 9 mL de solución salina estéril al 0.85%. Estos tubos fueron mezclados por 15 segundos en un agitador vórtex y se tomaron 0.1 mL de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  para sembrarlos por duplicado. La siembra se hizo por extensión en placas con medio YTN sólido [Anexo 2] y a continuación, las cajas fueron incubadas a 29°C durante 24 h para posteriormente contar las unidades formadoras de colonias (UFC).

### **5.8 Identificación de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa**

Una vez conocido el microorganismo y el paso dentro de la ruta de bioconversión susceptibles al efecto de glucosa, se procedió a buscar una posible actividad enzimática afectada por la presencia de la hexosa. De cultivos de *T. asahii* crecido en ausencia de glucosa y a una concentración de ésta de 20 g/L, los dos casos con la menor y mayor influencia del azúcar, respectivamente, se trabajó con los extractos proteicos y con el medio libre de células. Lo anterior se llevó a cabo para conocer si la ubicación del sistema responsable de la degradación de luteína era intra o extracelular. Las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación y los sobrenadantes fueron concentrados por ultrafiltración. Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de la ruptura del paquete celular mediante dos métodos: sonicación y polvos de acetona.

Primeramente se empleó un método cualitativo en el cual, mediante la aparición de halos de degradación de luteína, se determinó si la actividad responsable de la ruptura del carotenoide era sensible al azúcar. Dicho método consistió en el uso de cajas Petri preparadas con agarosa al 0.3% w/v disuelta en solución amortiguadora de fosfato de potasio (100 mM, pH= 7.0) o de citratos (100 mM, pH= 5.0) y teñida con luteína a una concentración de 100 mg/L. Para la tinción se preparó una solución stock de luteína, emulsionando al carotenoide en Tween80 y disolviendo la emulsión en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La proteína de las muestras (intra y extracelulares) se cuantificó por el ensayo de ácido bicinonónico (BCA) para después agregar la misma cantidad (100 µg) a discos de papel filtro (Whatman 40) de 1.5 cm de diámetro. Los discos fueron colocados en el centro de las placas y después de incubarlas durante 24 h a 29°C, misma temperatura a la cual tienen lugar las fermentaciones, la aparición de halos fue verificada. El proceso de incubación se llevó a cabo en ausencia de luz.

La actividad degradadora de luteína fue determinada espectrofotométricamente, siguiendo un método reportado por Zorn *et al.* (2003a) para  $\beta$ -caroteno. La disminución de la absorbancia del carotenoide a 453 nm fue monitoreada a lo largo del tiempo durante 120 min. Una vez transcurrido este tiempo, la actividad (Z) se cuantificó aplicando la siguiente relación:

$$Z = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V_t}{V_s \epsilon b} \cdot 10^6$$

donde  $\Delta A/\Delta t$  es el cambio en la absorbancia a través del tiempo;  $V_t$ , el volumen total del ensayo,  $V_s$ ; el volumen de muestra que contiene la enzima;  $\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar de la luteína en la emulsión acuosa; y  $b$ , el ancho de la celda. El factor de  $10^6$  se emplea para obtener las unidades de actividad enzimática en mU/mL, definiendo a U como 1  $\mu$ mol de luteína degradada por minuto. El coeficiente de extinción molar del carotenoide fue obtenido experimentalmente, midiendo la absorbancia a diferentes concentraciones y posteriormente calculado, aplicando una regresión linear a la ley de Lambert-Beer. Cabe mencionar que dado que los coeficientes molares reportados para distintos carotenoides poseen valores altos (Rodríguez-Amaya, 2001) fue necesario utilizar concentraciones muy bajas de luteína para que la lectura de su absorbancia pudiera entrar en el límite de detección del espectrofotómetro (Spectronic 21D).

## 5.9 Electroforesis en geles de policacrilamida (PAGE)

Con el fin de comparar los perfiles de proteína extracelular derivados de cultivos de *T. asahii* crecidos en las dos condiciones probadas (ausencia de glucosa y a una concentración inicial del azúcar de 20 g/L), se corrieron geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones nativas y desnaturalizantes a amperaje constante. Para evitar alguna interferencia en la actividad enzimática debida al persulfato de amonio (PSA) y/o al tetrametiletildiamina (TEMED), los geles nativos fueron precorridos durante 30 min previo a cargar las muestras de proteína.

## 5.10 Zimogramas

Para detectar la banda de proteína con la actividad degradadora de luteína, primeramente se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes. A continuación, el gel nativo fue sobrepuesto en uno de agarosa teñido con luteína y preparado de forma idéntica a como se realizaron las placas para el ensayo cualitativo. El gel de agarosa, con un grosor entre 2 y 3 mm, se preparó en un recipiente de plástico de 20x20 cm, el cual fue tapado para protegerlo de la luz y se incubó durante 24 h a 29°C.

En base a nuestra hipótesis de que la proteína responsable de la ruptura del oxicarotenoide pudiera tratarse de una peroxidasa, se buscó de forma simultánea por zimograma, tal actividad (Manchenko, 1994). Este método de detección se basa en la aparición de bandas de color marrón intenso, a través de la siguiente reacción: Donador +  $H_2O_2 \rightarrow$  Donador oxidado (visible) +  $2H_2O$ , en la cual el guayacol fue empleado como donador. Para ello, se empleó una solución de tinción compuesta por 100 mL de amortiguador de acetato de sodio (50mM, pH=5.0), 50 mg de guayacol y 0.75 mL de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3%. El gel nativo se sumergió en la solución de tinción y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad, hasta la aparición de las bandas, después de lo cual se lavó con agua bidestilada y se fijó en glicerol al 50%.

Greiner y colaboradores (1992) han utilizado como metodología alterna para la detección de peroxidasas, la búsqueda de actividad de catalasa, por lo cual, un protocolo para detectar dicha actividad (Harris y Hopkinson, 1977) fue seguido. Para esta técnica, una vez que se llevó a cabo la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, el gel se fijó con una solución de metanol al 5% durante dos minutos, enjuagándolo después con agua bidestilada. A continuación, se le adicionaron 35 mL de una solución 10 mM de  $H_2O_2$ , incubando por cinco minutos. Transcurrido este tiempo y después de lavar una vez con agua bidestilada, el gel se sumergió en volúmenes iguales, en este caso 10 mL, de una solución de ferrocianuro de potasio al 2% y de una solución de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) al 2% hasta la aparición de las bandas. Cabe mencionar que este método se basa en una tinción negativa, por lo cual las bandas de actividad permanecen incoloras mientras que el fondo adquiere una coloración azul intensa. Por último, para detener la reacción se adicionó ácido acético al 10%.

## **5.11 Determinación de los parámetros de máxima actividad de ruptura de luteína**

Previo a la purificación de la(s) enzima(s) responsable(s) de la degradación de luteína, los parámetros de temperatura y valor de pH de mayor actividad fueron buscados. La determinación del valor de pH de mayor actividad enzimática consistió en cambiar la solución amortiguadora de reacción según el pH al cual se quisiera efectuar la reacción. Para ello se emplearon distintas soluciones amortiguadoras en un intervalo de pH entre 3.0 y 8.0., particularmente, ácido cítrico/acetato de sodio 100 mM para pH de 3.0, 4.0 y 5.0; ácido acético/acetato de sodio 50 mM para 4.0 y 5.0; y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM para valores de 6.0, 7.0 y 8.0. Como se describió anteriormente, la disminución de la absorbancia fue monitoreada espectrofotométricamente a temperatura ambiente; sin embargo, el tiempo de la prueba se redujo a 15 min. Por otra parte, para determinar la temperatura de máxima actividad, se llevó a cabo la reacción de ruptura del carotenoide, a diferentes temperaturas, dentro de un intervalo entre 10 y 60°C. En este caso, se utilizó un espectrofotómetro (UV-Vis 160U Shimadzu) con baño de agua integrado y la solución amortiguadora en la cual se encontró el valor de pH de mayor actividad. Antes de iniciar la lectura, el sistema fue preincubado durante dos minutos a la temperatura de reacción.

## **5.12 Purificación de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa**

Una vez identificadas ciertas proteínas como las posibles responsables de la ruptura de luteína y susceptibles a la presencia de glucosa, mediante PAGE y zimogramas, se desarrolló un protocolo para la purificación de las mismas. Para una mayor producción de proteína, *T. asahii* fue crecido en matraces de 2.8-L, tipo Fernbach, conteniendo 800 mL del medio Y mejorado, sin glucosa. El protocolo constó de los siguientes pasos: (1) precipitación fraccionada con sulfato de amonio, (2) doble separación por punto isoelectrónico (isoelectroenfoque) y (3) cromatografía de afinidad (intercambio iónico), verificando después de cada uno, el contenido de proteína y la actividad de ruptura de luteína de todas las muestras colectadas. Para determinar esta actividad se siguió la técnica espectrofotométrica descrita anteriormente, bajo los parámetros de pH y temperatura de máxima actividad, durante 15 min. Los detalles de cada paso de purificación se encuentran descritos en el artículo mencionado al inicio del capítulo (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2009) [Anexo 1.3].

Cabe mencionar que para el último paso de purificación (cromatografía de afinidad) se probaron dos tipos de columnas: (1) intercambio catiónico (HiTrap SP) y (2) intercambio aniónico (HiTrap Q). Al final del proceso, la pureza de la enzima fue comprobada mediante PAGE bajo condiciones desnaturalizantes, siguiendo el procedimiento para electroforesis descrito anteriormente.

### **5.13 Secuenciación de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa y comparación con otras secuencias reportadas**

La secuenciación de la proteína recién purificada se llevó a cabo como se describe en el artículo derivado del trabajo doctoral (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2009) [Anexo 1.3], mediante espectrometría de masas, empleando para ello dos métodos: MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) TOF (tiempo de vuelo) y LC (cromatografía líquida)/ESI (ionización por electrospray).

La comparación con otras secuencias proteicas se realizó utilizando el programa informático BLAST (herramienta para el alineamiento de secuencias de tipo local) (Altschul *et al.*, 1997) con el algoritmo fijado en “blastp” (comparación de proteína/proteína).

### **5.14 Espectro de absorción de la proteína responsable de la actividad enzimática sensible al efecto de glucosa**

El espectro de absorción de la enzima purificada se obtuvo empleando un espectrofotómetro (UV-Vis 160U Shimadzu) equipado con un programa capaz de variar la longitud de onda ( $\lambda$ ), en un intervalo entre 300 y 600 nm.

### **5.15 Caracterización del producto de reacción de la prueba *in vitro*, utilizando la enzima purificada**

En base al método para medir la actividad de degradación de luteína, el volumen total del ensayo se escaló ascendentemente a 5 mL. El proceso se realizó en un tubo de ensayo de tapón de rosca con capacidad de 20-mL, bajo los parámetros de temperatura y valor de pH de máxima actividad. Transcurridos 45 min de reacción, se procedió a la extracción del (los) producto(s), adicionando un volumen igual al volumen total del ensayo, de una mezcla de dietil-éter/éter de petróleo (1:1). La fase orgánica se separó de la acuosa mediante centrifugación y el solvente fue eliminado mediante una corriente suave de nitrógeno.

Para la identificación del producto, el extracto orgánico fue analizado en un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890 serie II) siguiendo un programa de temperaturas descrito en el trabajo de Rodríguez-Bustamante y colaboradores (2006) [Anexo 1.2]. La espectrometría de masas se realizó en un detector de masas (Hewlett-Packard modelo 5945 A), utilizando la técnica de impacto de electrones ( $EI^+$ ) para posteriormente hacer la comparación con estándares contenidos en la base de datos de espectros de masa del NIST/EPA/NIH (1992).

### **5.16 Cultivos de *T. asahii* empleando una fuente de carbono no promotora de represión catabólica**

Para evaluar si el efecto negativo sobre el proceso era exclusivamente ejercido por glucosa, se seleccionó al glicerol como fuente de carbono alternativa. El microorganismo susceptible a la influencia del azúcar, es decir *T. asahii*, fue crecido tal como se describió anteriormente, utilizando el medio Y mejorado en los cultivos principales. Para este experimento, la glucosa fue sustituida por glicerol en los cultivos de la levadura, probando dos casos: uno sin la adición de glicerol y otro con glicerol a una concentración de 20 g/L. Como puede apreciarse, la primera condición corresponde al caso 1 de los experimentos anteriores mientras que la segunda corresponde a la concentración más alta de glucosa evaluada previamente, es decir, al caso 4. Cada 12 h se tomaron muestras, midiendo la concentración de biomasa y calculando la actividad de degradación de luteína en los filtrados proteicos libres de células.

## 6. RESULTADOS

---

La mayor parte de los resultados del proyecto doctoral se muestran en los artículos derivados de nuestro trabajo de investigación (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2006; 2009) [ver Anexos 1.2 y 1.3]; sin embargo, con el fin de facilitar la lectura de los mismos, en las secciones de este capítulo, dichos resultados son comentados brevemente. Aquéllos no mostrados, como el caso de las cinéticas de consumo de glucosa, o bien, no incluidos en estos trabajos, son descritos en detalle.

### 6.1 Caracterización del sustrato (luteína) obtenido del extracto óleo de la flor de cempasúchitl

Una vez que se siguió el protocolo para la desesterificación del eofc, se obtuvo el espectro de absorción del sustrato disuelto en etanol [Fig. 6.1]. Las longitudes de onda que exhibieron un valor de absorbancia máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) fueron en nm, 425, 453 y 484, nombrándolas respectivamente I, II y III. Al comparar estos valores, así como el porcentaje del 62.3 % entre los picos III y II (% III/II), con datos reportados en la literatura para el mismo solvente (Britton, 1995), se constató que la muestra correspondía a un carotenoide.

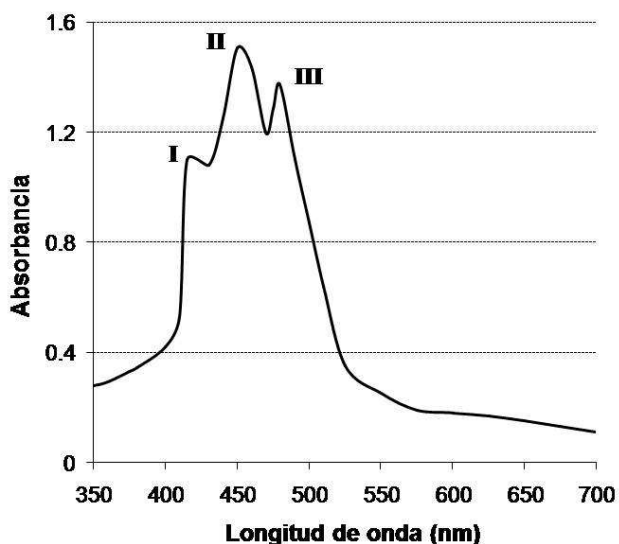


Fig. 6.1 Espectro de absorción del material obtenido a partir de un eofc disuelto en etanol, señalando con números romanos las tres longitudes de onda máximas



Los resultados de la espectrometría de masas mostraron los siguientes valores;  $m/z$  568 ( $M$ )<sup>+</sup> y 550 ( $M-H_2O$ )<sup>+</sup> [Fig. 6.2], con lo cual se pudo constatar que el sustrato se trataba del oxicarotenide luteína.

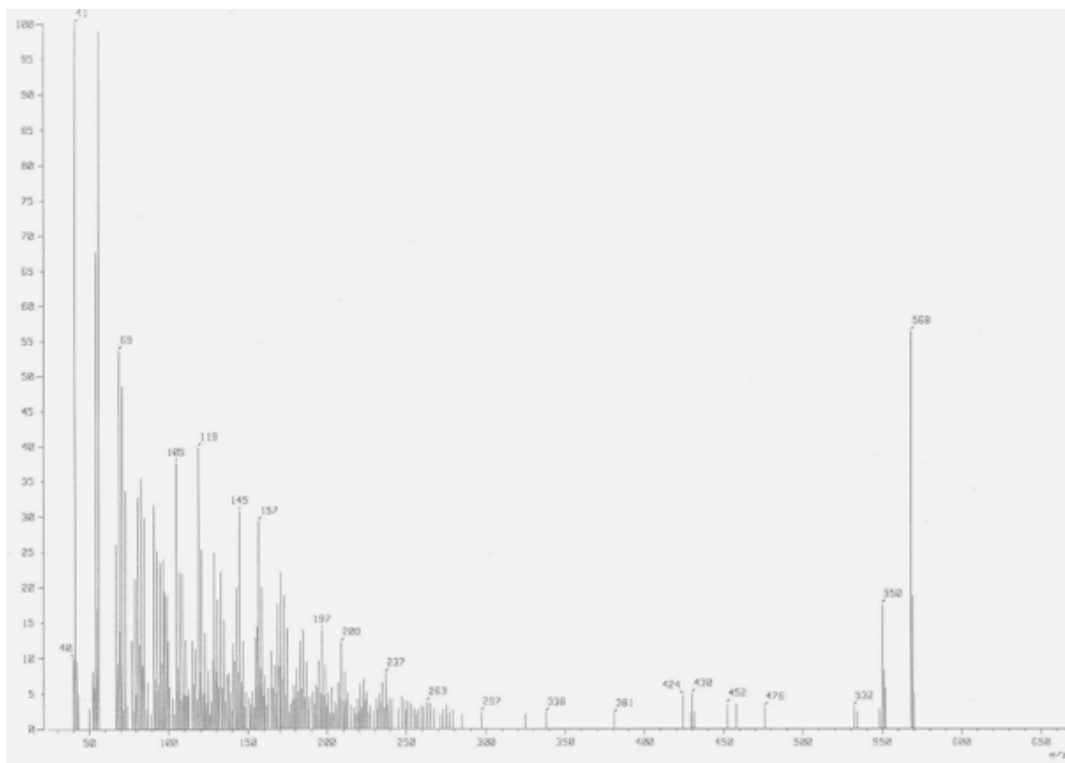


Fig. 6.2 Espectro de masas del material obtenido a partir de un eofc

## 6.2 Efecto de glucosa sobre la mezcla microbiana

Al crecer a la mezcla microbiana a diferentes concentraciones iniciales de glucosa, se observó que a medida que la concentración del azúcar en el medio de cultivo aumentaba, el crecimiento microbiano se vio favorecido. La degradación de luteína, así como la producción de los compuestos con aroma a tabaco, se vieron considerablemente afectados por la presencia de glucosa en el medio [Anexo 1.3]. Para la condición en la cual no se adicionó glucosa, al medio de cultivo, denominada caso 1, la ruptura del carotenoide tuvo lugar después de las 24 h del proceso. Los casos 2 y 3, con glucosa a una concentración de 5 y 10 g/L, respectivamente, la degradación de luteína tuvo lugar sólo hasta que el azúcar fue consumido en su totalidad [Fig. 6.3], en particular 12 h después. En la condición con la concentración de glucosa más alta (caso 4), a pesar de que el azúcar había sido consumido [Fig. 6.3], no se encontró ruptura del carotenoide, posiblemente porque el tiempo de muestreo no fue suficiente para ello.

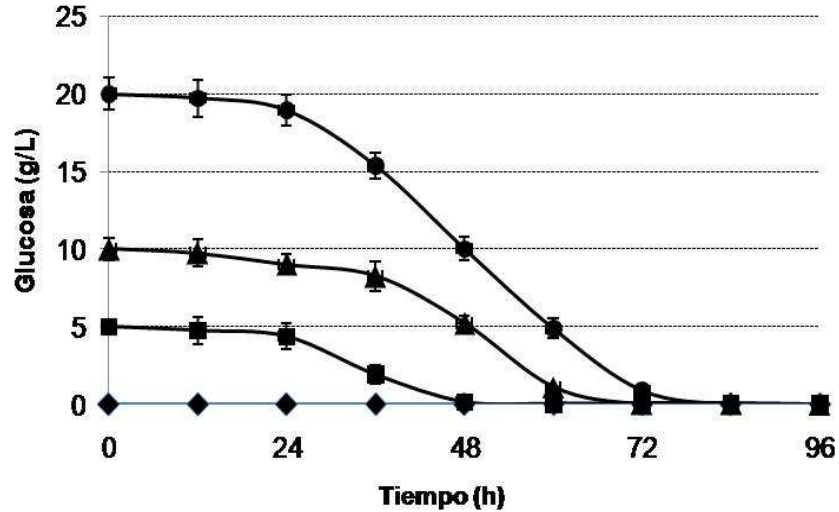


Fig. 6.3 Glucosa residual a lo largo del tiempo al crecer a la mezcla microbiana (60 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (◆) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

### 6.3 Efecto de glucosa sobre *T. asahii*

Al trabajar con *T. asahii* se observó que la concentración de biomasa [Fig. 6.4a] y la glucosa residual [Fig. 6.4b] exhibían tendencias muy similares a las de la mezcla microbiana. La biomasa y el tiempo para el consumo total del azúcar aumentaban mientras mayor fuera la concentración inicial de glucosa. El azúcar no fue detectado después de 60, 72 y 84 h, respectivamente, para las condiciones 2, 3 y 4. El caso 1, al cual no se le adicionó glucosa, llamó nuestra atención ya que a lo largo del proceso, la concentración de biomasa permaneció prácticamente constante. Lo anterior nos hizo pensar que la levadura no era capaz de crecer en estas condiciones, posiblemente por la carencia del azúcar en el medio de cultivo.

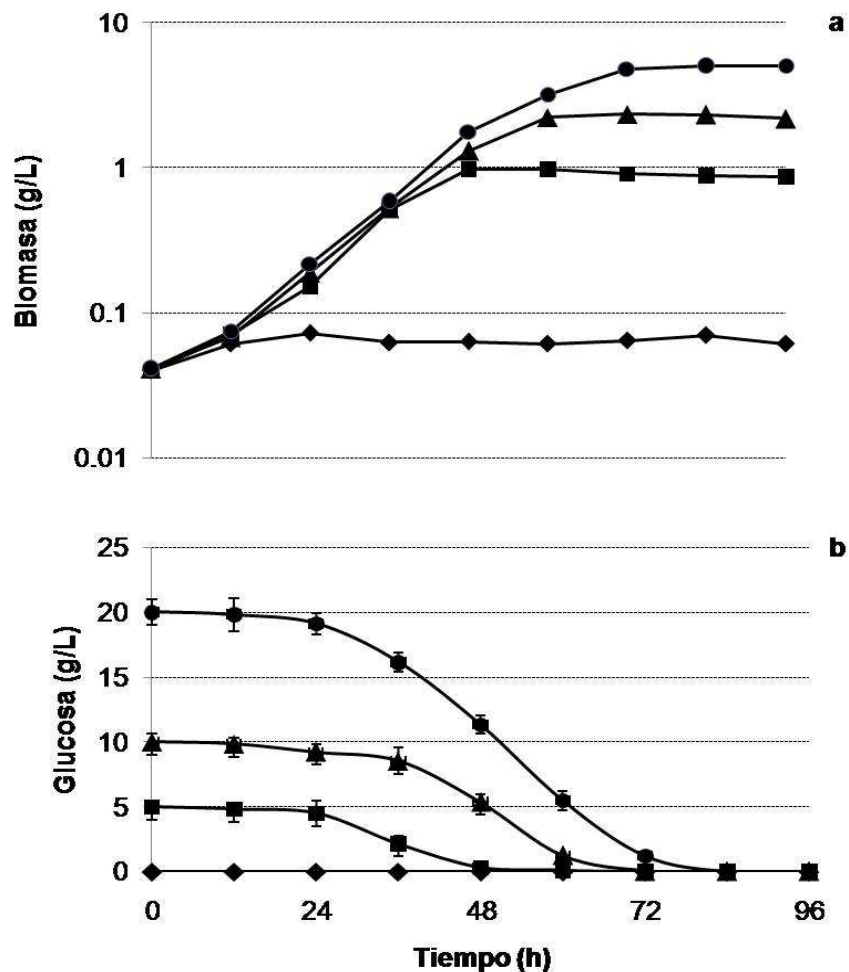


Fig. 6.4 Concentración de biomasa (a) y glucosa residual (b) a lo largo del tiempo al crecer a *T. asahii* (60 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (◆) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

La ruptura de luteína y la producción de  $\beta$ -ionona no mostraron los resultados esperados en cuanto a las cantidades del carotenoide degradado [Fig. 6.5a] y de la ionona generada [Fig. 6.5b]. En ninguno de los casos probados la luteína fue degradada en su totalidad [Fig. 6.5a], lo que se tradujo en una producción de  $\beta$ -ionona [Fig. 6.5b] muy por debajo del valor teórico máximo de 65 mg/L. En la condición sin glucosa (caso 1), la ruptura del carotenoide comenzó transcurridas las 24 h, tiempo después del cual, la concentración de la luteína residual se mantuvo sin cambio, alcanzando una degradación del 12% y solamente un 9% del valor esperado de la ionona. Esto podría explicarse dado a que en esta condición, el crecimiento de la levadura fue nulo. Sin embargo, en los casos 2 y 3, condiciones en las cuales *T. asahii* fue capaz de crecer, tampoco se encontró una degradación total del

carotenoide, siendo el valor máximo alcanzado del 20% con respecto a la concentración inicial de la luteína suplementada y del 13% en relación a la producción teórica de  $\beta$ -ionona. Curiosamente, en ambos casos, la ruptura de luteína tuvo lugar hasta que la glucosa dejó de estar presente en el medio [Fig. 6.4b]. Para la condición con la concentración más alta de glucosa (caso 4), no se detectó la ruptura de luteína ni la generación de la ionona. De manera análoga a lo observado con la mezcla microbiana para este caso, a pesar de que el azúcar ya había sido consumido totalmente, posiblemente el tiempo de muestreo no fue suficiente para observar la degradación del carotenoide.

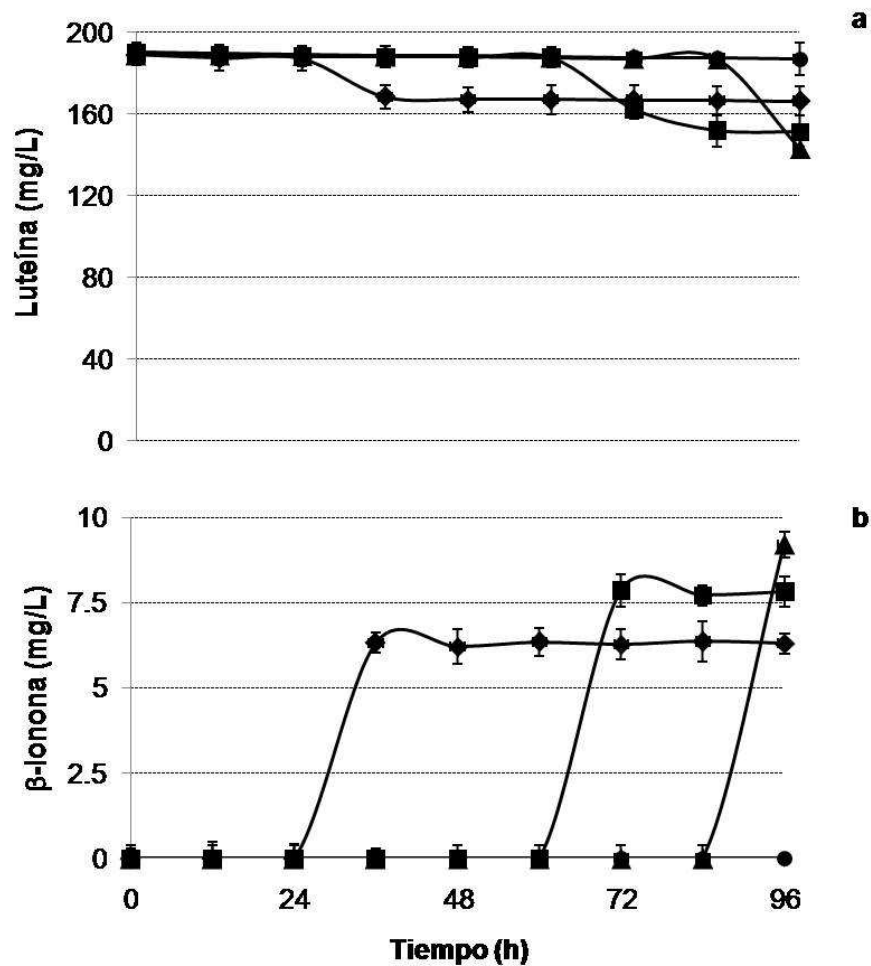


Fig. 6.5 Luteína residual (a) y producción de  $\beta$ -ionona (b) a lo largo del tiempo al crecer a *T. asahii* (60 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (♦) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

Trabajando con los microorganismos por separado, se demostró que al adicionar  $\beta$ -ionona, inclusive a concentraciones bajas, a cultivos de *T. asahii*, el microorganismo fue muy susceptible a este compuesto (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003). En dicho trabajo, cuando se cultivó a la levadura en presencia de luteína, el crecimiento de la misma no se vio afectado. Cabe mencionar que la concentración del carotenoide utilizada por Maldonado-Robledo y colaboradores (2003) era prácticamente nueve veces menor a la que se empleó para este estudio. Por lo anterior se pensó que en ausencia de la bacteria y a altas concentraciones de luteína, la ruptura de este compuesto daba como resultado la generación de  $\beta$ -ionona en cantidades inhibitorias para el crecimiento de *T. asahii*. Con la finalidad de comprobar esta idea, se realizó una cinética de crecimiento de la levadura mediante cuenta en placa [Fig. 6.6]. La degradación de luteína y por ende, la producción de  $\beta$ -ionona, traían consigo una drástica disminución de las unidades formadoras de colonia (UFC). Como se muestra en la figura 6.5, la ruptura del carotenoide es dependiente del tiempo en que la glucosa ha sido consumida totalmente. Por ello, en el caso 1 (sin la adición del azúcar) el descenso en el número de UFC tuvo lugar antes que en las condiciones 2 y 3, específicamente a las 24 h, tiempo en el cual comenzó la degradación de luteína. Los casos 2 y 3 también exhibieron esta tendencia, es decir, la disminución en el número de UFC a las 60 y 84 h, respectivamente, coincidió con la ruptura del carotenoide. Debido a que en el caso con la mayor concentración de azúcar no se detectó ni degradación de luteína ni síntesis de  $\beta$ -ionona, el crecimiento de *T. asahii* no resultó afectado.

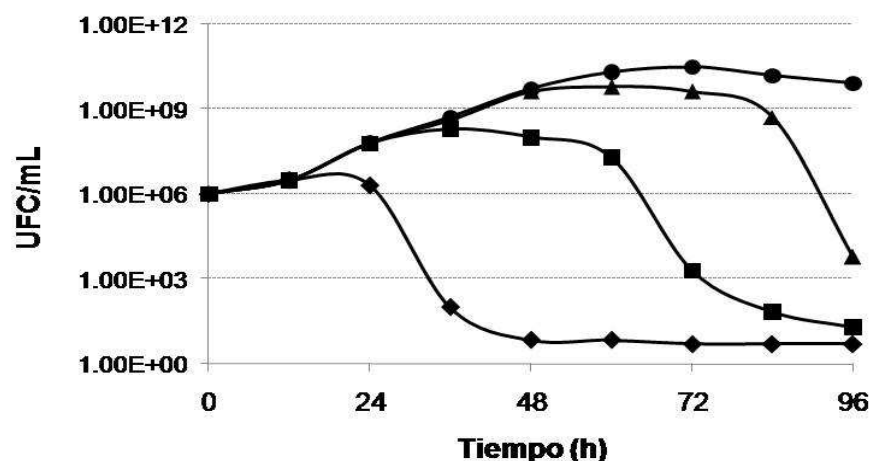


Fig. 6.6 Cuenta en placa de *T. asahii* al crecerlo en botella (60 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (◆) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

Para continuar con el estudio del efecto negativo ejercido por la glucosa sobre la levadura, se llevó a cabo el diseño de un sistema que permitiera la remoción de dicho compuesto (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2006). Cuando se utilizó el material adsorbente de sílice denominado MCM-41, cuyas características son las de poseer tamaños de poro (15-100 Å) y áreas superficiales (>1000 m<sup>2</sup>/g) altos, así como un arreglo hexagonal en su estructura (Kresge *et al.*, 1992), la recuperación de la ionona fue altamente eficiente (más del 98% del valor de producción teórica) [Anexo 1.2]. El material MCM-41 tuvo una capacidad de adsorción del norisoprenoide de casi 5 veces mayor que su contraparte comercial de sílice, atribuyendo esto a su arreglo ordenado más que a su alta área superficial ya que al igualar las áreas de los adsorbentes probados, la cantidad de la ionona recuperada no fue la misma. Asimismo, la no degradación del carotenoide por la levadura, traducida en un fuerte desperdicio de la materia prima, fue eliminada. El sistema diseñado representó una aplicación novedosa para los materiales mesoporosos, los cuales han sido tradicionalmente utilizados en procesos de adsorción pero que hasta ahora, nunca habían sido probados para la recuperación de compuestos con aroma (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2006).

Al crecer a *T. asahii* empleando dicho sistema, nuevamente se observó que el crecimiento del hongo se veía favorecido por la glucosa. El tiempo para el consumo del azúcar [Fig. 6.7] fue menor en comparación a cuando la levadura era crecida en la botella, siendo de 12, 24 y 36 h, respectivamente, para los casos 2, 3 y 4. Esto puede ser atribuido a la mejor oxigenación de los cultivos obtenida al incrementar la agitación y el espacio de cabeza. La ruptura de luteína sólo ocurrió una vez que la glucosa había sido consumida y la generación de β-ionona, a pesar de alcanzar valores similares en los cuatro casos probados, mostró una dependencia con respecto al tiempo de consumo del azúcar [Anexo 1.3].

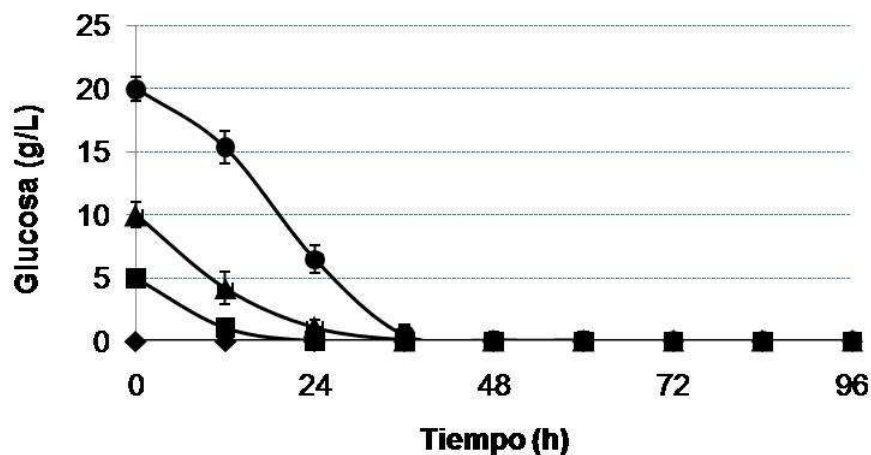


Fig. 6.7 Glucosa residual a lo largo del tiempo al crecer a *T. asahii* (180 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (◆) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

#### 6.4 Efecto de glucosa sobre *P. amylolyticus*

Al igual que en los casos anteriores (mezcla microbiana y *T. asahii*) el crecimiento bacteriano resultó beneficiado por la glucosa. En cuanto al consumo del azúcar [Fig. 6.8], comparado con la mezcla microbiana, se registró un retraso de 12 h para las condiciones a las cuales la glucosa fue suministrada. El azúcar fue totalmente consumido a las 72, 84 y 96 h, respectivamente, para los casos 2, 3 y 4. En base a trabajos anteriores (Maldonado Robledo, 2004; Rodríguez Bustamante, 2005) se cree que este retraso tiene lugar debido a que las condiciones de temperatura (29°C) a las cuales se crece a la bacteria no son las más adecuadas. En el proyecto de investigación realizado por Gabriela Maldonado (2004), *P. amylolyticus* fue cultivado a 37°C; sin embargo, esta temperatura no fue utilizada para el presente trabajo debido a que dicho aumento ocasionaba una pérdida considerable de los productos (7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol). Contrario a lo observado cuando se trabajó con ambos microorganismos y con *T. asahii* respecto al efecto negativo de la glucosa sobre la ruptura del carotenoide, la transformación de la ionona en sus derivados reducidos, por *P. amylolyticus*, mostró un comportamiento distinto. La reducción de la  $\beta$ -ionona ocurría primero mientras mayor fuera la concentración del azúcar en el medio de cultivo, es decir, en el caso con la concentración más alta de glucosa, la reducción de la ionona tuvo lugar antes que en las demás condiciones probadas (casos 1, 2 y 3) [Anexo 1.3].

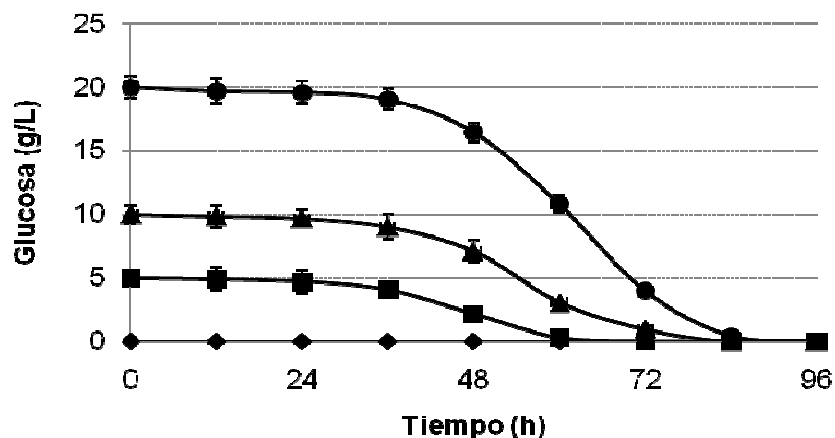


Fig. 6.8 Glucosa residual a lo largo del tiempo al crecer a *P. amylolyticus* (60 rpm, 29°C) probando un caso sin glucosa (◆) y tres con distintas concentraciones iniciales del azúcar (g/L): 5 (■), 10 (▲) y 20 (●)

## 6.5 Efecto de glucosa sobre la ruptura de luteína

### Métodos cualitativos

Con los experimentos anteriores se concluyó que el microorganismo susceptible al efecto de glucosa sobre la producción de aromas era *T. asahii*; posiblemente, la influencia negativa del azúcar tendría lugar en el paso de ruptura oxidativa de la luteína. Para ello, se seleccionaron las condiciones probadas con el menor (caso 1, sin glucosa adicionada) y el mayor (caso 4, glucosa a una concentración de 20 g/L) efecto negativo sobre el proceso. Estos casos fueron seleccionados en base a los resultados derivados de las cinéticas de cultivo. Las células y los sobrenadantes fueron cosechados a las 48 h, tiempo en el cual, para el caso 1, el carotenoide había sido completamente degradado mientras que para el caso 4, la ruptura de luteína aún no había tenido lugar. Mediante un método cualitativo, basado en la aparición de halos de degradación en placas de agarosa teñidas con luteína, se detectó la actividad enzimática responsable de la ruptura del carotenoide [Fig. 6.9]. El ensayo resultó indistinto en relación a los dos valores de pH probados (5.0 y 7.0).



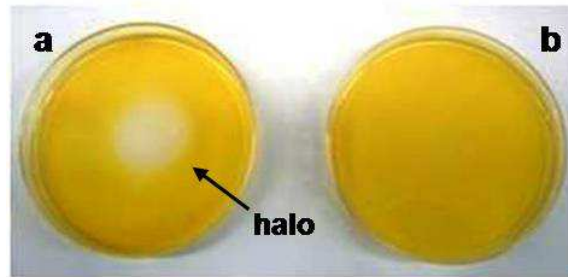


Fig. 6.9 Detección de la actividad responsable de la ruptura de luteína mediante la aparición (a) o ausencia (b) de halos de degradación del carotenoide

En el siguiente cuadro [Tabla 6.1] se presentan los resultados encontrados mediante esta metodología. Como controles negativos se utilizaron muestras sin proteína o bien con la proteína desnaturalizada por temperatura. La actividad responsable de la ruptura de luteína fue localizada extracelularmente, ya que en los extractos proteicos obtenidos de ambas condiciones (caso 1 y 4) no se detectaron halos de degradación. Éstos sólo fueron observados en los sobrenadantes derivados de cultivos de *T. asahii* a los cuales no se les adicionó glucosa, mientras que en el medio libre de células, obtenido de un cultivo con una concentración inicial del azúcar de 20 g/L, no se detectó la aparición de dichos halos. Lo anterior apuntaba a la actividad enzimática responsable de degradar a la luteína como el blanco del efecto negativo de la glucosa. Adicionalmente, para estudiar la inducibilidad de dicha actividad se creció a la levadura en ausencia de glucosa y con la concentración más alta del azúcar, sin embargo, en ninguno de los casos el carotenoide fue adicionado. Al no estar presente la luteína en el medio de cultivo, la actividad degradadora no fue detectada, incluso en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos sin glucosa, señalando al carotenoide como posible inductor.

Tabla 6.1 Detección de la actividad de ruptura de luteína a partir de un método cualitativo basado en la aparición (+) o ausencia (-) de halos de degradación

CONTROLES Y CONDICIONES DE CULTIVO	Extracto proteico	Sobrenadante
Controles negativos	-	-
Luteína sin glucosa	-	+
Luteína + glucosa (20 g/L)	-	-
Sin luteína y sin glucosa	-	-
Sin luteína y glucosa (20 g/L)	-	-

Cuando se compararon mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), los perfiles de proteína extracelular de sobrenadantes de *T. asahii* derivados de los casos 1 y 4 se observaron claras diferencias tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Lo observado bajo condiciones desnaturalizantes será descrito en el siguiente apartado. Para las condiciones nativas, en el filtrado proteico libre de células obtenido del caso sin glucosa (1) se encontró que el número de bandas de proteína era mayor a su contraparte del caso con la concentración más alta del azúcar (caso 4) [Fig. 6.10a]. De manera análoga a la metodología basada en la aparición de halos de degradación de luteína en cajas de agarosa, se buscó la actividad de ruptura en el gel nativo, empalmándolo a un gel, también de agarosa teñida con el carotenoide. Los resultados obtenidos mediante este método mostraron una enorme variabilidad entre cada ensayo. En concordancia a lo reportado por Sánchez Contreras (2001) para filtrados libres de células derivados de cultivos mixtos, en algunos ensayos la degradación de luteína no fue detectada. En otros casos, la aparición de zonas de blanqueamiento a lo largo de todo el gel de agarosa fueron observadas, contrario a las bandas bien definidas, obtenidas de sobrenadantes de *P. eryngii* y *M. scorodoni* (Zorn *et al.*, 2003b; Scheibner *et al.*, 2008).

Por la falta de contundencia del experimento anterior y en base a los hallazgos en basidiomicetos referentes a la degradación de  $\beta$ -caroteno por acción de peroxidasas (Zorn *et al.*, 2003b; Scheibner *et al.*, 2008), se recurrió a la búsqueda de tal actividad por zimograma (Manchenko, 1994) [Fig. 6.10b]. La presencia de una banda de proteína con actividad de peroxidasa se registró únicamente en sobrenadantes derivados del caso 1, mientras que para los obtenidos de la condición con la mayor concentración de glucosa, ésta no fue detectada. Al observar que cuando se adicionó  $H_2O_2$  al filtrado proteico diluido en la solución amortiguadora de acetato de sodio (pH=5.0) tuvo lugar la producción de un intenso burbujeo, se procedió a detectar la posible actividad de catalasa por zimograma (Harris y Hopkinson, 1977). Al igual que en el ensayo específico para la búsqueda de peroxidasas, la actividad de catalasa sólo fue visualizada en el medio libre de células obtenido del cultivo al cual no se adicionó glucosa [Fig. 6.10c]. Con esto se evidenció la existencia de una proteína extracelular, señalada con una flecha en la figura 6.10, con posible actividad de peroxidasa o catalasa, que representaba el blanco del efecto negativo del azúcar, ya que en los sobrenadantes derivados de cultivos de *T. asahii* crecidos en glucosa, ni la proteína ni las bandas de actividad fueron detectadas.

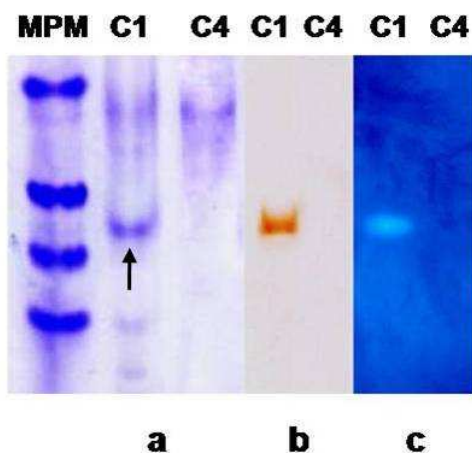


Fig. 6.10 PAGE en condiciones no desnaturalizantes de sobrenadantes derivados de cultivos de *T. asahii* crecido en ausencia (C1) o a una concentración de glucosa de 20 g/L (C4) teñidos con azul de Coomassie (a) y revelados para detección de actividad de peroxidasa (b) o de catalasa (c) MPM- marcador de pesos moleculares

#### Método cuantitativo

A pesar de que la degradación de luteína no fue detectada por medio de un zimograma, la técnica de las cajas de agarosa reveló que la actividad de ruptura del carotenoide era susceptible a la presencia del azúcar. A continuación se procedió a buscar esta actividad en los sobrenadantes obtenidos de cultivos de la levadura a los cuales no se les adicionó glucosa (caso 1) o bien, a los crecidos a una concentración del azúcar de 20 g/L (caso 4) a través de un método espectrofotométrico. Nuevamente se emplearon como controles negativos muestras sin proteína o bien con la proteína desnaturalizada por temperatura. En ninguno de estos casos se registró una disminución significativa de la absorbancia de la luteína. Como fue observado en los ensayos cualitativos, únicamente se encontró que la absorbancia del carotenoide decrecía al utilizar el sobrenadante obtenido del caso 1. Para el filtrado de proteína libre de células derivado del caso 4, la lectura permaneció prácticamente constante, al igual que en los controles negativos [Fig. 6.11] y el leve descenso registrado en la absorbancia puede ser atribuido a la susceptibilidad de las moléculas de carotenoides a ataques no específicos ocasionados posiblemente por las condiciones del ensayo. Con el fin de conocer si el efecto negativo ejercido por la glucosa correspondía a un mecanismo inhibitorio, se agregó el azúcar a la solución amortiguadora del ensayo. El sobrenadante derivado del caso 1 exhibió el mismo comportamiento con o sin la adición del azúcar, descartando a la inhibición enzimática como posible explicación para este efecto.

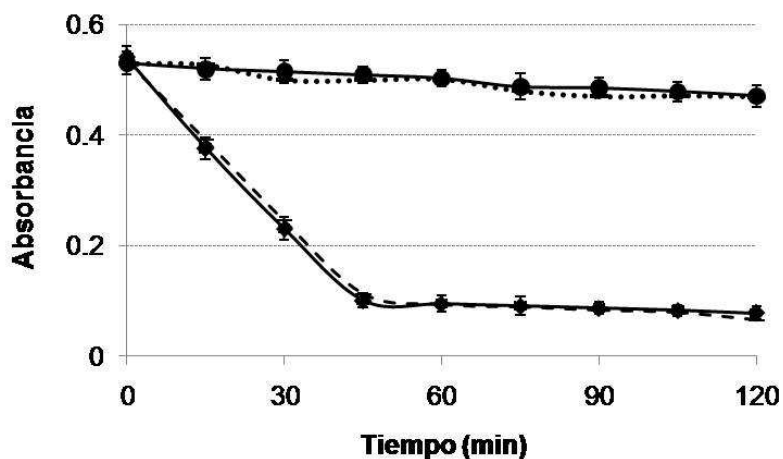


Fig. 6.11 Ensayo espectrofotométrico para la búsqueda de la actividad de ruptura de luteína en filtrados obtenidos de cultivos de *T. asahii* crecidos en ausencia de glucosa (♦) o a una concentración inicial del azúcar de 20 g/L (●). Los controles negativos se muestran en una sola línea punteada (♦♦) y el caso al cual se adicionó el azúcar durante la prueba corresponde a la línea quebrada (--)

Previo a calcular la actividad de degradación del carotenoide mediante la fórmula descrita en el capítulo anterior, se determinó experimentalmente el coeficiente de extinción molar de la luteína ( $\epsilon$ ) en la emulsión acuosa. Mediante una regresión lineal de la ley de Lambert-Beer el valor obtenido para  $\epsilon$  fue de  $52,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde a la pendiente de la línea recta [Fig. 6.12].

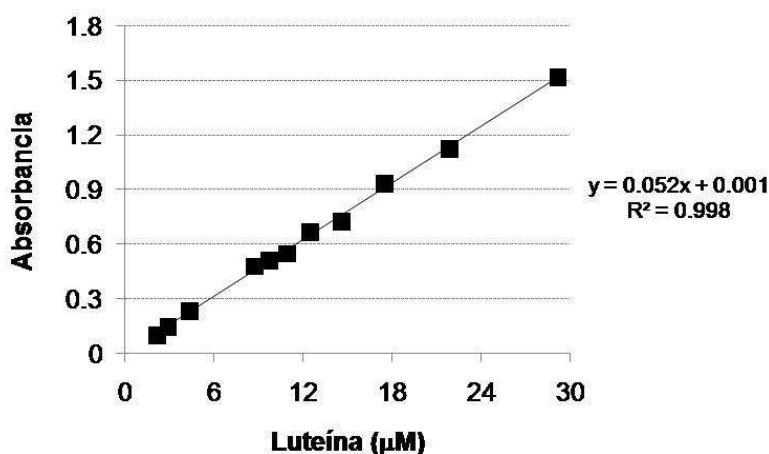


Fig. 6.12 Determinación del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la luteína mediante una regresión lineal de la ley de Lambert-Beer, mostrando la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación

Con la determinación del coeficiente de extinción molar del carotenoide y el seguimiento a lo largo del tiempo de la disminución de su absorbancia ( $\Delta A/\Delta t$ ), la actividad degradadora de luteína pudo ser cuantificada. El valor calculado para la actividad de ruptura observada en el sobrenadante derivado del caso 1 fue de 0.72 mU/mL, mientras que para el medio libre de células proveniente del caso 4, fue de 0.04 mU/mL, 32 veces menor con respecto al valor anterior. De aquí que se concluyera que en el proceso de bioconversión de luteína en compuestos con aroma, la degradación enzimática del carotenoide resultara afectada por la presencia de glucosa mediante un mecanismo no inhibitorio.

Para seguir explorando este fenómeno, los perfiles de proteína extracelular proveniente de las dos condiciones de glucosa probadas (casos 1 y 4), fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes. Como se mencionó para la electroforesis en condiciones nativas, el número de bandas de proteína observadas en el sobrenadante del caso 1 era considerablemente mayor en relación al del filtrado derivado de cultivos de la levadura crecida a una alta concentración del azúcar. Una banda que exhibía un peso molecular alrededor de 40 kDa llamó nuestra atención ya que a lo largo del tiempo, su concentración aumentaba junto con la actividad de ruptura de luteína. Por las siguientes razones: (1) la actividad de degradación del carotenoide sólo fue registrada extracelularmente, (2) el efecto negativo del azúcar como un mecanismo inhibitorio de dicha actividad había sido descartado y (3) dicha banda de proteína se encontró en el sobrenadante procedente del cultivo crecido en ausencia de glucosa, se propuso como posible explicación que la influencia negativa de la glucosa sobre el proceso se debiera a un mecanismo de RCC. Dado que los hallazgos anteriores apuntaban a la proteína cuyo peso molecular se encontraba alrededor de 40 kDa como la responsable de la degradación del carotenoide y a su vez, como la susceptible a efecto del azúcar, se procedió a purificarla y caracterizarla parcialmente para conocer su naturaleza.

## **6.6 Determinación de los parámetros de máxima actividad de ruptura de luteína**

Previo a la purificación de la enzima capaz de degradar al carotenoide y sensible a la influencia negativa de glucosa, se determinaron sus parámetros de mayor actividad. El valor de pH y la temperatura a los cuales la proteína exhibió la ruptura más alta fue de 5.0 y 35°C, respectivamente [Fig. 6.13]. Con respecto a los valores de pH, la degradación del carotenoide aumentó a partir de 4.5, llegando a su máximo a 5.0 y decreciendo levemente hasta 7.0.

Después de este valor, la ruptura de luteína disminuyó considerablemente. El hecho de que la actividad sea estable en el intervalo de 5.0 a 7.0 explica el por qué se visualizaron halos de degradación en las cajas de agarosa al probar ambos valores de pH. En cuanto a la temperatura, se encontró que la actividad aumenta a partir de los 20°C, alcanzando su valor máximo a los 35°C. A temperaturas mayores la ruptura de luteína decae rápidamente, indicando la posible desnaturalización de la enzima.

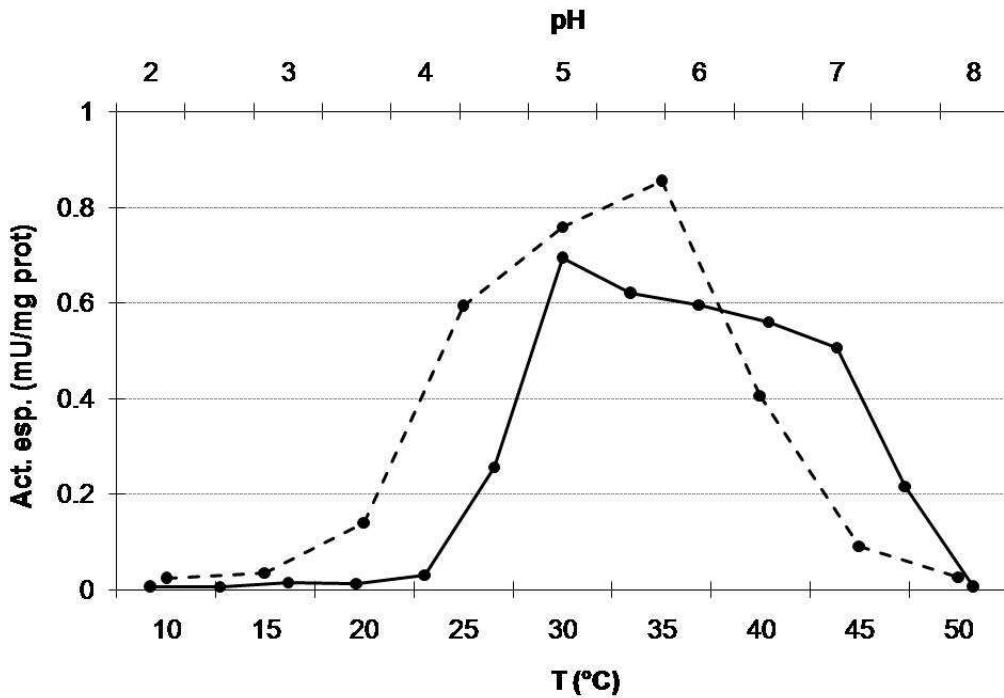


Fig. 6.13 Determinación del valor de pH (línea sólida) y de la temperatura (línea quebrada) de mayor actividad de ruptura de luteína

### 6.7 Purificación de la enzima responsable de la degradación de luteína y sensible al efecto negativo de glucosa

La purificación de la proteína de interés se llevó a cabo a partir de sobrenadantes procedentes de cultivos de *T. asahii* crecidos en ausencia de glucosa (caso 1) ya que sólo en esta condición se registró degradación de luteína. A las 48 h de la fermentación, el sobrenadante fue cosechado, separándolo de las células de levadura mediante centrifugación y concentrándolo, a continuación, mediante ultrafiltración.

## Precipitación por salado

Luego de medir la concentración de proteína y determinar espectrofotométricamente la actividad de ruptura del carotenoide del concentrado, el volumen total fue precipitado con sulfato de amonio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en cuatro fracciones: 0-20%, 20-40%, 40-60% y 60-100% de saturación. Para eliminar el exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , todas las fracciones fueron dializadas contra agua ultra-pura. A pesar de que se detectó cierta degradación en las fracciones de 20-40% y de 60-100% de saturación, la mayor actividad se encontró en la fracción correspondiente al 40-60% [Fig. 6.13]. Esta fracción fue conservada para continuar con el esquema de purificación.

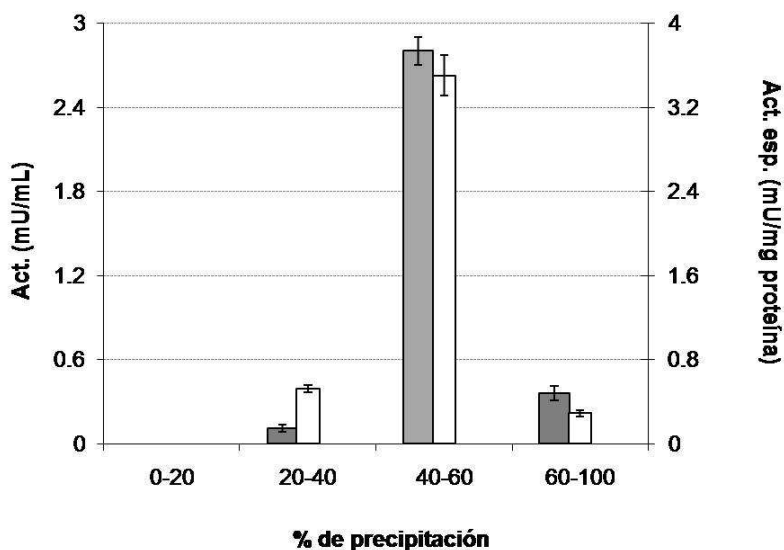


Fig. 6.14 Precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mostrando las actividades de ruptura de luteína volumétrica (barra gris) y específica (barra blanca) de las fracciones de saturación

## Separación por punto isoeléctrico y su recirculación

Dicha fracción fue sometida a isoelectroenfoque en columna, por lo cual se agregaron anfolinas para la correcta formación de un gradiente de pH. La muestra inyectada a la celda Rotofor (BioRad) fue separada en fracciones de acuerdo a sus puntos isoeléctricos, midiendo la concentración de proteína, la degradación de luteína y los valores de pH de cada una. El gradiente se formó correctamente ya que de acuerdo al número de la fracción colectada, el valor de pH aumentaba, es decir que las primeras fracciones presentaban acidez, mientras que las últimas exhibían basicidad [Fig. 6.15]. La discontinuidad en la línea del gradiente de pH se debe a que no en todos los tubos de ensaye se recolectó muestra. Por otra parte, la

degradación de luteína se observó en las fracciones cuyo pH oscilaba entre 3.5 y 4.2, indicando que el punto isoeléctrico (pI) de la enzima responsable de dicha actividad se encontraba dentro de estos valores. Estas fracciones fueron mezcladas y conservadas para su uso posterior.

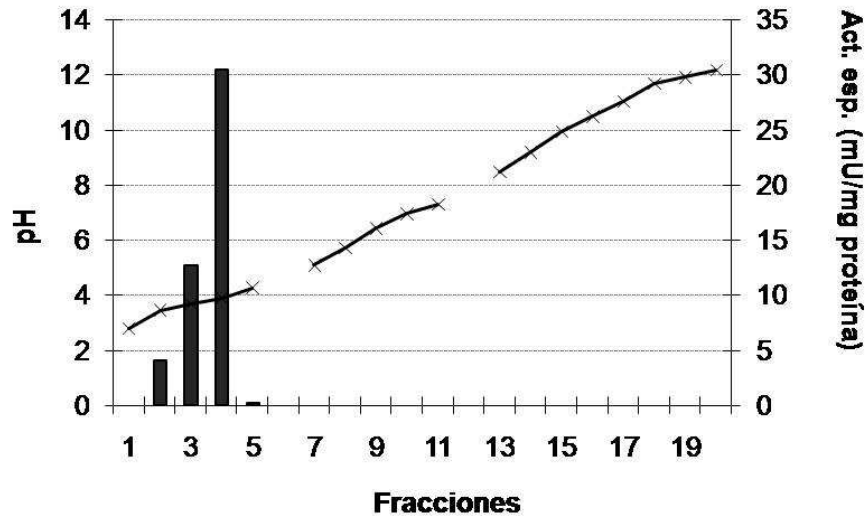


Fig. 6.15 Separación por punto isoeléctrico, mostrando la formación del gradiente de pH (línea discontinua) y la actividad de ruptura de luteína específica (barras)

Las tres fracciones que presentaron actividad de degradación de luteína se sometieron nuevamente a separación por columna de isoelectroenfoque. La formación del gradiente de pH fue verificada, registrando un incremento en los valores de éste de acuerdo al número de fracción [Fig. 6.16]; sin embargo, este aumento fue menos pronunciado que el registrado en el paso de purificación precedente. La discontinuidad en la línea se debió a la misma razón que en el caso anterior. En concordancia con lo observado previamente, la ruptura del carotenoide fue detectada en las fracciones cuyos valores de pH se encontraban en el intervalo entre 3.7 y 4.0, señalando a estos valores como el pI de la proteína de interés. Dichas fracciones fueron mezcladas y conservadas para su subsecuente purificación.



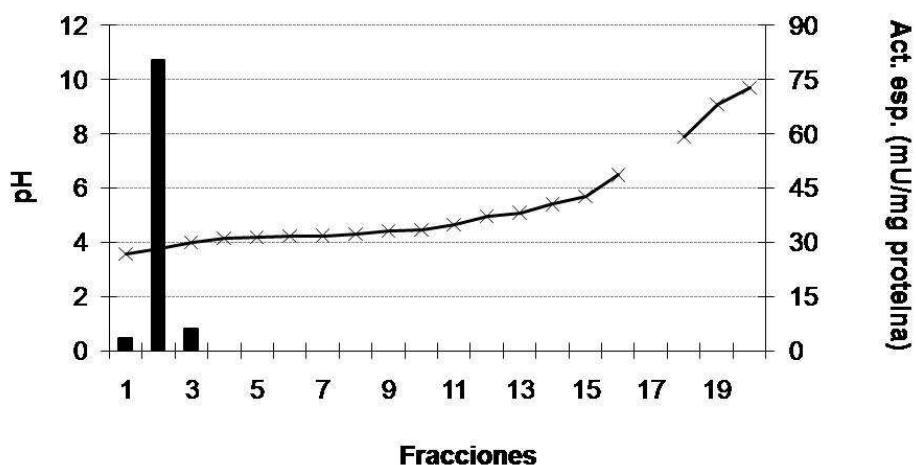


Fig. 6.16 Separación por punto isoeléctrico (recirculación), mostrando la formación del gradiente de pH (línea discontinua) y la actividad de ruptura de luteína específica (barras)

### Separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) mediante columnas de intercambio iónico

La muestra que presentó actividad degradadora de luteína fue concentrada mediante ultrafiltración y a continuación, fue dividida en dos volúmenes iguales. Cada volumen fue inyectado a una columna de afinidad, para lo cual se emplearon los dos tipos de intercambio iónico (catiónico y aniónico). Dado que las fracciones activas colectadas del paso de purificación anterior (separación por pI) exhibían valores de pH en el intervalo de 3.7 a 4.0, se decidió emplear una solución amortiguadora con un pH de 5.0 para que la proteína de interés tuviera una carga negativa. Se pensó en utilizar la columna de intercambio catiónico (HiTrap SP) con la finalidad de que la enzima no fuera atraída por el grupo cargado  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  y eluyera en los primeros tiempos. Sin embargo, ninguna de las proteínas de la muestra inyectada fueron retenidas en este caso, como se puede observar en la figura 6.17a, descartando al intercambio catiónico como una opción para el esquema de purificación. Por otra parte, de acuerdo al número de picos obtenidos a lo largo del proceso, al emplear la columna de intercambio aniónico (HiTrap Q) se logró una mejor separación de las proteínas que conformaban la muestra, [Fig. 6.17b]. Al exhibir una carga negativa, se pensó que la enzima responsable de la ruptura del carotenoide y a la vez, sensible al efecto negativo de glucosa, pudiera ser atraída por el grupo cargado  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ . De ahí que dicha actividad fuera registrada con un valor de 172 mU/mg de proteína en el pico correspondiente a un tiempo de retención de 19.5 min [Fig. 6.17b], eluyendo gracias al gradiente salino.

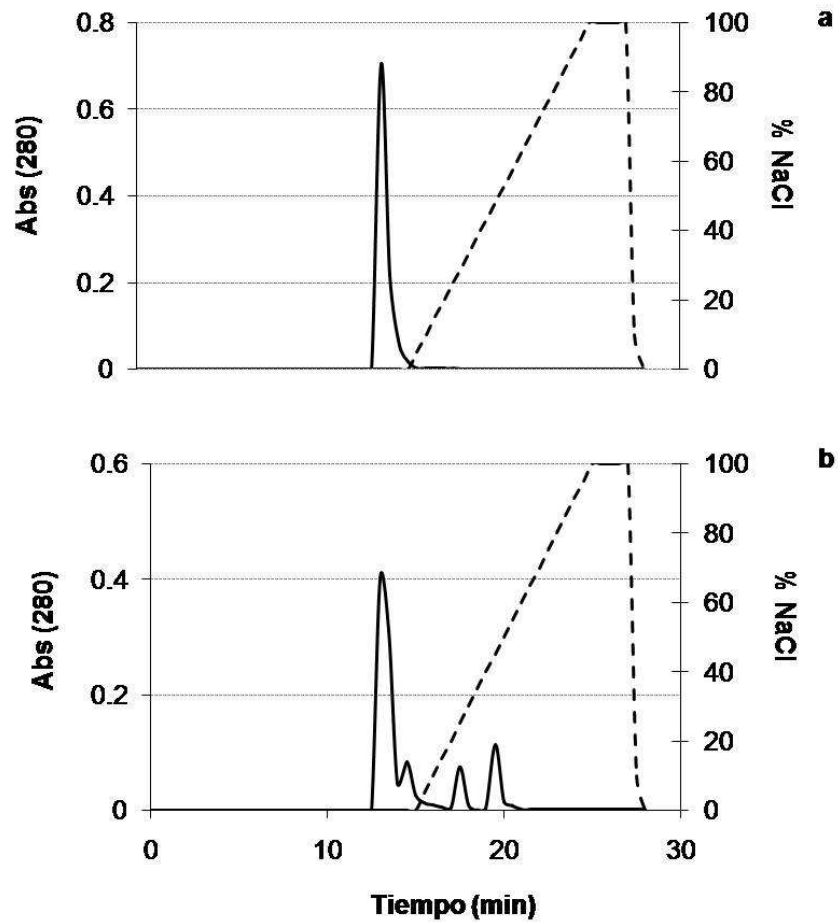


Fig. 6.17 Separación por columnas de afinidad por intercambio catiónico (a) o intercambio aniónico (b), mostrando en ambos casos la absorbancia de la proteína (línea sólida) y el gradiente salino (línea quebrada)

#### Verificación de la pureza de la enzima responsable de la degradación del carotenoide

El volumen colectado procedente del pico que mostró actividad de ruptura de luteína fue nuevamente concentrado por ultrafiltración y después fue sometido a electroforesis en gel de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Como se muestra en el gel [Fig. 6.18], después de seguir el protocolo de purificación, se encontró una sola banda de proteína, la cual poseía un peso molecular de 41.8 kDa. Lo anterior correlacionaba con lo observado para el perfil de proteína extracelular del sobrenadante obtenido de cultivos de la levadura crecidos sin glucosa [Anexo 1.3]. En ausencia del azúcar, aparecía una banda de proteína cuyo peso molecular se encontraba alrededor de los 40 kDa y que su concentración aumentaba junto con la actividad de ruptura del carotenoide a lo largo del tiempo.

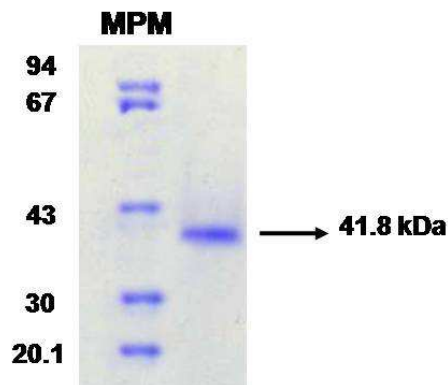


Fig. 6.18 SDS-PAGE del pico colectado del último paso de purificación (HPLC) en el cual se registró la actividad de ruptura de luteína, mostrando una sola banda de proteína correspondiente a la enzima responsable de dicha actividad y susceptible al efecto negativo de glucosa. MPM corresponde al marcador de pesos moleculares

Al final del proceso de purificación se alcanzó un rendimiento del 26% con un factor de purificación de 287. La proteína recién purificada fue conservada para su posterior caracterización.

## 6.8 Caracterización del producto de reacción del ensayo *in vitro*, utilizando la enzima purificada

Como se mencionó anteriormente, los carotenoides son molécula susceptibles a la degradación inespecífica. Por ello, con la finalidad de comprobar que la proteína purificada además de ser responsable de la ruptura oxidativa de la luteína, era capaz de generar compuestos con aroma, particularmente norisoprenoides, los productos de reacción de la prueba *in vitro* fueron caracterizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Como se muestra en el cromatograma [Fig. 6.19], de la reacción enzimática se produjo un sólo compuesto, el cual dado el ancho del pico observado, se genera en gran cantidad. Este compuesto tuvo un tiempo de retención entre 16.5 y 17.5 min y su fragmentación permitió identificarlo como  $\beta$ -ionona, ya que los resultados de la espectrometría de masas revelaron los siguientes valores:  $m/z$  192 ( $M$ )<sup>+</sup>, 177/100 ( $M-Me$ )<sup>+</sup>, 149/8, 135/12, 93/7, 91/6.4, 43/26 y 41/6 [Fig. 6.19b].

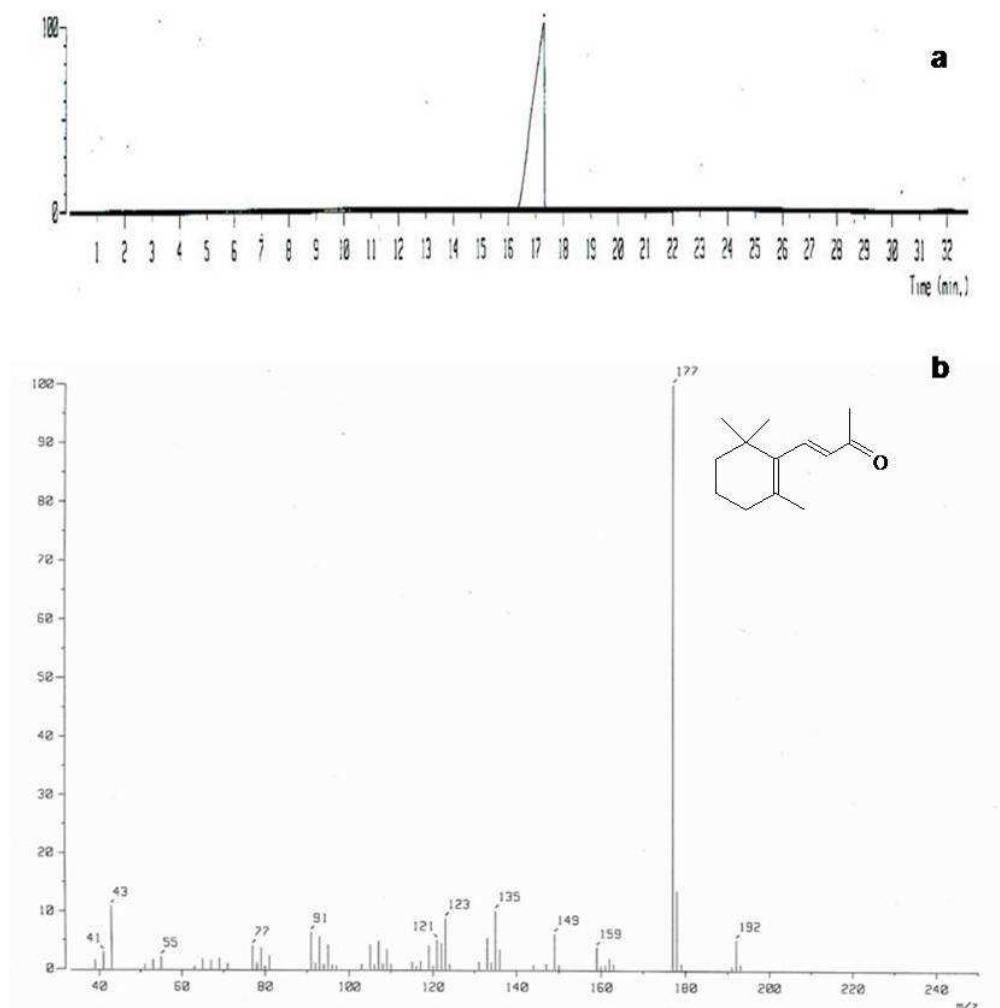


Fig. 6.19 Cromatograma de gases (a) y espectro de masas (b) del producto derivado de la reacción *in vitro* al emplear la enzima purificada

## 6.9 Caracterización parcial de la enzima responsable de la degradación de luteína y sensible al efecto negativo de glucosa

### Secuenciación del extremo amino terminal y de algunos fragmentos internos

Las secuencias del extremo amino terminal y de algunos fragmentos internos de la proteína de interés determinadas tanto por MALDI-TOF como por LC/ESI-MS se muestran en el artículo derivado de este proyecto (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2009) [Anexo 1.3]. A continuación se muestra el alineamiento de dichas secuencias [Tabla 6.2] realizado mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Tabla 6.2 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la enzima responsable de la ruptura de luteína y susceptible al efecto de glucosa

ALINAMIENTO DE SECUENCIAS	Proteína y organismo del cual proviene	Referencia
<b>MSFKTMVALA</b> MSFK <b>L</b> SALA MSFK <b>L</b> SALV MSFK <b>T</b> VLL MAF <b>S</b> TLVAL MAF <b>S</b> TMIL <b>P</b> FVALA	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> PV <sup>a</sup> de <i>P. eryngii</i> PV de <i>P. sapidus</i> Proteína predicha de <i>Laccaria bicolor</i> MP <sup>b</sup> de <i>Phanerochaete sordida</i> MP <i>Lentinula edodes</i>	<b>Este estudio</b> (Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 1999; Zorn <i>et al.</i> , 2003) (Bouws <i>et al.</i> , 2005) (Martin F <i>et al.</i> , 2008) (Hirosue <i>et al.</i> , 2002) (Sakamoto <i>et al.</i> , 2007)
<b>QFVSAAVP</b> QF <b>A</b> SAAVP QF <b>T</b> SAAVP	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> Peroxidasa versátil de <i>P. eryngii</i> Peroxidasa versátil de <i>P. sapidus</i>	<b>Este estudio</b> (Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 1999; Zorn <i>et al.</i> , 2003) (Bouws <i>et al.</i> , 2005)
<b>ATCADGRTTANAACCVL</b> ATCADGRTTANAACCVL ATCADGRTTANAACCVL ATCADGRTTANAACCVL ATC <b>A</b> NG <b>K</b> TT <b>A</b> ND <b>A</b> CC <b>V</b> L	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> MP de <i>Pleurotus ostreatus</i> PV de <i>P. eryngii</i> PV de <i>P. sapidus</i> MP de <i>Ganoderma australe</i>	<b>Este estudio</b> (Salame <i>et al.</i> , 2008) (Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 1999; Zorn <i>et al.</i> , 2003) (Bouws <i>et al.</i> , 2005) (Lay y Hseu, 2005)
<b>GFSPVEVWLLASH</b> GFSPVE <b>V</b> WLLASH GFS <b>A</b> VE <b>V</b> WLLASH GFS <b>A</b> VE <b>V</b> WLLASH	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> VP de <i>P. eryngii</i> MP de <i>Pleurotus pulmonarius</i> VP de <i>P. sapidus</i>	<b>Este estudio</b> (Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 1999; Zorn <i>et al.</i> , 2003) (Yau y Chiu, 2005) (Bouws <i>et al.</i> , 2005)
<b>AQFFIETQLKGKLP</b> QFFIETQLKGK <b>L</b> QFFIETQLKG <b>R</b> L QFF <b>V</b> ETQLKG <b>T</b> L QFFIETQL <b>R</b> G <b>T</b> L QFFIETQL <b>R</b> G <b>T</b>	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> VP de <i>P. eryngii</i> VP de <i>P. sapidus</i> MP de <i>Spongipellis sp.</i> MP de <i>Pseudotremetes gibbosa</i> MP de <i>T. versicolor</i>	<b>Este estudio</b> (Ruiz-Dueñas <i>et al.</i> , 1999; Zorn <i>et al.</i> , 2003) (Bouws <i>et al.</i> , 2005) (Naraoka, 2005) (Yan y Chi, 2009) (Kim YH <i>et al.</i> , 2006)
<b>FGGGADGSIIFFSSIETTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAK</b> FGGGGADGSIIFFSSIETTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAK FGGGGADGSIIFFSSIET <b>A</b> F <b>H</b> AN <b>G</b> IDE <b>I</b> VE <b>E</b> QK <b>P</b> FI <b>A</b> R FGGGGADGS <b>I</b> M <b>T</b> F <b>D</b> T <b>I</b> E <b>T</b> A <b>F</b> H <b>A</b> NG <b>G</b> I <b>D</b> I <b>V</b> N <b>V</b> Q <b>K</b> P <b>F</b> A <b>A</b> K LGGGGADGSII <b>F</b> D <b>T</b> I <b>E</b> T <b>V</b> F <b>P</b> A <b>N</b> A <b>G</b> I <b>D</b> E <b>I</b> V <b>S</b> A <b>Q</b> K <b>P</b> F <b>V</b> A <b>K</b>	<b>Proteína purificada de <i>T. asahii</i></b> L <sup>c</sup> de <i>P. chrysosporium</i> MP de <i>Heterobasidion annosum</i> MP de <i>T. versicolor</i> VP de <i>P. sapidus</i>	<b>Este estudio</b> (de Boer <i>et al.</i> , 1987) (Yakovlev <i>et al.</i> , 2008) (Jun y Kim, 2004) (Bouws <i>et al.</i> , 2005)

<sup>a</sup> Peroxidasa versátil (VP) <sup>b</sup> Manganese peroxidasa (MP) <sup>c</sup> Ligninasa (L)

Todas las secuencias mostraron una alta similitud con peroxidasas de otros basidiomicetos. Todas estas enzimas se encuentran implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos, particularmente lignina; no obstante, las peroxidasas versátiles de *P. eryngii* y *P. sapidus* han sido descritas por su papel en la degradación de  $\beta$ -caroteno (Zorn *et al.*, 2003). Cabe mencionar que el extremo amino terminal de la proteína recién purificada, es decir, la primera secuencia del cuadro [Tabla 6.2], exhibió un alto grado de similitud con el péptido señal de las otras peroxidasas de hongos. Esto podría dar indicio de que la enzima de *T. asahii*, involucrada en la ruptura de luteína, es secretada de manera distinta.

### Determinación de la presencia del grupo hemo

Entre las proteínas que poseen grupo hemo se encuentran las peroxidasas por lo cual, la presencia de este grupo prostético fue buscada por medio del espectro de absorción de la proteína. La forma del espectro fue la característica para hemoproteínas, por lo que al encontrar el máximo de absorción a una longitud de onda de 403 nm [Fig. 6.20], la presencia de dicho grupo fue revelada.

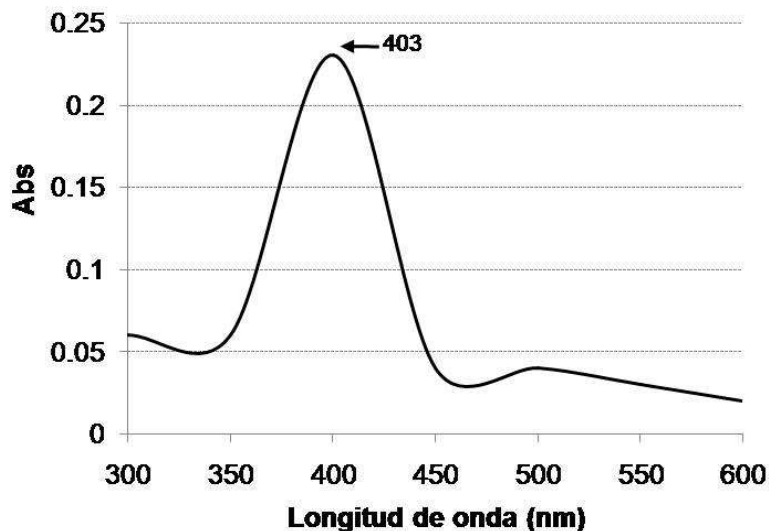


Fig. 6.20 Espectro de absorción de la proteína aislada de *T. asahii*, señalando su punto máximo con una flecha a 403 nm

De los resultados derivados de la caracterización parcial de la proteína de interés, se concluyó que la enzima recién purificada, responsable de la degradación del carotenoide y afectada negativamente por la presencia de glucosa, pudiera tratarse de una posible peroxidasa.

### **6.10 Efecto de una fuente no represora sobre *T. asahii* y la ruptura de luteína**

Con la intención de explorar más a fondo el efecto negativo de la glucosa sobre la bioconversión de luteína, se decidió sustituir al azúcar por glicerol, una fuente de carbono no represora (Ruijter y Visser, 1997). El crecimiento de la levadura resultó beneficiado por la presencia de glicerol [Fig. 6.21a]; sin embargo, comparado con su contraparte de glucosa (caso 4) [Anexo 1.3], se encontró que *T. asahii* tiene una preferencia por el azúcar. Por otra parte, la actividad de ruptura de luteína fue registrada en ambas condiciones probadas [Fig. 6.21b] a diferencia de lo observado al emplear a la glucosa como fuente de carbono [Anexo 1.3]. El valor calculado en el sobrenadante proveniente del caso sin glicerol fue de 0.67 mU/mL, mientras que el cuantificado para el filtrado proteico derivado del cultivo al cual se adicionó este compuesto a una concentración de 20 g/L fue de 1.87 mU/mL. A pesar de que este valor resultó casi tres veces mayor que el registrado en el caso sin glicerol, al normalizar dichas actividades en términos de la cantidad de proteína, no se apreció ninguna diferencia [Fig. 6.21b]. De lo anterior, puede pensarse que al no ser una fuente de carbono represora, el glicerol no ejerce un efecto negativo sobre la degradación del carotenoide.

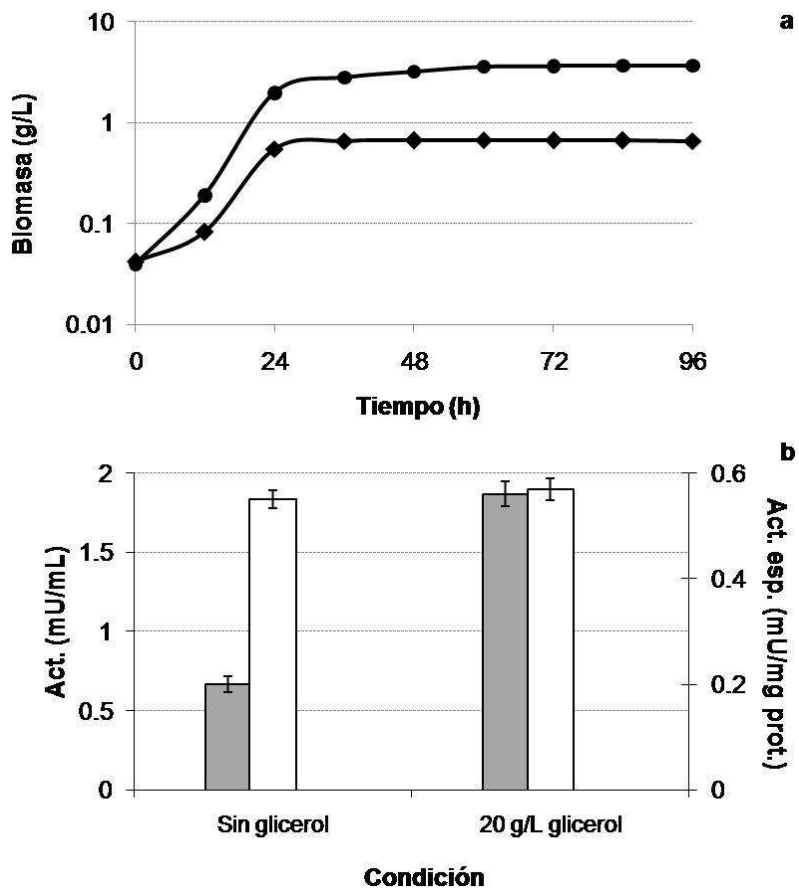


Fig. 6.21 Concentración de biomasa a lo largo del tiempo (a) al crecer a *T. asahii* (180 rpm, 29°C) probando un caso sin glicerol (◆) y otro a una concentración inicial de 20 g/L (●) y cuantificación de las actividades de ruptura de luteína (b) volumétrica (barra gris) y específica (barra blanca) en sobrenadantes derivados de dichas condiciones a las 48 h del proceso



## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

El efecto de glucosa sobre la producción de diversos metabolitos ha sido ampliamente estudiado. Pocos son los reportes referentes a la influencia del azúcar sobre la producción de aromas (Huang *et al.*, 2000; Etschmann *et al.*, 2003). En investigaciones previas (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005; Rodríguez Bustamante, 2005) se encontró que la glucosa ejercía un claro efecto negativo sobre la producción de compuestos con aroma a tabaco a partir del carotenoide luteína. Utilizando a la mezcla microbiana y siguiendo una metodología clásica de diseño de experimentos con la finalidad de maximizar el título del aroma, se observó que al tiempo final de la fermentación (96 h), el título del aroma disminuía considerablemente al aumentar la concentración del azúcar en el medio de cultivo. Este hallazgo llamó nuestra atención debido a la baja cantidad de glucosa comparada con el resto de los nutrientes. Por esta razón, en ese estudio (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005) se decidió eliminar al azúcar de la formulación del medio; sin embargo, se abrió la posibilidad de estudiar con mayor profundidad el efecto ejercido por el mismo.

En este trabajo se encontró nuevamente la influencia negativa de la glucosa sobre la producción de compuestos con aroma al trabajar con la mezcla microbiana y con *T. asahii*. Cabe mencionar que para el caso de la levadura, el efecto de glucosa sólo pudo ser evidenciado una vez que la ionona fue removida del medio de cultivo hacia la fase gaseosa. En ambos casos, sólo hasta que la hexosa había sido completamente consumida, inició la ruptura oxidativa de luteína. Este efecto no fue observado en *P. amylolyticus* donde la presencia del azúcar favoreció la conversión de  $\beta$ -ionona en sus derivados reducidos (7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol) y su reducción tuvo lugar antes de que la glucosa hubiera sido totalmente consumida. Estos resultados coincidieron con lo reportado para *P. eryngii* por Zorn y colaboradores (2003b) ya que degradación de  $\beta$ -caroteno fue registrada una vez que la glucosa había sido consumida. A pesar de su mínima contribución para la biomasa debido a su baja concentración, se sabe que el carotenoide es utilizado como fuente de carbono por ambos microorganismos (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000). En cultivos de *P. amylolyticus* adicionados con el carotenoide, se ha registrado la degradación de luteína por acción de la bacteria; sin embargo, la generación de compuestos con aroma nunca ha sido detectada (Maldonado-Robledo *et al.*, 2003). A pesar de que el efecto de glucosa podría también afectar la ruptura bacteriana de la luteína pero esto no sería reflejado en la

producción del aroma. Al plantear que el efecto negativo ejercido por glucosa sobre el proceso se debiera a un mecanismo de represión catabólica por carbono (RCC), se pensó que dicha influencia se diera a nivel de la degradación del carotenoide por *T. asahii*. Esto fue comprobado al medir a lo largo del tiempo la luteína residual y la producción de la  $\beta$ -ionona en cultivos de la levadura adicionados con el carotenoide y crecidos bajo distintas concentraciones del azúcar. Por otra parte, la transformación de la ionona en sus derivados reducidos efectuada por la bacteria, se debe más a un cometabolismo que a su utilización como fuente energética. Un mecanismo de RCC en este paso parecería innecesario, por lo cual no se encontró ningún efecto negativo por glucosa en los cultivos de *P. amylolyticus* suplementados con  $\beta$ -ionona y crecidos bajo distintas concentraciones del azúcar. Lo anterior explicó el por qué al trabajar con ambos microorganismos, la síntesis de los compuestos presentes en el perfil del aroma a tabaco decrecía al aumentar la concentración inicial de azúcar. Al ejercer la glucosa su efecto negativo sobre la ruptura de luteína, la generación de la ionona por *T. asahii* era afectada, evitando la reducción de ésta por *P. amylolyticus* en 7,8-dihidro- $\beta$ -ionona y 7,8-dihidro- $\beta$ -ionol debido a la falta de sustrato.

De los resultados previos, se pudo concluir que el microorganismo susceptible al efecto de glucosa fue *T. asahii* a nivel de la ruptura de luteína. La influencia negativa del azúcar afectó directamente a la actividad responsable de la degradación del carotenoide. Este efecto fue observado primeramente mediante métodos cualitativos. La visualización de halos de degradación en las cajas de agarosa teñidas con luteína dio a conocer que dicha actividad se localizaba extracelularmente y únicamente en los sobrenadantes provenientes de cultivos de *T. asahii* crecidos en ausencia de glucosa. Por otra parte, la aparición de los halos tampoco fue registrada en filtrados proteicos libres de células derivados de cultivos, en ausencia o presencia del azúcar, a los cuales no se les adicionó el carotenoide. Esto apuntaba a la molécula de luteína o algún producto de su (auto)degradación como el posible inductor de la enzima responsable de la ruptura oxidativa. Hasta la fecha, no se han identificado a los inductores de enzimas con tales actividades y esto se complica aún más ya que estas proteínas son muy diversas entre sí dependiendo de la fuente, es decir, de animales, plantas, hongos o bacterias. Particularmente para el membrillo (*Cydonia oblonga*), la carambola (*Averrhoa carambola*) y la fresa (*Fragaria ananassa*) se ha visto que la degradación de carotenoides tuvo lugar una vez que los frutos comenzaron a madurar, sin saber la razón por la cual se indujo (Fleischmann *et al.*, 2002; 2003; García-Limones *et al.*, 2008). En contraste a lo observado para *P. eryngii* y *M. scorodoni* (Zorn *et al.*, 2003b; Scheibner *et al.*, 2008), al

utilizar la técnica de zimograma, la aparición de bandas de blanqueamiento bien definidas no fue evidenciada al sobreponer un gel de proteína extracelular bajo condiciones no desnaturizantes a un gel de agarosa teñido con el carotenoide. Esto resultó un tanto desconcertante ya que en las cajas de agarosa, la aparición de halos sí fue detectada. Se pensó que lo anterior pudo deberse a que la cantidad de proteína empleada para el ensayo de las cajas fue mucho mayor que la que se pudo cargar en un gel de poliacrilamida. Para lograr que la agarosa adoptara un color amarillo realmente apreciable, la cantidad de luteína añadida tuvo que ser considerable, por lo tanto, las bandas de blanqueamiento no fueron evidenciadas por la baja concentración de proteína. Debido a este inconveniente, se decidió utilizar dos metodologías de zimograma alternas, basadas en la detección de la actividad de peroxidasa. Ambas técnicas mostraron lo encontrado en el ensayo de detección de halos de degradación; únicamente la actividad de peroxidasa se registró en el filtrado proteico obtenido de cultivos de *T. asahii* crecidos en ausencia de glucosa. El efecto negativo del azúcar sobre la degradación de la luteína fue comprobado mediante un método espectrofotométrico basado en la disminución de la absorbancia del carotenoide a lo largo del tiempo. A diferencia de las metodologías enfocadas en la búsqueda de zonas de blanqueamiento en la agarosa teñida, en el ensayo *in vitro* la degradación del carotenoide pudo ser observada ya que la concentración de luteína utilizada se basó en la reportada por Zorn et al. (2003a) para  $\beta$ -caroteno y fue lo suficientemente baja para entrar en el intervalo de sensibilidad del espectro. En concordancia al ensayo cualitativo, la ruptura oxidativa de luteína sólo se registró en el sobrenadante derivado de un cultivo al cual no se le adicionó glucosa. Por todos los experimentos anteriores se concluyó que el efecto negativo ejercido por el azúcar recayera sobre la actividad responsable de degradar al oxicarotenoide. Mediante una prueba muy sencilla, se descartó que la influencia del azúcar se debiera a un mecanismo inhibitorio. Hasta el momento, no hay reportes acerca de la inhibición de la degradación de carotenoides por acción de la glucosa en animales, plantas, hongos o bacterias.

En base a los hallazgos derivados de la electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida tanto en condiciones nativas como desnaturizantes, se encontraron claras diferencias en los sobrenadantes derivados de ambos casos probados. El número de bandas de proteína en el filtrado proteico procedente de la condición a la cual no se adicionó el azúcar fue considerablemente mayor al observado en su contraparte con glucosa. Una banda que exhibió un peso molecular alrededor de los 40 kDa, característica compartida con la peroxidasa de *P. eryngii* responsable de la ruptura de  $\beta$ -caroteno para la formación de  $\beta$ -

ionona (Zorn *et al.*, 2003b), fue observada únicamente en el perfil de proteína extracelular del sobrenadante procedente de cultivos crecidos sin glucosa. La concentración de esta banda aumentaba junto con la actividad degradadora de luteína a lo largo del tiempo, lo cual nunca fue detectado en el perfil de proteína extracelular del filtrado obtenido de la condición con glucosa. Lo anterior apuntaba esta proteína como la responsable de dicha ruptura enzimática del carotenoide y a su vez, como el blanco del efecto negativo del azúcar, por lo cual se decidió purificar dicho sistema enzimático para su posterior caracterización. Los parámetros de máxima actividad degradadora del carotenoide fueron muy similares a los reportados por Zorn y colaboradores en *M. scorodoni* (2003a) y en *P. eryngii* (2003b). Durante el proceso se encontró que la proteína de interés tenía un punto isoeléctrico entre 3.7 y 4.0, otra característica que compartió con la peroxidasa descrita en *P. eryngii* (Zorn *et al.*, 2003b).

Al llevar a cabo la secuenciación de algunos fragmentos de la enzima de *T. asahii* responsable de la ruptura de luteína, de la generación de la ionona y sensible al efecto de glucosa se encontraron varias similitudes con otras peroxidasas de hongos, específicamente de basidiomicetos. A pesar de que la enzima de este estudio fue purificada del sobrenadante, la similitud con el péptido señal que mostraron dos de los fragmentos secuenciados indicó la existencia de un mecanismo secretorio diferente al de otros basidiomicetos. No obstante, este resultado permitió descartar que el efecto de glucosa fuera a nivel de transporte de la proteína ya que la actividad de ruptura nunca se encontró intracelularmente. Este punto representó la apertura de una nueva área de estudio enfocada a entender la manera en que dicha enzima es exportada. El parecido predominante de todos los fragmentos correspondió a peroxidasas versátiles del género *Pleurotus*, particularmente, de *P. eryngii*, descritas primeramente por su rol en la degradación de lignina (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999) pero también estudiadas por su intervención en la ruptura biótica de  $\beta$ -caroteno (Zorn *et al.*, 2003b), y de *P. sapidus* (Bouws *et al.*, 2005), involucradas a su vez en la degradación de carotenoides. Como se mencionó en el artículo derivado del proyecto doctoral (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2009) algunas especies de *Trichosporon* han sido aisladas de madera en descomposición (Middelhoven, 2006) mientras que en otras se ha encontrado actividades ligninolíticas atribuidas a la acción de peroxidasas (Georgieva *et al.*, 2007; Pajot *et al.*, 2007). Aunado a los demás hallazgos, la presencia del grupo hemo nos hizo pensar que la proteína recién purificada de este estudio, con actividad de ruptura de carotenoides y susceptible al efecto de glucosa, pudiera tratarse de una posible peroxidasa.

De manera paralela a la caracterización parcial, se verificó que la enzima de *T. asahii* además de la degradación de luteína, fuera la responsable de la formación de compuestos con aroma, encontrando a la  $\beta$ -ionona como único producto de la reacción. Con esto se comprobó que la ruptura de luteína en la posición entre los carbonos 9 y 10 ocurriera por acción enzimática. Al utilizar los sobrenadantes derivados de cultivos de *Ischnoderma benzoinum*, *M. scorodoni* y *T. versicolor* (Zorn *et al.*, 2003a), así como de *P. eryngii* (Zorn *et al.*, 2003b), se observó la generación de cuatro volátiles a partir de  $\beta$ -caroteno: (1)  $\beta$ -ionona, (2)  $\beta$ -cyclocitral, (3) dihidroactinidiolida y (4) 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. Las cantidades de cada compuesto variaron según el sobrenadante del hongo probado, pero en todos los casos la ionona representó el compuesto mayoritario. La dihidroactinidiolida ha sido descrita como un producto secundario de la ruptura oxidativa de carotenoides (Bossler *et al.*, 1995) por lo cual, su presencia puede ser atribuida a una segunda conversión de la  $\beta$ -ionona por otras enzimas presentes en los filtrados de proteína extracelular. En nuestro caso, al sólo estar presente únicamente la proteína recién purificada en el ensayo *in vitro*, se registró la formación de un sólo producto. El hecho de no encontrar  $\alpha$ -ionona indicó que la enzima tiene preferencia por los anillos de la molécula del carotenoide tipo  $\beta$ . En cultivos mixtos de *T. asahii* y *P. amylolyticus* se observó dicha preferencia ya que al sustituir a la luteína por zeaxantina, molécula con dos anillos tipo  $\beta$ , la cantidad de productos generados fue del doble (Sánchez-Contreras *et al.*, 2000). A pesar de la certeza de que el sustrato se trataba de luteína, curiosamente el producto derivado de su ruptura enzimática efectuada por la proteína de interés resultó ser  $\beta$ -ionona en lugar de 3-hidroxi- $\beta$ -ionona. Químicamente la 3-hidroxi- $\beta$ -ionona es un compuesto poco estable, por lo cual resulta muy difícil de sintetizar. Con la finalidad de generar los derivados hidroxilados en el carbono 3 de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -ionona, Lutz-Wahl y colaboradores (1998) probaron distintas cepas del género *Streptomyces*, encontrando el producto deseado únicamente al emplear la  $\alpha$ -ionona. El compuesto hidroxilado derivado de la conversión de la  $\beta$ -ionona fue la 4-hidroxi- $\beta$ -ionona. Por otra parte, al llevar a cabo biotransformaciones de las iononas mencionadas con cultivos celulares de la leguminosa *Caragana chamlagu* (Sakamaki *et al.*, 2004), el derivado hidroxilado sólo se obtuvo de la  $\alpha$ -ionona; sin embargo, el producto mayoritario lo representó la 3-oxo- $\alpha$ -ionona. De la transformación de la ionona con anillo  $\beta$ , el único compuesto que se obtuvo fue su epóxido, es decir, la 5,6-epoxi- $\beta$ -ionona. La generación de la 3-hidroxi- $\beta$ -ionona a partir de carotenoides (luteína y zeaxantina) ha sido descrita al utilizar dioxigenasas procedentes de ciertos tipos de uva *Vitis vinifera* L. (Matthieu *et al.*, 2005) y de la fresa (García-Limones *et*

*al.*, 2008). Este producto sólo se ha encontrado al emplear enzimas recombinantes en ensayos *in vitro*, derivado de la ruptura de luteína o zeaxantina. Curiosamente al probar dichas oxigenasas con  $\beta$ -caroteno, no se registró ruptura alguna del sustrato, contrastando con lo observado *in vivo*, donde la degradación del caroteno tuvo lugar al expresar estas enzimas en cepas de *Escherichia coli* capaces de producir distintos carotenoides. Varios carotenoides de la flor *Boronia megastigma* han sido caracterizados y aunque la luteína y la zeaxantina fueron detectadas, el único norisoprenoide de 13 átomos de carbono identificado correspondió a la  $\beta$ -ionona (Cooper *et al.*, 2009).

A pesar del constante incremento en el número de reportes referentes a dioxigenasas aisladas de plantas, hasta el momento no se conoce su mecanismo de reacción y dadas las enormes diferencias entre ellas, se ha visto que la ruptura de carotenoides obtenida de cada una es muy variable. Cabe mencionar que también se han estudiado dioxigenasas procedentes de cianobacterias (Jüttner y Höflacher, 1985; Ruch *et al.*, 2005; Marasco *et al.*, 2006; Scherzinger *et al.*, 2006; Scherzinger y Al-Babili, 2008), las cuales han mostrado poca similitud con las de plantas, lo cual se reflejó en la característica de las primeras de romper únicamente apocarotenoides. Los productos obtenidos de oxigenasas de hongos son completamente diferentes a los de plantas y cianobacterias, y hasta ahora se desconoce la función que éstos tienen (Burmester *et al.*, 2007; Prado-Cabrero *et al.*, 2007; Saelices *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009). En el caso particular de basidiomicetos, no se han identificado oxigenasas involucradas en la degradación de carotenoides, siendo las responsables de esto enzimas de otro tipo. Para la peroxidasa derivada de *P. eryngii*, Zorn y colaboradores (2003b) propusieron un posible mecanismo de reacción para la ruptura de  $\beta$ -caroteno; no obstante, esta propuesta aún no ha sido comprobada. El campo referente a la ruptura de carotenoides es muy novedoso y ofrece un enorme potencial para su estudio durante los próximos años.

Cuando se probó una fuente de carbono no promotora de la represión catabólica, se encontró la actividad de ruptura de luteína tanto en presencia como en ausencia de glicerol, exhibiendo el mismo valor en términos específicos para ambos casos. Los resultados derivados de nuestro trabajo nos hacen pensar que el efecto negativo de glucosa sobre el proceso de bioconversión de luteína en compuestos con aroma tenga lugar a un nivel de represión catabólica. Hasta ahora, la información referente a RCC en basidiomicetos es muy escasa y falta aún mucho por investigar. Sin embargo, se ha visto que la síntesis de

peroxidasas es regulada tanto por carbono, nitrógeno y azufre (Aro *et al.*, 2005), siendo la síntesis de genes que codifican para enzimas ligninolíticas de *P. chrysosporium* la más estudiada. Estos hallazgos coinciden con lo observado por nuestro grupo de investigación referente al efecto de distintos factores nutricionales sobre la producción de compuestos con aroma a partir de la degradación de carotenoides (Rodríguez-Bustamante *et al.*, 2005). En dicho estudio se encontró un fuerte efecto negativo tanto por carbono como por nitrógeno sobre la síntesis de compuestos con aroma a tabaco. En base a ello, en este trabajo nos enfocamos a investigar la influencia ejercida por glucosa sobre el proceso, encontrando que una posible peroxidasa de *T. asahii*, responsable de la ruptura de luteína y de la generación de  $\beta$ -ionona representó el blanco del azúcar. Más aún, este efecto no corresponde a un mecanismo inhibitorio ni de regulación en la secreción de la enzima, por lo que se postula que se deba a un fenómeno de represión catabólica por carbono. Especulativamente se cree que exista una regulación por nitrógeno y que ésta también ejerza su influencia sobre la enzima recién purificada.

## 8. PERSPECTIVAS

---

A raíz de este estudio surgieron nuevos aspectos para continuar explorando el proceso de bioconversión del oxicarotenoide luteína en compuestos con aroma. Dichos puntos se presentan a manera de listado a continuación:

- Probar si al utilizar otros carotenoides tanto *in vivo* como *in vitro* se lleva a cabo su degradación y tiene lugar la producción de compuestos con aroma
- Probar otros azúcares como fuentes de carbono para ahondar en el conocimiento de la regulación por carbono
- Estudiar la regulación por nitrógeno, en particular por aminoácidos, y su efecto sobre el proceso
- Conocer el mecanismo de reacción de la enzima recién purificada para la ruptura de luteína y si es posible, de otros carotenoides
- Realizar la clonación del gen que codifica para la posible peroxidasa, para así conocer su secuencia completa
- Obtener mutantes de *T. asahii* insensibles al efecto de glucosa o a la regulación por carbono para contribuir al conocimiento referente a la RCC en basidiomicetos
- Obtener mutantes de *T. asahii* insensibles al efecto inhibitorio que la  $\beta$ -ionona ejerce sobre su crecimiento con la finalidad de eliminar esta limitante en la producción de dicho compuesto



## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller, W y Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402

Anzaldi M, Sottofattori E, Rizzetto R, Granello de Casaletto B y Balbi A (1999) Synthesis and antimicrobial activity of heterocyclic ionone-like derivatives. *Eur J Med Chem* **34**: 837-842

Aro N, Pakula T y Penttilä M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 719-739

Bosser A, Paplorey E y Belin JM (1995) A simple way to (+/-)-dihydroactinidiolide from  $\beta$ -ionone related to the enzymic cooxidation of  $\beta$ -carotene in aqueous solution. *Biotechnol Prog* **11**: 689-692

Bouws H, Zorn H y Berger RG (2005) A putative versatile peroxidase from the Basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *GenBank*: CAJ01576.2

Britton G (1995) UV/visible spectroscopy. *En: Carotenoids: Spectroscopy* (Britton G, Liaaen-Jensen S y Pfander H, eds.) vol. 1B pp. 13-63, *Birkhäuser Verlag*, Basel

Burmester A, Richter M, Schultze K, Voelz K, Schachtschabel D, Boland W, Wöstemeyer J y Schimek C (2007) Cleavage of  $\beta$ -carotene as the first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is mediated by a trisporic acid regulated  $\beta$ -carotene oxygenase. *Fungal Genet Biol* **44**: 1096-1108

Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202-207

Carmona TA, Barrado P, Jiménez A y Fernández Lobato M (2002) Molecular and functional analysis of a MIG1 homologue from the yeast *Schwanniomyces occidentalis*. *Yeast* **19**: 459-465

Cassart JP, Georis I, Ostling J, Ronne H y Vandehaute J (1995) The MIG1 repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **371**: 191-194

Code of Federal Regulations (1990) 21. Estados Unidos: Food and Drug Administration

Cooper CM, Davies NW y Menary RC (2009) Changes in some carotenoids and apocarotenoids during flower development in *Boronia megastigma* (Nees). *J Agric Food Chem* **57**: 1513-1520

Dasek J, Sheperd D y Traelnes RK (1973) Procédé de production de zeaxanthine. Patente belga 790289

- de Boer HA, Zhang YZ, Collins C y Reddy CA (1987) Analysis of nucleotide sequences of two ligninase cDNAs from a white-rot filamentous fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* **60**: 93-102
- Delfin J, Perdomo W, García B y Menendez J (2001) Isolation and sequence of the MIG1 homologue from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **18**: 597-603
- Deutscher J, Francke Cy Postma P W (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031
- Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**: 87-93
- Dowzer CE y Kelly JM (1989) Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Genet* **15**: 457-459
- Drysdale MR, Kolze SE y Kelly JM (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene* **130**: 241-245
- Estrada A F, Maier D, Scherzinger D, Avalos J y Al Babili S (2008) Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genet Biol* **45**: 1497-1505
- Etschmann MMW, Sell D y Schrader J (2003) Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett* **25**: 531-536
- European Commission (1988) Consejo Directivo 88/388/EEC
- Felenbok B, Flippi M y Nikolaev I (2001) Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* **69**: 149-204
- Fleischmann P, Studer K y Winterhalter P (2002) Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J Agric Food Chem* **50**: 1677-1680
- Fleischmann P, Watanabe N y Winterhalter P (2003) Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry* **63**: 131-137
- Flores C-L, Rodríguez C, Petit T y Gancedo C (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 507-529
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-361
- Gancedo JM (2008) The early steps of glucose signaling in yeast. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 673-704

- García-Limones C, Schnäbele K, Blanco-Portales R, Bellido ML, Caballero JL, Schwab W y Muñoz-Blanco J (2008) Functional characterization of FaCCD1: A carotenoid cleavage dioxygenase from strawberry involved in lutein degradation during fruit ripening. *J Agric Food Chem* **56**: 9277-9285
- Georgieva N, Yotova L, Betcheva R, Valchev I y Chadjiska Ch (2007) Biotransformation of lignin in linen with *Trichosporon cutaneum* R57. *Cellulose Chem Technol* **41**: 125-128
- Goodwin (1993) Biosynthesis of carotenoids: An overview. *En: Carotenoids part B: Metabolism, genetics, and biosynthesis* (Packer L, ed.) *Methods in enzymology* vol. 214 pp. 330-340. *Academic Press Inc.* San Diego-New York-London
- Görke B y Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624
- Greiner M, Ono K y Horn K (1992) Comparative investigation of sporozoites of 4 *Sarcocystis* species by isoenzyme electrophoresis. *J Protozool Res* **2**: 123-127
- Guentert M (2007) The flavour and fragrance industry- past, present and future. *En: Flavours and fragrances Chemistry, bioprocessing and sustainability* (Berger RG, ed.) pp. 1-14. *Springer* Berlin-Heidelberg
- Harris H y Hopkinson DA (1977) *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics.* *North Holland Publishing Co.* Amsterdam
- Hirosue S, Harazono K, Hirai H, Shinzato N, Watanabe Y, Fukatsu T y Kurane R (2002) Characterization of genes encoding manganese peroxidase isozymes. *GenBank*: BAC06185.1
- Huang CJ, Lee SL y Chou CC (2000) Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. *J Biosci Bioeng* **90**: 142-147
- Jun SC y Kim KJ (2004) Characterization of manganese peroxidase gene family from *Trametes versicolor* KN9522. *GenBank*: AAT90348.1
- Jüttner F y Höflacher B (1985) Evidence of  $\beta$ -carotene 7,8(7',8') oxygenase ( $\beta$ -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. *Arch Microbiol* **141**: 337-343
- Karnaikhov V N (1990) Carotenoids: Recent progress, problems and prospects. *Comp Biochem Physiol, B* **95**: 1-20
- Kim YH, Cheong SJ y Choi HT (2006) Regulation of manganese-dependent peroxidase under the recalcitrant degrading conditions in *Trametes versicolor*. *GenBank*: CAG33918.4
- Kloer D P y Schulz G E (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2291-2303

- Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, Vartuli J C y Beck J S (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal template mechanism. *Nature* **359**: 710-712
- Krings U y Berger R G (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 1-8
- Larroche C, Creuly C y Gros J B (1995) Fed-batch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 222-227
- Lay C-Y y Hseu R-S (2005) Manganese peroxidase of *Ganoderma* spp. *GenBank*: ABB77244.1
- Leffingwell y Asociados (2008) *En Flavor & fragrance industry leaders*. [www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm) Consultado el 01-05-2009
- Longo M A y Sanromán M A (2006) Production of food aroma compound: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol* **44**: 335-353
- Lutz-Wahl S, Fischer P, Schmidt-Dannert C, Wohlleben W, Hauer B y Schmid RD (1998) Stereo- and regioselective hydroxylation of  $\alpha$ -ionone by *Streptomyces* strains. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3878-3881
- Maldonado-Robledo G, Rodríguez-Bustamante E, Sánchez-Contreras A, Rodríguez-Sanoja R y Sánchez S (2003) Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 484-488
- Maldonado Robledo G (2004) Tesis maestría: Purificación y caracterización de la enzima  $\beta$ -ionona reductasa de *Paenibacillus amylolyticus*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
- Manchenko GP (1994) Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. pp. 94 *CRC Press* E.U.
- Marasco E K, Vay K y Schmidt-Dannert C (2006) Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* spp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J Biol Chem* **281**: 31583-31593
- Martin F, Aerts A, Ahren D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buee M, Brokstein P, Canback B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbe J, Lin YC, Legue V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kues U, Lucas S, Van der Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouze P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G y Grigoriev IV (2008)

The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92

Mathieu S, Terrier N, Procureur J, Bigey F y Günata Z (2005) A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C<sub>13</sub>-norisoprenoid accumulation. *J Exp Bot* **56**: 2721-2731

Menzel M y Schreier P (2007) Enzymes and flavour biotechnology. *En: Flavours and fragrances Chemistry, bioprocessing and sustainability* (Berger R G, ed.) pp. 490-505. *Springer* Berlin Heidelberg

Middelhoven WJ (2006) Polysaccharides and phenolic compounds as substrate of yeasts isolated from rotten wood and description of *Cryptococcus fagi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**: 57-67

Naraoka T (2005) Purification and characterization of ligninolytic enzymes from the newly isolated white-rot fungus. *GenBank*: BAE79812.1

NIST/EPA/NIH (1992) Standard reference data program. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg

Pajot HP, de Figueroa LIC y Fariña JI (2007) Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme Microb Technol* **40**: 1503-1511

Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, y Al-Babili S (2007) Retinal biosynthesis in fungi: Characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* **6**: 650-657

Rodríguez-Amaya DB (2001) A guide to carotenoid analysis in foods. *ILSI Press* Washington D.C.

Rodríguez Bustamante E (2005) Tesis maestría: Estudio de los efectos de factores nutricionales sobre la producción microbiana de compuestos con aroma a tabaco. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Rodríguez-Bustamante E, Maldonado-Robledo G, Ortiz MA, Díaz-Ávalos C y Sánchez S (2005) Bioconversion of lutein using a microbial mixture- maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 174-182

Rodríguez-Bustamante E, Maldonado-Robledo G, Sánchez-Contreras A, Klimova T, Arreguín-Espinosa R y Sánchez S (2006) Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to  $\beta$ -ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 568-573

Rodríguez-Bustamante E y Sánchez S (2007) Microbial production of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit Rev Microbiol* **33**: 211-230

- Rodríguez-Bustamante E, Maldonado Robledo G, Arreguín-Espinosa R, Mendoza-Hernández G, Rodríguez Sanoja R y Sánchez S (2009) Glucose exerts a negative effect over a peroxidase from *Trichosporon asahii*, with carotenoid cleaving activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 499-510
- Rolland F, Winderickx J y Thevelein JM (2001) Glucose-sensing mechanism in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* **26**: 310-317
- Ronne H (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet* **11**: 12-17
- Roy P, Lockington RA y Kelly JM (2008) CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localization or degradation of CreA. *Fungal Genet Biol* **45**: 657-670
- Ruch S, Beyer P, Ernst H y Al-Babili S (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vivo* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Mol Microbiol* **55**: 1015-1024
- Ruijter GJG y Visser J (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 103-114
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ y Martínez AT (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol Microbiol* **31**: 223-235
- Saelices L, Youssar L, Holdermann I, Al-Babili S y Avalos J (2007) Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol Genet Genomics* **278**: 527-537
- Saier M H Jr (ed.) (1996) 14<sup>th</sup> Forum in Microbiology: Catabolite repression in bacteria. *Res Microbiol* **147**: 439-587
- Sakamaki H, Itoh K, Chai W, Hayashida Y, Kitanaka S y Horiuchi CA (2004) Biotransformation of ( $\pm$ )- $\alpha$ -ionone and  $\beta$ -ionone by cultured cells of *Caragana chamlagu*. *J Mol Catal, B Enzym* **27**: 177-181
- Sakamoto Y, Nagai N, Nakade K y Sato T (2007) Lemnp2, a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*, is secreted into sawdust medium. *GenBank*: BAG72083.1
- Salame TM, Yarden O y Hadar Y (2008) Direct Submission. *GenBank*: ACM47219.1
- Sánchez-Contreras A, Jiménez M y Sánchez S (2000) Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 528-534
- Sánchez Contreras MA (2001) Tesis doctoral: Productos de biotransformación de luteína. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

- Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, de Boer L, Berger R G y Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 1241-1250
- Scherzinger D, Ruch S, Kloer D P, Wilde A y Al-Babili S (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: *in vitro* characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J* **398**: 361-369
- Scherzinger D y Al-Babili S (2008) *In vitro* characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by highlight. *Mol Microbiol* **69**: 231-244
- Schneper L, Düvel K y Broach JR (2004) Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Curr Opin Microbiol* **7**: 624-630
- Schrader J (2007) Microbial flavour production. *En: Flavours and fragrances Chemistry, bioprocessing and sustainability* (Berger R G, ed.) pp. 507-574. *Springer Berlin Heidelberg*
- Scragg A H (2007) The production of flavours by plant cell cultures. *En: Flavours and fragrances Chemistry, bioprocessing and sustainability* (Berger R G, ed.) pp. 599-614. *Springer Berlin Heidelberg*
- Serra S, Fuganti C y Brenna E (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol* **23**: 193-198
- Somogyi L P (1996) The flavor and fragrance industry: serving a global market. *Chem Ind* **4**: 170-173
- Somogyi L y Kishi A (2001) Aroma chemicals and the flavor and fragrance industry. *CEH Report*
- Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Hartler G, Stöffer G, Wolschek M y Kubicek CP (1995) Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett* **376**: 103-107
- Stülke J y Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**: 195-201
- Takashima S, Nakamura A, Iikura H, Masaki H y Uozumi T (1996) Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 173-176
- Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H y Uozumi T (1998) Isolation of the *creA* gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of CreA binding sites upstream from the cellulase genes. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 2364-2370

Tonukari NJ, Scott-Craig JS y Walton JD (2003) Isolation of the carbon catabolite repressor (CREA) gene from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *DNA Seq* **14**: 103-107

Tudzynski B, Liu S y Kelly JM (2000) Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 9-15

Vautard G, Cotton P y Fèvre M (1999) The glucose repression CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **453**: 54-58

Winterhalter P y Rouseff R L (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. *En: Carotenoid-derived aroma compounds* (Winterhalter P y Rouseff R L, eds.) pp. 1-17. *ACS Symposium Series* Washington D.C.

Yakovlev IA, Hietala AM, Steffenrem A, Solheim H y Fossdal CG (2008) Identification and analysis of differentially expressed *Heterobasidion parviporum* genes during natural colonization of Norway spruce stems. *Fungal Genet Biol* **45**: 498-513

Yan HB y Chi YJ (2009) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding a manganese peroxidase from *Pseudotrametes gibbosa* and heterologous expression of this gene in *Pichia pastoris*. *GenBank*: ACO92620.1

Yau SN y Chiu SW (2005) A study on ligninolytic enzyme coding genes of *Pleurotus pulmonarius* for degrading pentachlorophenol (PCP) *GenBank*: AAY41060.1

Zhong YH, Wang TH, Wang XL, Zhang GT y Yu HN (2009) Identification and characterization of a novel gene, TrCCD1, and its possible function in hyphal growth and conidiospore development of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* **46**: 255-263

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M y Berger R G (2003a) Cleavage of  $\beta,\beta$ -carotene by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 331-336

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Mimtz M y Berger R G (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* **384**: 1049-1056



# ANEXOS

---

## Anexo 1: Artículos publicados durante la realización del proyecto doctoral

- Anexo 1.1- Microbial production of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage
  
- Anexo 1.2- Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to  $\beta$ -ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material
  
- Anexo 1.3- Glucose exerts a negative effect over a peroxidase from *Trichosporon asahii*, with carotenoid cleavage activity

# Microbial Production of C<sub>13</sub>-Norisoprenoids and Other Aroma Compounds via Carotenoid Cleavage

E. Rodríguez-Bustamante and S. Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F. 04510, Mexico

Carotenoids are important precursors of a variety of compounds: the C<sub>20</sub>-retinoids, the C<sub>15</sub>-phytohormones, and the C<sub>9</sub>-to C<sub>13</sub>-aromas. Among the last type, C<sub>13</sub>-carotenoid-derived compounds (norterpenoids/norisoprenoids) such as ionones and damascones, constitute an essential aroma note in tea, grapes, roses, tobacco, and wine. Extraction of carotenoid-derived aroma compounds from plant sources is not economically realistic or considerably expensive. The biotechnological production of aroma compounds represents a feasible alternative and offers the production of enantiomerically pure molecules which can be labeled as “natural.” To date, research in the production of ionones or the C<sub>10</sub>-compound, safranal, has mainly been focused on plant dioxygenases that cleave carotenoids in the positions between carbons 9 and 10 (9'-10') or 7 and 8 (7'-8'), respectively. Although relatively little is known about the microbial conversion of carotenoids into compounds with aroma due to the well known advantages of manipulating microorganisms, the aim of this work is to review the current state of the research in microbial production of norisoprenoids and other aroma compounds derived from carotenoid cleavage.

**Keywords** Carotenoid Cleavage; Carotenoid-Derived Aroma Compounds; C<sub>13</sub>-Norisoprenoids

## INTRODUCTION

“Odor” refers to any perception (biological, physical, and physiological) caused by molecules called odorants, which are principally organic compounds. To discern and identify the compounds responsible for particular odors constitute one of the principal aims in aroma research (Steinhart et al. 2000). Since ancient times, flavors and fragrances have been deeply appre-

ciated and later on, studied by mankind. Obtaining mixtures of desired aromas was mainly accomplished, at an artisan level, by maceration, extraction, or distillation either from plant or animal sources. However, it was until the 19th century with the isolation of benzaldehyde and cinnamaldehyde, the production of coumarin, and the structure determination and the chemical synthesis of vanillin, when the flavoring industry really began (Figure 1).

The ability to synthesize compounds that reproduce the aroma or flavor characteristic of natural products gave birth to a completely new branch of the chemical industry (Armstrong et al. 1993), and during the past years it has experienced a rapid growth. In 1996 its worldwide size was estimated in USD 9.7 billion (Somogyi 1996); for 2001 its share corresponded to USD 12.2 billion, and by 2005 it was calculated in USD 16.0 billion (Leffingwell and Associates 2006). The structure of the industry of flavors and fragrances is quite complex due to the lack of homogeneity; nevertheless, it can be grouped in three branches: essential oils and natural extracts, chemical compounds with aroma, and formulated fragrances (Somogyi 1996). Up to now, food still remains as the largest market for this industry with beverages, bakery, dairy products, meat, and confectionery as the main sectors. Furthermore, aromas are widely applied in soaps, detergents, cosmetics, perfumery, and house-cleaning items, as well as new targets such as candles and aromatherapy products.

## BIO-MANIA

According to the American (CFR 1990) and European (EC 1988) legislations, the term “natural flavor” is applied to the substance (essential oil, oleoresin, essence or extractive, protein hydrolysate, distillate) derived from vegetal, animal, or microbial sources (spice, fruit juice, vegetable or vegetable juice, edible yeast, herb, bark, bud, root, leaf, or similar plant material, meat, seafood, poultry, eggs, dairy products, or fermentation products) by physical, microbiological, or enzymatic processes, whose significant function in food is flavoring rather than nutritional. Lately, everything labeled as “natural” and very recently, as “organic,” possesses an unfounded notion associated to good health. In contrast, anything containing the words “artificial,”

Received 3 May 2007; accepted 23 May 2007.

This review is dedicated to Prof. Barbarín Arreguín-Lozano, Mexican pioneer in terpenoid research.

During part of his doctoral studies, E. R.-B. was a scholarship recipient from CONACyT and DGEP-UNAM. We are deeply grateful to Gabriela Maldonado-Robledo for her assistance and her critical comments on the final version.

Address correspondence to Rodríguez-Bustamante Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F. 04510, Mexico. E-mail: erodriguezb@gmail.com

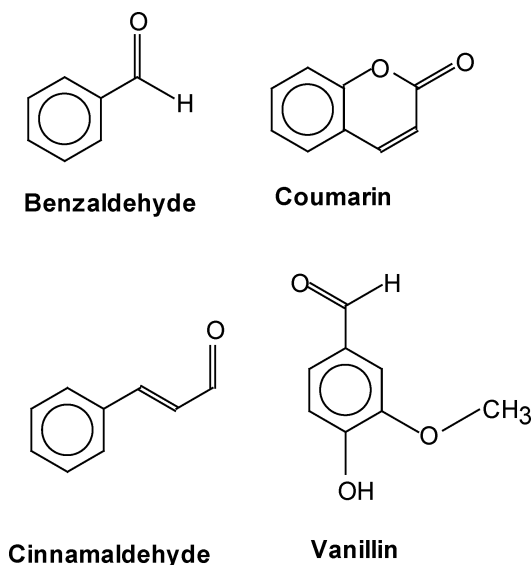


FIG. 1. Chemical structure of the base molecules for the aroma industry.

“chemical,” or “synthetic” is conceived as negative or even harmful. Due to the consumer’s preference and acceptance, a product sold in the market as natural is considerably more expensive than the same one obtained by chemical synthesis. A strikingly surprising example of this situation is given by vanillin, a chemical considered as the most important flavoring compound in terms of amount and value. Natural vanillin extracted from pods is estimated between USD 1000 and 4000 kg<sup>-1</sup> while its synthetic counterpart costs around USD 10 to 15 kg<sup>-1</sup>. Therefore, this “bio-” mania, defined as the perception of natural as better, constitutes an important driving force in the development of flavors and fragrances.

### BIOTECHNOLOGICAL AROMA PRODUCTION

Although still in practice, obtaining natural products via extraction from plants represents an incredibly arduous task.

Among the inconveniences encountered in this method are the strong dependence on agriculture and all the factors surrounding it (climate, seasons, social, and political situation), the diminishing supplies of raw material, the expenses in order to achieve higher yields, and the variability in the amount and quality of the final product (Welsh et al. 1989). As described above, in accordance to U.S. and Europe legislations, biotechnology represents a very attractive alternative for the production of flavors and fragrances that can be considered as natural. In addition, compared to chemical synthesis, the biotechnological approach offers the resolution of enantiomeric mixtures as they occur in nature, thus eliminating subsequent separation steps (Berger et al. 2002) and improving the perception of scent that could be affected by chirality. For example, of eight isomeric forms, only L-menthol confers the desired peppermint note (Figure 2). As Abate et al. (2004) emphasized, the need of enantiopure compounds in the fragrance field is covered by enzymatic catalysis, in particular, with the use of lipase-mediated reactions.

The biotechnological production of aromas can be accomplished via biocatalysis, either by whole cell (microbial or plants) or enzymatic methods. The difference between them might be their application, i.e., whole cells for complex targets and product mixtures, whereas enzymes for single step transformations (Klings and Berger 1998). In crude extracts or purified forms, enzymes such as lipases, esterases, proteases, nucleases, and glycosidases have been extensively employed in various food industry processes, as well as in the production of specific flavor chemicals. Over the use of enzymes, whole cell methods principally have the advantages of higher stability and for not requiring cofactors nor the necessity of regenerating them. Contrary to what is assumed, biocatalysis research and applications have been focused more in the food science and technology fields rather than in the pharmaceutical. Reports dealing with biocatalytical generation of flavors and fragrances have been extensively published (for an excellent and comprehensive

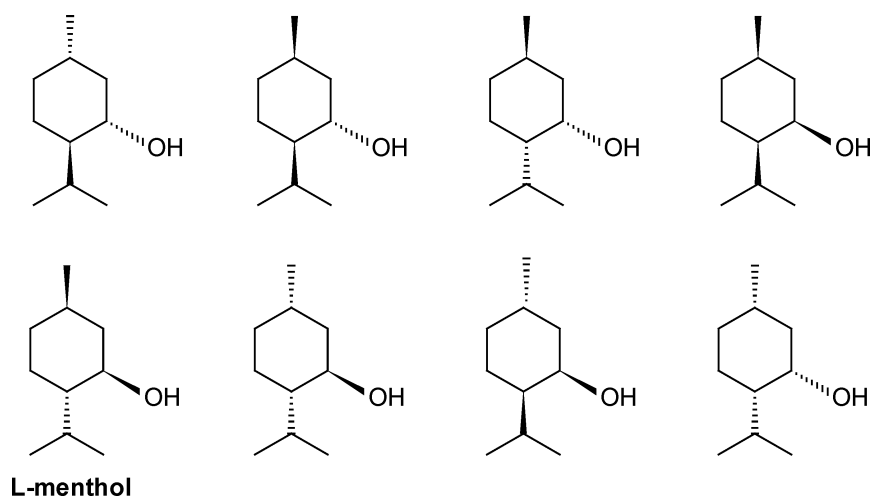


FIG. 2. Chirality in the monoterpene menthol molecule.

overview consult Berger 1995; Rabenhorst 2000; Berger et al. 2002; Cheetham 2004). Furthermore, reviews concerning this topic have focused on traditional aromas, particularly vanillin, benzaldehyde, alcohols, carboxylic acids, esters, lactones ( $\gamma$ -decalactone), 2-phenylethanol, green notes, terpenes (monoterpenes), and with less extent their terpenoid derivatives (Krings and Berger 1998; Vandamme and Soetaert 2002; Schrader et al. 2004; Serra et al. 2005; Longo and Sanromán 2006). Also from a general point of view, Aguedo et al. (2004) described the approaches of different researchers for the production of fragrances from lipids; nevertheless, their work included the important group of carotenoid-derived aroma products obtained by different means.

Compared to plant cells, microorganisms are easily culturable. Rapid growth rates, physiological control, manipulation of fermentation parameters and genes, and the possibility for scaling up make microbial cells excellent candidates as overproducers. Although the use of microbial processes for the production of traditional flavors in fermented foods and beverages has historically accompanied mankind, it was until the 1920s when the role of microorganisms was pointed out (Omeliński 1923). The options offered by the microbiological approach include synthesis *de novo* and bioconversions/biotransformations (Krings and Berger 1998). *De novo* synthesis involves the catabolism of macromolecules (carbohydrates, fats, and proteins) to breakdown products, and then, the production of more complex flavoring molecules derived from the secondary metabolism of microorganisms. On the other hand, the microbial capacity to modify or convert a chemical compound into a structurally related one is known as bioconversion (more than one step) or biotransformation (one step process).

## ISOPRENOIDS

Isoprenoids, terpenes, or terpenoids, depending on the author, are the most structural diverse and abundant compounds in nature, primarily constituting part of essential oils in plants. Their building block is the hydrocarbon isoprene,  $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$ , and based on the number of units, they are classified in hemiterpenoids (1), monoterpenoids (2), sesquiterpenoids (3), diterpenoids (4), triterpenoids (6), tetraterpenoids (8), and polyterpenoids ( $n > 8$ ) (Table 1) (Connolly and Hill 1991; Harborne 2001; Nes and Zhou 2001).

Isoprenoids are formed by consecutive condensations of  $\text{C}_5$ -isoprene units, specifically, isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP) (Figure 3). Depending on the type of organism, the biosynthesis of the precursor units (IPP and DMAPP) can follow two routes: the mevalonate (eukaryotes, archaeobacteria, and cytosols of higher plants) and the nonmevalonate pathways (eubacteria, green algae, and plastids of higher plants) (Kuzuyama 2002). The overall biological role of isoprenoids is still to be elucidated; nevertheless, their basic functions in stabilizing membranes, enzymatic regulation, protein targeting, and respiration are now known.

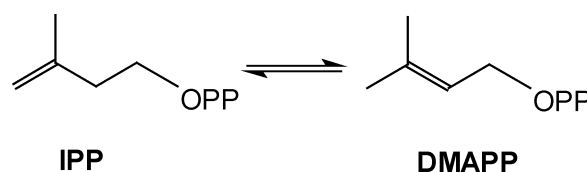


FIG. 3. Isoprenoid precursors.

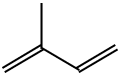
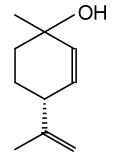
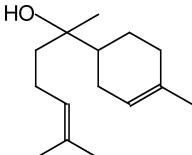
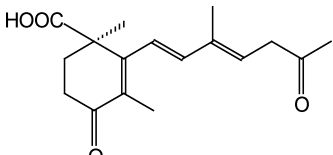
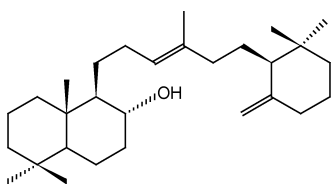
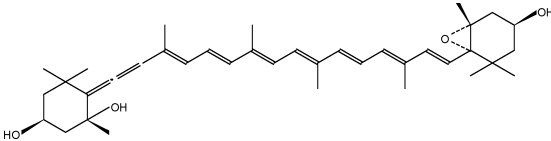
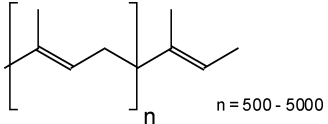
In plants, where the structure and function of isoprenoids have mostly diversified, they act as attractants (aromas and colors) for insects involved in pollination, expellants (aromas and flavors) for insects or certain animals, antimicrobial agents, especially against fungi, accessory pigments (carotenoids) for photosynthesis, and growth factors. For many years plants represented the principal source of isoprenoids. The increasing demand of these compounds and the scarceness of raw materials make this option uneconomically feasible. Isoprenoids can also be isolated from microbes and marine organisms; however, the yields are very low. This situation has driven the search for new alternatives. As described above, microorganisms represent an excellent option, and a lot of research has been achieved in this area (Maury et al. 2005), being the most recent, the engineering of microbial cells to produce the desired levels of terpenoids or novel ones (Mijts and Schmidt-Dannert 2003; Chang and Keasling 2006). Furthermore, once obtained, isoprenoids can be biosynthetically modified by losing carbon atoms or by adding carbons or other functional groups. As de Carvalho and da Fonseca (2006) mentioned, terpenes and the products derived by biotransforming them have earned increasing attention due to their attractive uses as flavors and fragrances, as well as their very recent applications in pharmaceuticals, therapeutics, plague control, and substitutes for friendlier technologies.

## CAROTENOIDS: THE COLORFUL ISOPRENOIDS

Among the numerous group of compounds encompassed by isoprenoids, the lipophilic  $\text{C}_{40}$ -tetraterpenoids, known as carotenoids, are the most widely distributed natural pigments, ranging from bright yellow to deep red. These molecules are composed of a backbone of eight isoprenes, arranged in two  $\text{C}_{20}$  units that are condensed head to head, forming a long conjugated chain of double bonds, especially in the central portion. However, variants to this classic arrangement, exhibiting shorter  $\text{C}_{30}$  or longer  $\text{C}_{45}$  or  $\text{C}_{50}$  backbones have been found in bacteria. Generalities of these compounds can be found in reports by Goodwin (1986), Karnaukhov (1990), Britton (1995), and Olson and Krinski (1995). With respect to the molecule ends, they can be described as acyclic, monocyclic, or bicyclic. Up to now, about 600 different occurring structures have been described, with three forms as the basic ones: lycopene,  $\alpha$ -, and  $\beta$ -carotene (Figure 4).

Although a new classification, based on novel compounds, already exists, carotenoids have been traditionally divided in two major classes: carotenes (hydrocarbons) and xanthophylls

**TABLE 1**  
Classification, number of carbons, examples, and chemical structures of different type of terpenoids

Classification	Carbon atoms	Compound name	Chemical Structure
Hemiterpenoids	5	Isoprene	
Monoterpenoids	10	<i>p</i> -menthadienol	
Sesquiterpenoids	15	$\alpha$ -bisabolol	
Diterpenoids	20	Trisporic acid	
Triterpenoids	30	Ambrein	
Tetraterpenoids	40	Neoxanthin	
Polyterpenoids	>40	Rubber	

(oxygenated carotenoids). As described above, carotenoids are formed from the isoprenoid pathway, and its biosynthesis only occurs in bacteria, fungi, algae, and plants. Animals are unable to synthesize them so they obtain these molecules via ingestion. Depending on the organism, carotenoid anabolism has been extensively studied (Armstrong 1994; Johnson and Schroeder 1996; Armstrong 1997; Britton 1998; Sandmann 2001; Bhosale and Bernstein 2005; Römer and Fraser 2005), and even though all share the same initial pathway (geranylgeranyl pyrophosphate and phytoene synthases) (Figure 5), their subsequent reactions are quite specific. For instance, desaturation of phytoene results in the production of lycopene. However, depending on the cyclase involved in the next steps, different cyclic carotenoids are formed.

Carotenoids exhibit different and essential biological roles. Shortly, their functions are involved in photosynthesis, membrane stability, development (hormone-like), adaptation, protection (photo and antioxidants), nutrition, and recently studied, disease prevention or treatment. Additionally, as mentioned by Lee and Schmidt-Dannert (2002) carotenoids can be commercially focused in the food industry as colorants, animal feed supplements, or nutraceuticals, and also in cosmetics and pharmaceuticals, thereby, increasing the efforts towards their production in useful quantities.

#### CAROTENOID CLEAVAGE AND APOCAROTENOIDS

By means of oxidative cleavage (involving molecular oxygen) carotenoids can be precursors of different compounds



FIG. 4. Molecular structures of lycopene (A),  $\alpha$ - (B), and  $\beta$ -carotene (C) with their carbon numeration.

(initially aldehydes or ketones at the cleaving site), termed as apocarotenoids. The cleaving mechanism first established was the conversion of  $\beta$ -carotene (provitamin A) to retinal (vitamin A) (Moore 1930). Since then, due to the crucial functions exerted by apocarotenoids in living systems, in addition to the

possible commercial applications in flavoring and perfumery, extensive studies in various fields have taken place. Carotenoid breakdown can be symmetric or asymmetric, and once formed, these compounds can be substrate for further cleavage. Therefore, rather than being formed from smaller molecules, the big

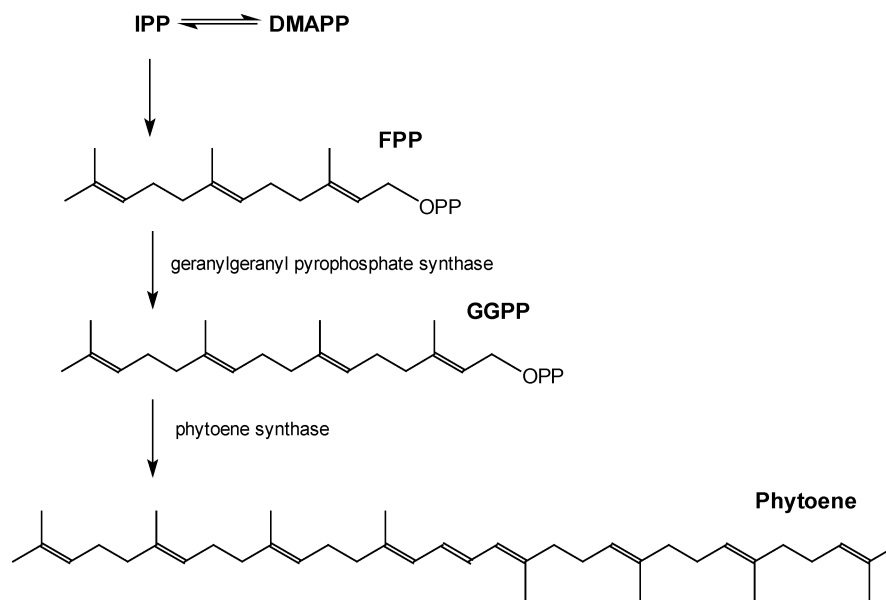


FIG. 5. Common pathway for carotenoid biosynthesis.

majority of apocarotenoids are derived from larger isoprenoids (carotenoids) (Figure 6), with the exception of the plant hormone, abscisic acid (ABA), which can be synthesized from farnesyl diphosphate in fungi (Inomata et al. 2004a, 2004b).

A very complete insight on carotenoid cleavage aspects has recently been described by Kloer and Schulz (2006). Al-

though apocarotenoid generation can be achieved via non-enzymatic or enzymatic mechanisms, carotenoid cleavage oxygenases (CCO) are commonly responsible for it. The first cloned and isolated enzyme of this family was a VP14 recombinant protein from maize (*Zea mays*), involved in the formation of ABA. The cleavage of 9-cis-epoxy-carotenoids took place at the

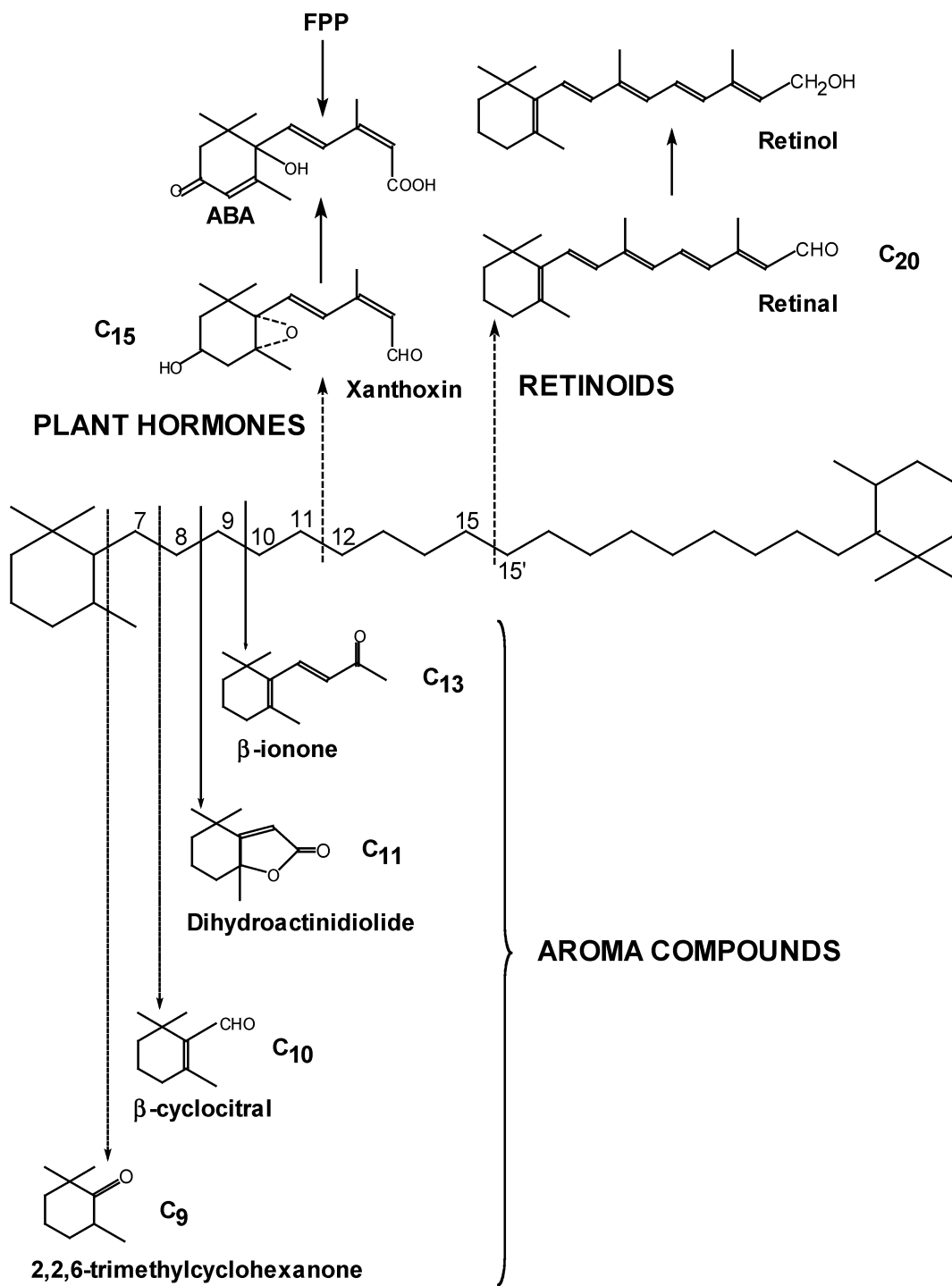


FIG. 6. Carotenoid cleavage products and the alternative biosynthetic route for ABA.

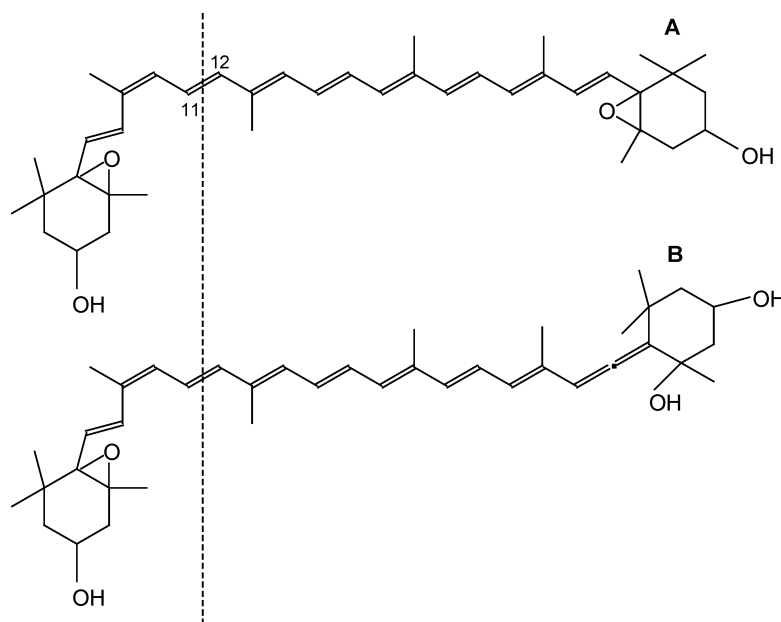


FIG. 7. Two examples of nine-cis-epoxy-carotenoids: 9-cis-violaxanthin (A) and 9-cis-neoxanthin (B), their chemical structure, and the position of cleavage by NCED.

C<sub>11</sub>-C<sub>12</sub> position (Figure 7), resulting in C<sub>25</sub>-aldehydes and its C<sub>15</sub>-precursor, xanthoxin (Schwartz et al. 1997). From then on, research concerning enzymes involved in carotenoid metabolism (catabolism) has been done, and reviews dealing with it, in plants (Bouvier et al. 2005; Auldrige et al. 2006), in animals (von Lintig et al. 2005), and from an evolutionary point of view (Moise et al. 2005) have been published. Enzymes belonging to the NCED (nine-cis epoxy-carotenoid dioxygenases) subfamily, described above, were isolated from other plant sources.

Another subclass of this type of enzymes, discovered also in *Arabidopsis thaliana* by Schwartz et al. (2001), was the carotenoid cleavage dioxygenases (CCD). This dioxygenase was responsible for the mostly occurring symmetrical cleavage at the C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>9</sub>'-C<sub>10</sub>'<sub>9</sub>, resulting in a C<sub>14</sub>-dialdehyde and two C<sub>13</sub>-products. On the other hand, studies on the synthesis of retinoids have mostly taken place in the animal kingdom, where  $\beta$ -carotene can be cleaved symmetrically between C<sub>15</sub>-C<sub>15</sub>' (Figure 6) by  $\beta$ -carotene cleavage oxygenases (BCO1), yielding two molecules of retinal (von Lintig and Vogt 2000; Wyss et al. 2000), or asymmetrically (BCO2) in vertebrates, resulting in  $\beta$ -apo-10'-carotenal (Figure 8) and the C<sub>13</sub>-compound,  $\beta$ -ionone (Kiefer et al. 2001).

#### CAROTENOID-DERIVED AROMAS: NORISOPRENOIDS AND OTHER COMPOUNDS

Due to their historical and commercial significance, low threshold values, and characteristic aroma notes, volatiles derived from carotenoid breakdown are highly appreciated in flavoring. Depending on the carotenoid precursor and, the breakdown position (Figure 6), a great diversity of C<sub>9</sub>- to C<sub>13</sub>-apocarotenoid compounds (Enzell 1985) can be generated (Table 2). It is now known that the cleavage in the 9-10 position is thermodynamically favorable; therefore, C<sub>13</sub>-products, known as norisoprenoids, represent the most common and widespread group.

Winterhalter and Rouseff (2002) compiled a very complete work on carotenoid-derived aroma compounds, encompassing a general overview, generalities and analytical characteristics, biogenesis, biotechnological production, thermal formation, and occurrence, predominantly in plant tissues (leaves, fruits, flowers, and vegetables) or from other sources (beverages and spices). In the introductory chapter, they proposed a mechanism for the conversion of carotenoids into aromas, comprising three general steps: (1) an oxidative cleavage, (2) an enzymatic transformation, and (3) acid catalyzed conversions. Particularly for  $\alpha$ - or  $\beta$ -carotene, the final product,  $\alpha$ - or  $\beta$ -ionone,

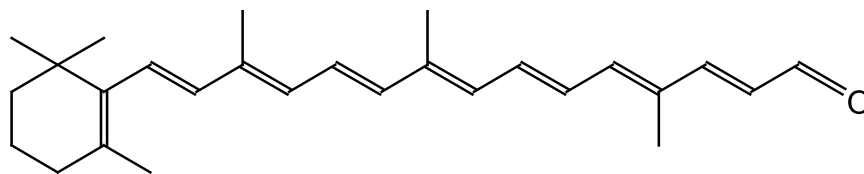


FIG. 8. Chemical structure of  $\beta$ -apo-10'-carotenal.



**TABLE 2**  
Number of carbon atoms, cleavage position, examples, and chemical structure of C<sub>9</sub>-to C<sub>13</sub>-norisoprenoids

Carbon number	Cleavage position	Compound name	Structure
C <sub>9</sub>	6-7	Isophorone	
C <sub>10</sub>	7-8	$\alpha$ -cyclocitral	
C <sub>11</sub>	8-9	$\beta$ -homocyclocitral	
C <sub>13</sub>	9-10	Ionones ( $\alpha$ -ionone)	
		Damascones ( $\beta$ -damascenone)	
		Megastigmanes (megastigma-4,6,8-triene)	
		Others: Vitispirane	
		Oxoedulan	
		Grasshopper ketone	

respectively, is obtained after the first step. On the other side, the primary breakdown product of neoxanthin, the grasshopper ketone undergoes a series of reactions for the generation of  $\beta$ -damascenone, the best known damascone for its rose-like note.

In the attempt to find the odorous principle of violets, the first synthesis of norisoprenoids was composed of a mixture of isomeric ionones. Almost 40 years later, the floral smelling (violet-like) compound,  $\beta$ -ionone, with an odor threshold of 0.007 ppb (in water), was isolated from a natural source

(*Boronia megastigma*). Since then, studies regarding the isolation and identification of further volatile compounds have been conducted. Regarding its importance in industrial applications and as starting materials for other natural products (vitamin A, carotenoids, edulan derivatives, and theaspiranes) ionones, mostly  $\beta$ -ionone, have drawn particular attention. Therefore, their preparation, even from a chemical point of view, and properties have been subject of study (Brenna et al. 2002). Finally, the research on carotenoid-derived aroma compounds during the past years has focused on non-volatile constituents due to the fact that in plant tissues they are predominantly found as bound forms, i.e., glycosylated. Apart from norisoprenoids, the aglycone moiety found in glycosidic aroma precursors can be monoterpenes and benzene derivatives, thus converting glycosidases or other hydrolases from plant or microbial sources as an ideal means for volatile release (Sarry and Günata 2004). Within the microbiological choice, the hydrolysis concerning the winemaking process has been the most studied. As an example, the ability to release aromas from a glycosidic extract of Muscat grape juice of different wine and non-wine yeasts strains was evaluated by Fernández-González et al. (2003). *Hanseniaspora uvarum* (wine yeast) and *Candida molischiana* (non-wine yeast) yielded the highest concentrations and varieties of volatiles.

Direct breakdown for the production of carotenoid-derived aroma compounds involve two methods: non-enzymatic and enzymatic. The first one comprise physicochemical treatments, such as photo-oxygenation, auto-oxidation, and thermal degradation. Within the enzymatic option, in addition to CCD, which were introduced in the former section, alternative enzymes (lipoxygenases, xanthine oxidase, phenoloxidases, and peroxidases) involving the co-oxidation of carotenoids, i.e.,  $\beta$ -carotene (Bossler and Belin 1994; Wu et al. 1999; Waché et al. 2002, 2006) can be employed. Buonauro and Servili (1999) reported on the activity enhancement, caused by a bacterial infection, of a lipoxygenase (LOX) from pepper (*Capsicum annuum* L.), responsible for the generation of volatile compounds. Leaf inoculation was accomplished with water as a control and two *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains (virulent and avirulent to pepper). For the avirulent infection, a considerable increase was observed in levels of volatiles derived from the LOX pathway, such as (*E,E*)-2,4-hexadienal, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol, 2,4-hexadienal, and 2,4-eptadienal. In particular, after 12 h of inoculation,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ionone, derived from LOX degrading action over carotenoids, exhibited an 8.4 and 10.6 fold increase, respectively, compared to the control levels. A hypothetical explanation for the occurrence of the norisoprenoids might be the plant response towards the bacterial infection, as it is known that they can act as antibacterial agents (Anzaldi et al. 1999). Therefore, this research constitutes a very novel study, involving the association between a plant and a bacteria, in which the pathogenic interaction results in the production of volatiles derived from LOX action.

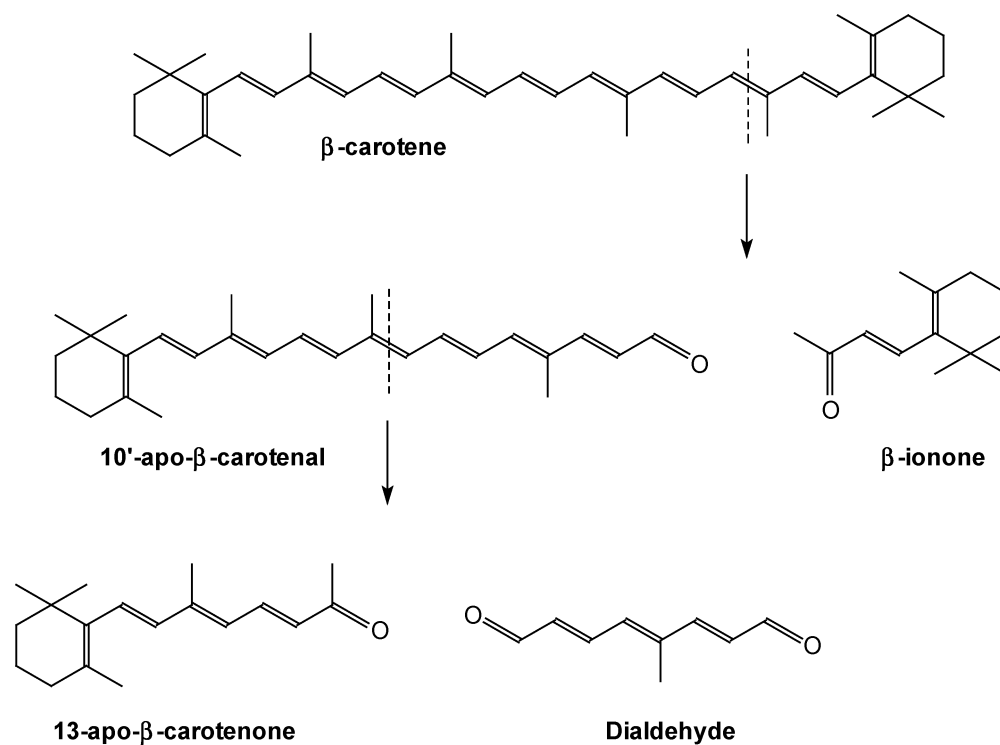
## CAROTENOID-DERIVED AROMA COMPOUNDS PRODUCTION BY PLANT DIOXYGENASES

To date, research concerning the enzymatic generation of carotenoid-derived aroma compounds has mostly been achieved in plants. Characterization of the enzymes responsible for cleaving  $\beta$ -carotene to  $\beta$ -ionone as the major product was done in quince (*Cydonia oblonga*) (Fleischmann et al. 2002) and star fruit (*Averrhoa carambola*) (Fleischmann et al. 2003). In both cases, degradation of the carotenoid was only detected in the extracts obtained from ripened fruit. On the other hand, based on the homology to *A. thaliana* genes encoding dioxygenases from *A. thaliana* (Schwartz et al. 2001), other CCDs from saffron crocus (*Crocus sativus*) (Bouvier et al. 2003), tomato (*Lycopersicon esculentum*) (Simkin et al. 2004a), petunia (*Petunia hybrida*) (Simkin et al. 2004b), grapes (*Vitis vinicola*) (Mathieu et al. 2005), and melon (*Cucumis melo*) (Ibdah et al. 2006) have been successfully cloned and expressed. After the sequence analysis, homology between them was above the 80%, and depending on the carotenoid substrate, two different C<sub>13</sub>-norisoprenoids and one C<sub>14</sub>-dialdehyde were generated. Particularly for the case of *Crocus sativus*, although a dioxygenase (CsCCD) cleaving at the 9-10 (9'-10') double bonds was identified, another dioxygenase (CsZCD), responsible for the 7-8 (7'-8') breakdown of zeaxanthin was also found. When studying plant signaling in *A. thaliana* mutants, a carotenoid cleavage dioxygenase (CCD7), involved in the regulation of shoot branching, was discovered (Booker et al. 2004). Afterwards, it was found that this enzyme (AtCCD7) cleaves  $\beta$ -carotene in a different manner (Schwartz et al. 2004). Although the cleavage at the 9-10 position also took place, the obtained products were  $\beta$ -ionone and a C<sub>27</sub>-apocarotenal, indicating an asymmetrical breakdown. This last product (10'-apo- $\beta$ -carotenal) is sequentially cleaved by a second dioxygenase (AtCCD8), rendering a 13-apo- $\beta$ -carotenone (C<sub>18</sub>) and a C<sub>9</sub>-dialdehyde (Figure 9). Very interestingly, Lewinsohn et al. (2005) studied the similarity between tomato and watermelon in the carotenoid content of mutants, evidenced by different flesh pigmentation patterns. Sets of volatiles (monoterpenes and norisoprenoids) derived from the pigments, varied according to the occurrence and/or the proportion of the carotenoids present in the wild-type and the mutant species.

## CAROTENOID-DERIVED AROMA COMPOUNDS PRODUCTION BY MICROBIAL OXYGENASES

### A 7,8 (7',8')-Cleaving Oxygenase from *Microcystis* PCC 7806

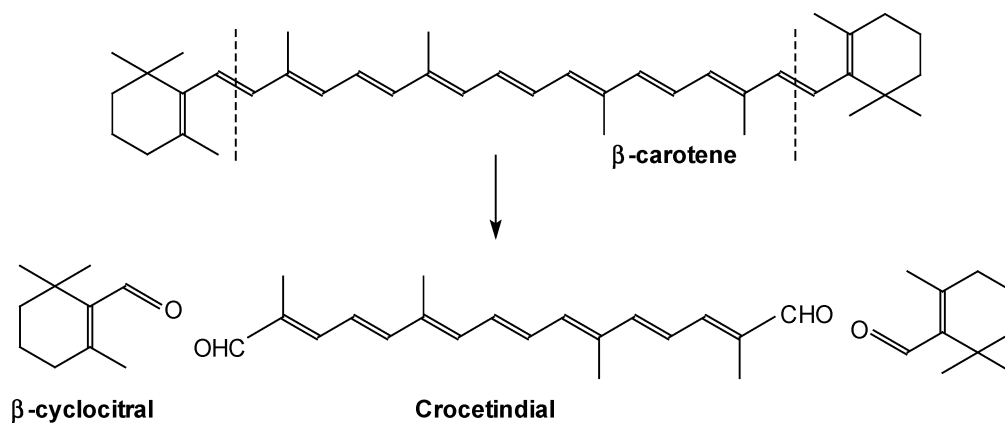
Aroma compounds derived from carotenoid breakdown and isolated from microorganisms were reported in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, with  $\beta$ -cyclocitral as the major compound liberated (Jüttner 1976). Even though plant dioxygenases have been predominantly reported in literature, cyanobacteria represent a good source of carotenoid cleaving oxygenases.



**FIG. 9.** Asymmetrical cleavage of  $\beta$ -carotene by AtCCD7 and its subsequent breakdown by AtCCD8 (Schwartz et al. 2004).

A membrane bound microbial oxygenase, termed  $\beta$ -carotene oxygenase, was first described by Jüttner and Höflacher (1985) in the genus *Microcystis*, particularly *Microcystis* PCC 7806. When comparing native versus activated cells, obtained after freezing the cyanobacterial pellet, a marked change in the pigment composition, associated with  $\beta$ -cyclocitral occurrence, was detected. A decrease in  $\beta$ -carotene and zeaxanthin levels was accompanied with the apparition of crocetindial. The compounds generated were characterized and the stoichiometric relationship was calculated. Per molecule of carotenoid, one molecule of crocetindial and two molecules of  $\beta$ -cyclocitral

from  $\beta$ -carotene (or two molecules of hydroxy- $\beta$ -cyclocitral from zeaxanthin) were obtained, suggesting a symmetrical cleavage at the 7,8 and 7',8' positions (Figure 10). No decrease was observed for other pigments like myxoxanthophyll and echinenone, possibly due to differences in their chemical structure or their location in the cell, not allowing the contact with the enzyme. When focusing on the oxygenase, no reaction could proceed under strict anaerobic conditions, pointing out dioxygen as the oxidant in the degradation of the carotene, which in turn was incorporated into the  $\beta$ -cyclocitral molecule. No  $\beta$ -carotene co-oxidation attributed to fatty acids appeared to be



**FIG. 10.** Symmetrical cleavage of  $\beta$ -carotene by a membrane bound dioxigenase from the cyanobacteria *Microcystis* PCC 7806 (Jüttner and Höflacher 1985).

involved in the reaction mechanism, and iron seemed to play a crucial role as part of the enzyme.

### Compounds with Aroma from *Calothrix* and *Plectonema* Cultures

Further studies showed that, in spite of producing unpleasant odors, cyanobacteria might also be an excellent source of norisoprenoids. The origin, whether bio- or non biogenic, of water off-flavor components, was determined in axenic cultures of *Calothrix* (*C. parietina* PCC 6303 and *Calothrix* sp. PCC 7507) and *Plectonema* (*P. notatum* and *Plectonema* sp. PCC 7410) (Höckelmann and Jüttner 2004). Both genus are commonly found in cyanobacterial biofilms of streams and littoral lake zones. In addition to aliphatic alcohols, ketones, and long chain hydrocarbons, isoprenoids represented a large group of odor compounds, from which all except limonene appeared to have a biogenic origin, measured by  $^{13}\text{C}$ -labelling.  $\text{C}_{13}$ - ( $\beta$ -ionone and dihydro- $\beta$ -ionone),  $\text{C}_{11}$ - (dihydroactinidiolide),  $\text{C}_{10}$ - ( $\beta$ -cyclocitral), and  $\text{C}_9$ -compounds (2,6,6-trimethylcyclohexanone and 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone) were detected in *C. parietina* and the two strains of *Plectonema*.  $\beta$ -cyclocitral, was only present in *Plectonema*, which together with dihydro- $\beta$ -ionone, suggested further transformation, i.e., reduction reactions, of their respective preceding molecules,  $\beta$ -cyclogeraniol and  $\beta$ -ionone. Additionally to *C. parietina* and *Plectoderma*, *Phormidium* sp. cultured under monoxenic conditions, proved to be a new producer of  $\beta$ -ionone derivatives, such as dihydro- $\beta$ -ionol, tetrahydroionone, and 4-oxo- $\beta$ -ionone (Höckelmann and Jüttner 2005). Based on *Microcystis* (Jüttner and Höflacher 1985), in all cases, oxygenases seemed responsible for carotenoid degradation and the generation of their breakdown products.

### Three Oxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with Different Cleaving Activities

Recently, Marasco et al. (2006) found predicted gene homologs of eukaryotic CCDs to be present in different cyanobacteria of the genus *Nostoc*, *Prochlorococcus*, *Synechocystis*, and *Synechococcus*. After sequence alignments, in some cases, very low identity was observed between cyanobacterial CCDs, in contrast to the higher homology degrees shared with the plant control dioxygenase from *A. thaliana* (AtCCD1) (Schwartz et al. 2001). Cloning and expression of the cleaving dioxygenases genes were carried out in *Escherichia coli* (Marasco et al. 2006). These cells were previously engineered to co-express different

sets of genes involved in carotenoid biosynthesis; thus, different types of  $\text{C}_{40}$ -carotenoids ( $\beta$ -carotene, zeaxanthin, torulene, and lycopene) and a novel linear  $\text{C}_{30}$ -carotenoid (diapocarotenial) were tested. The highest loss of color in the *E. coli* cells was observed for AtCCD1, probably implying that the carotenoid substrates employed for the microbial enzymes were not their natural ones or an affection in their accessibility might be responsible for these results. However, among the cyanobacterial dioxygenases, NSC1 and NSC2 from *Nostoc* sp. PCC 7120 and SYO from *Synechococcus elongates* PCC 7942 exhibited the highest bleaching activity.

The three enzymes from *Nostoc* sp. PCC 7120 were chosen for further characterization (Marasco et al. 2006), even though  $\beta$ -carotene levels in cells expressing NSC3 were quite similar to those quantified in the negative control (empty vector) cell. For *in vitro* assays, it was necessary to improve the protein solubility, purify the enzymes, and set the appropriate conditions for the measurement. Histidine tagging at the N-terminus resulted in the loss of the cleaving activity. The characterization of the cleavage for each dioxygenase was performed, rendering the following results. NSC1 was able to cleave  $\beta$ -carotene as well as  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Figure 11) at the 9,10 (9',10') and 9,10 double bonds, respectively. In both cases, the volatile  $\text{C}_{13}$ -norisoprenoid,  $\beta$ -ionone, was identified by GC/MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry). Additional products of the apocarotenoid suggested the occurrence, with less extent, of the breakdown at the 7,8 position. A 9,10 cleavage was also observed for NSC3 with a certain particularity. Although no breakdown of the carotenoids tested *in vivo* was detected, after the *in vitro* assay, this enzyme exhibited cleaving activity of  $\beta$ -apo-8'-carotenal. Therefore, NSC3 constituted the first case of a dioxygenase cleaving apocarotenoids at the 9,10 position.

For NSC2, trans-retinal was detected either with  $\beta$ -carotene or  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Marasco et al. 2006). These results suggested the occurrence of the breakdown at the 15,15' position, similar to the one performed by the firstly reported dioxygenase (Diox1) from *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ruch et al. 2005) or SYC2, as called by Marasco et al. (2006). However, the latter enzyme was only able to cleave apocarotenoids ( $\beta$ -apocarotenals, (3R)-3-OH- $\beta$ -apo-carotenals, and apo-lycopenals), with different velocities and values of  $K_m$  calculated depending on the substrate (Ruch et al. 2005). The structure of this enzyme, later called SynACO (*Synechocystis* apo-carotenoid oxygenase), was solved at a resolution of 2.4 Å, exhibiting a cavity that might act as a bottleneck by probably hindering the

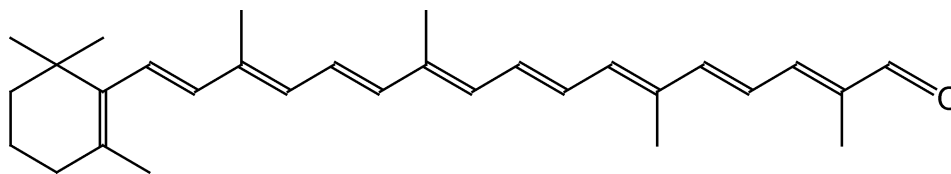


FIG. 11. Chemical structure of  $\beta$ -apo-8'-carotenal.

$\beta$ -ionone end-group and positioning correctly the substrate for retinal formation (Kloer et al. 2005). At the same time and independently to the research group of Schmidt-Dannert (Marasco et al. 2006), Scherzinger and coworkers (2006) also focused on *Nostoc* sp. PCC 7120, mainly to the oxygenase responsible for retinal formation, NosACO (Nostoc apo-carotenoid oxygenase). The latter enzyme was able to cleave different  $\beta$ -apocarotenals, (3R)-3-OH- $\beta$ -apocarotenals, apo-lycopenals, and the corresponding alcohols, depending on the substrate chain length. Finally, based on the crystal structure of SynACO (Kloer et al. 2005), an homology model was generated for NosACO, indicating that both enzymes are membrane proteins (Scherzinger et al. 2006).

According to the report by Marasco et al. (2006), where NSC1, NSC2, and NSC3 were identified, the genome of this cyanobacterium contains three members of the carotenoid oxygenase family (NosACO, NosDiox2, and NosDiox3) (Scherzinger et al. 2006). Nevertheless, in the study performed by Scherzinger and collaborators (2006), no breakdown of  $\beta$ -carotene was observed *in vivo*, nor cleavage of this carotene or other major carotenoid compounds (echinenone and myxoxanthophyll) was found *in vitro*. Even though the findings on the substrate cleaved by NSC2 (Marasco et al. 2006) and NosACO (Scherzinger et al. 2006) might apparently seem contradictory, the first group measured a very low breakdown activity on full-length carotenoids, i.e.,  $\beta$ -carotene. Studies concerning cyanobacteria are expected to be accomplished, as this field offers an exploitable option for the identification, isolation, characterization, and production of (apo)carotenoid cleavage oxygenases.

## CAROTENOID-DERIVED AROMA COMPOUNDS PRODUCTION BY MICROBIAL CELLS

### Bioconversion of Lutein to Tobacco Aroma Compounds

The bioconversion process of lutein to products with aroma, carried out by a microbial mixture, was reported by Sánchez-Contreras et al. (2000). With the purpose of screening microorganisms able to degrade lutein, the carotenoid was added to a chemically defined solid medium as an oily extract. This extract, mainly composed of the xanthophyll (89% lutein), was obtained from the dehydration process of marigold flower (*Tagetes erecta*), representing as well the microbiological source for the screening. Therefore, due to their ability to grow on lutein as the only carbon source, our research group isolated nineteen microbial colonies. Primarily, pigment degradation was visualized by the appearance of colorless halos around the colony. When grown in submerged cultures, only two out of the nineteen colonies were capable for producing volatile compounds. Regarding its better efficiency for degrading lutein and its unique ability for generating a strong tobacco aroma, one of them was selected for further study. After purification, it was found that the microbial colony was comprised by two organisms, a bacterium and a yeast in a 100:1 proportion (Sánchez-Contreras

et al. 2000), later identified as *Paenibacillus amylolyticus* and *Trichosporon asahii*, respectively (Rodríguez-Bustamante et al. 2005).

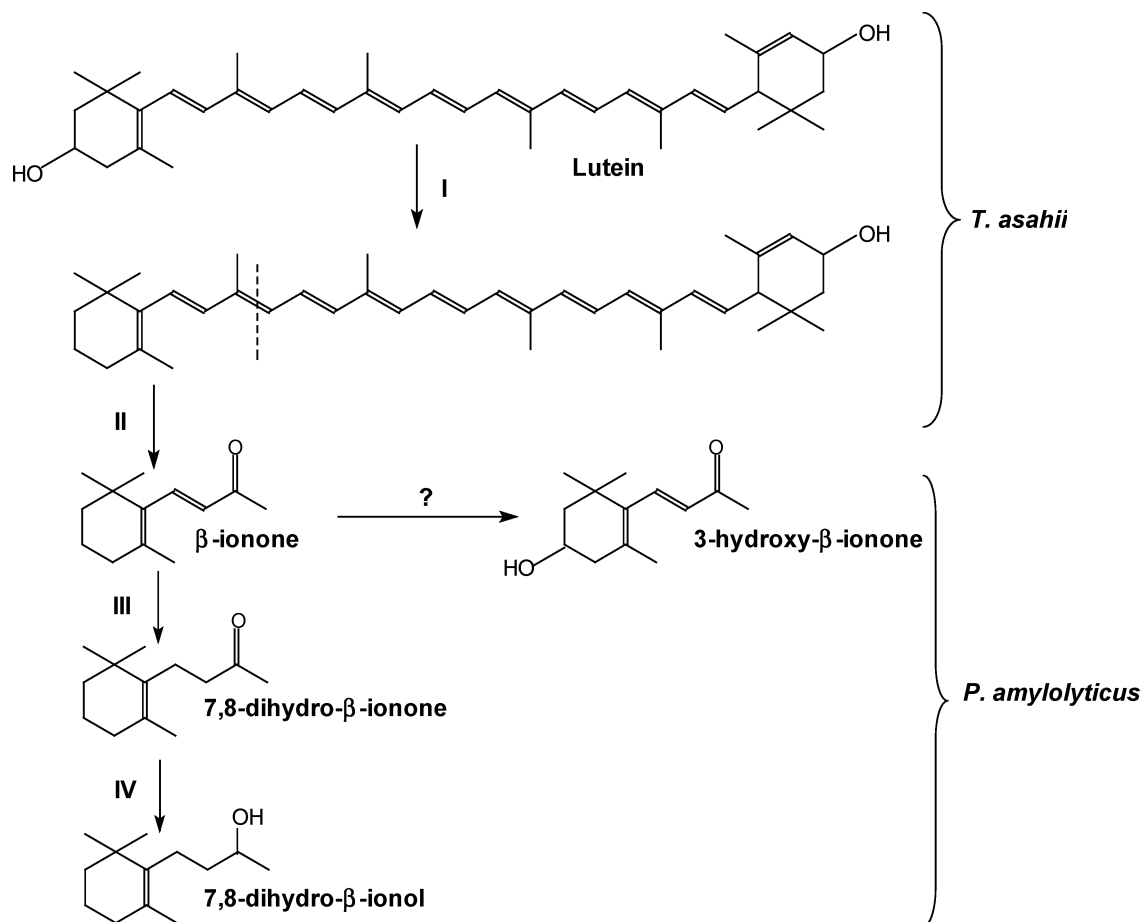
A 60% of lutein degradation was quantified in the presence of both microorganisms; whereas, when cultured separately, lower values were measured (Sánchez-Contreras et al. 2000; Maldonado-Robledo et al. 2003). At 96 h of the process, a considerable decrease in the absorption profile of organic extracts from the culture medium, corresponding to lutein (430, 445, and 460 nm) was observed. On the other side, an increasing peak at 270 nm, which might be correlated to the compounds responsible for the tobacco aroma, was registered in the absorption spectra (Sánchez-Contreras et al. 2000). Burton and Kasperbauer (1985) observed the decrease in chlorophyll and carotenoid (neoxanthin, violaxanthin, lutein, and  $\beta$ -carotene) content of tobacco leaves during senescence and curing, so the breakdown of lutein was further studied. In order to improve the degradation, different agitation conditions (0, 60, and 100 rpm) were tested, finding that the intermediate stirring allowed a 95% of carotenoid breakdown and a better yield volatile formation (Sánchez-Contreras et al. 2000). Using this agitation speed, a complete fermentation kinetics was carried out, following the evolution of microbial growth, consumption of lutein, and generation of products with aroma. A negligible carotenoid degradation took place in those conditions, and no volatile production was registered in the control without inoculum, thus eliminating the fermentation conditions as responsible for lutein conversion. However, compounds with a strong tobacco aroma were synthesized from lutein only when both microorganisms were present in the culture.

Analysis of the volatiles by GC/MS at three different times (0, 36, and 96 h) of the process pointed out that at 36 h,  $\beta$ -ionone comprised the only lutein derived product, while no  $\alpha$ -ionone was detected. At the final time of the process, the following products were identified in different percentages:  $\beta$ -ionone (9.4%) and its hydrogenated derivatives: 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol (84.2%), 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone (3.5%), and 3-hydroxy- $\beta$ -ionone (2.9%) (Sánchez-Contreras et al. 2000). Wahlberg (2002) focused on norisoprenoids from tobacco and pointed out  $\beta$ -ionone,  $\alpha$ -ionone, 3-hydroxy- $\beta$ -ionone, and 3-hydroxy-5,6-epoxy- $\beta$ -ionone as the identified primary cleavage products. The fact of not detecting 3-hydroxy- $\beta$ -ionone at the initial time of the bioconversion process of lutein might indicate that this compound is first dehydroxylated before cleavage (Sánchez-Contreras et al. 2000). On the other side, the two steps transformation of  $\beta$ -ionone to 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol by immobilized cells of *Nicotiana tabacum* were reported by Tang and Suga (1994). Hypothetically, a similar ionone conversion scheme might be followed from  $\beta$ -ionone, suggesting the probable existence of two reductases. When zeaxanthin, a xanthophyll similar to lutein but with two  $\beta$ -rings, was employed, the products generated were doubled (Sánchez-Contreras et al. 2000). These results suggested that an asymmetrical lutein breakdown took place and that the

cleaving system exhibited preference for cyclic  $\beta$ -bonds. Consequently, the bioconversion route of lutein to tobacco aroma compounds, constituted by four steps (dehydroxylation,  $\beta$ -ionone synthesis via carotenoid cleavage, and two consecutive transformations of the ionone into its reduced derivatives) was proposed (Figure 12). No explanation on the post-occurrence of 3-hydroxy- $\beta$ -ionone was given.

The synthesis of ionone derivatives from  $\alpha$ - or  $\beta$ -ionone as starting materials has been achieved using microorganisms such as *Aspergillus niger* (Mikami et al. 1981; Yamazaki et al. 1988; Larroche et al. 1995; Grivel and Larroche 2001), *Lasidiplodia theobromae* (Krasnobajew and Helmiger 1982), and *Streptomyces* strains (Lutz-Wahl et al. 1988). Likewise to ionones, Schoch et al. (1991) described the microbial conversion of  $\alpha$ -damascone to its oxygenated derivatives by *Botrytis cinerea*, a fungal genus used to carry out different types of biotransformations (Aleu and González Collado 2001). Nevertheless, the study with lutein constituted the first report on coupled microbial action responsible for the generation of norisoprenoids from a carotenoid substrate (Sánchez-Contreras et al. 2000).

In order to determine the role exerted by each microorganism in the bioconversion pathway, *T. asahii* and *P. amylolyticus* were grown independently (Maldonado-Robledo et al. 2003). As a reference, the microbial mixture was also employed in the experiments, agreeing with the work by Sánchez-Contreras et al. (2000); the tobacco aroma was only produced when the two microbial cells were used together. *T. asahii* cultures supplemented with lutein showed  $\beta$ -ionone formation, meanwhile no reduced derivatives of this compound were detected. In contrast to the mixture, where  $\beta$ -ionone concentration decreased after 24 h of the process, the levels of the ionone obtained from *T. asahii* alone, remained constant after 48 h. *P. amylolyticus* cells grown in the presence of the xanthophyll did not produce any volatiles at all. On the other hand, when studying the ability of each microorganism to produce the tobacco aroma from  $\beta$ -ionone, only in the mixed, as well as in the bacterial cultures, the hydrogenated derivatives of the C<sub>13</sub>-norisoprenoid were found. As mentioned above, in addition to their antibacterial properties (Anzaldi et al. 1999), ionones exert an antifungal action, presumably by inhibiting the respiratory enzymes (Larroche et al. 1995), so its effect over the microbial growth was evaluated.



**FIG. 12.** Bioconversion scheme of lutein to tobacco aroma compounds, including the specific role of the microorganisms involved in it (Sánchez-Contreras et al. 2000; Maldonado-Robledo et al. 2003).

Although both microorganism were susceptible to the ionone, the yeast exhibited more sensitivity to lower concentrations of this compound.

Subsequent experiments showed that the bacterium was able to incorporate  $\beta$ -ionone, transform it into the aroma compounds, and secrete them to the culture medium (Maldonado-Robledo et al. 2003). These actions resulted in better microbial growth and in the detoxification of the culture medium (Rodríguez-Bustamante et al. 2006). Therefore, it was concluded that the bioconversion pathway of lutein could be divided in two parts, with respect to the role played by each microorganism (Figure 12). The first part of the process, performed by *T. asahii*, comprised the carotenoid cleavage to render  $\beta$ -ionone, while *P. amylolyticus* is responsible for assimilating and reducing this compound to yield the products with a tobacco note. Apparently more beneficial to the fungus, a microbial association of this type, which is involved in the synthesis of carotenoid-derived aromas, was firstly described by Maldonado-Robledo et al. (2003).

Research on this process is still going on. Studies focused on maximizing the aroma production and designing a recovery system of the synthesized volatiles, i.e.  $\beta$ -ionone, have been recently published (Rodríguez-Bustamante et al. 2005, 2006). By following a classical design of experiments methodology, the effect of different components of the culture medium was evaluated, and an almost 10-fold increase in the titer was attained. Surprisingly, in spite of its low amount, compared to other nutrients, a negative and significant estimate was calculated for glucose (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). Therefore, an inverse relationship has been observed between the sugar concentration and the production of the aroma compounds (Rodríguez-Bustamante et al., in preparation). On the other side, after increasing the agitation rate in *T. asahii* cultures, a decrease in the production of  $\beta$ -ionone was observed, as described earlier by Sánchez-Contreras and collaborators (2000) for volatiles generated from mixed cultures. Therefore, by taking advantage of the ionone volatility, a headspace method was employed, reaching a 98% recovery of this compound with the aid of an adsorbent (Rodríguez-Bustamante et al. 2006). Thus, the use of a mesoporous silicate material allowed a 4.5-fold higher recovery than the obtained with a commercial adsorbent (silica gel), even though the surface areas were equaled. Currently, we are investigating the enzymes involved in the bioconversion route. For this purpose some of them were purified, sequenced and then will be cloned and overexpressed.

### Fungal Cleavage of $\beta$ -Carotene to Flavor Compounds

The screening of more than 50 yeasts and filamentous fungi, known for being involved in terpene reactions (synthesis or biotransformations), was performed by Zorn and coworkers (2003a). Discrimination between degrading and non-degrading organisms was also accomplished by a visual method, in which  $\beta$ -carotene containing agar plates were inoculated with approximately 1 cm<sup>2</sup> of agar pieces covered with mycelium. Depending on the organism (yeast or filamentous fungus), after one or two

TABLE 3

Screening of the  $\beta$ -carotene degrading fungi (Zorn et al. 2003a)

Organism	Fungus type	Carotene bleaching
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Yeast	W <sup>1</sup>
<i>Cyathus pallidus</i>	Basidiomycete	S <sup>2</sup>
<i>Ganoderma applanatum</i>	Basidiomycete	S
<i>Hypomyces odoratus</i>	Ascomycete	S
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Basidiomycete	S
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Basidiomycete	S
<i>Marasmius scorodoni</i>	Basidiomycete	S
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Yeast	W
<i>Trametes suaveolens</i>	Basidiomycete	S
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomycete	S

<sup>1</sup>W (weak).

<sup>2</sup>S (strong).

weeks, carotenoid bleaching was only observed in ten of the strains tested, exhibiting, as defined by the authors, strong (S) or weak (W) discoloration (see Table 3).

Positive carotenoid bleaching fungi were further studied. Low yields of dihydroactinidiolide as the sole product were measured in submerged cultures of *G. applanatum*, *H. odoratus*, *K. mutabilis*, and *T. suaveolens*. Inoculum-free medium and cultures with no addition of  $\beta$ -carotene, where no volatiles were detected, served as negative controls.

As pointed out by the pigment-fading test, it was thought that the enzymes responsible for the carotenoid degradation were extracellular; therefore, the possibility of using mycelium-free medium instead was contemplated.  $\beta$ -Ionone,  $\beta$ -cyclocitral, dihydroactinidiolide, and 2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone were found in the culture supernatants obtained from three basidiomycetes, with the ionone as the major compound in all cases. *I. benzoinum*, *M. scorodoni*, and *T. versicolor*, exhibited a  $\beta$ -carotene degradation values of 95, 93, and 98%, respectively, and even though *C. pallidus* was able to break down 85% of the carotene, no aroma compounds were detected. Ultrafiltration of the supernatants revealed the involvement of enzymatic activity in the cleaving process, as no carotenoid degradation was found in the permeates, contrary to the observed with the retentates. This is the first time that medium free of mycelium with secreted fungal enzymes was employed for converting  $\beta$ -carotene into aroma compounds, primarily  $\beta$ -ionone.

Finally, the cleavage activity of *M. scorodoni* was partially characterized by a photometric method, monitoring the decrease in the absorbance of  $\beta$ -carotene with respect to time. A rapid degradation profile, in which degradation of the 40% of the initially added carotenoid after 60 min, was observed. Control blanks, using water instead of the extracellular proteins, exhibited practically no breakdown even after 120 min. Maximum activity took place at 27°C and a pH value of 5.0.

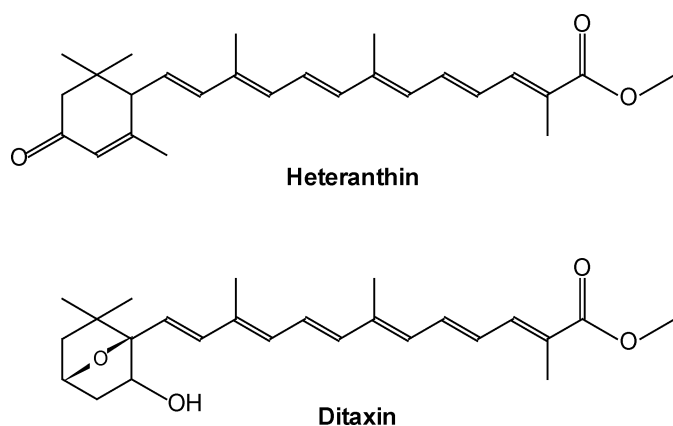


FIG. 13. Chemical structure of the apocarotenoids heteranthin and ditaxin (Méndez-Robles et al. 2006).

### Generation of Aroma Compounds from a Newly Discovered Apocarotenoid

*Ditaxis heterantha* is a native plant of the Euphorbiaceae family that grows in the semiarid regions of Mexico. As the seed endosperm possesses an intense yellow coloration, its total pigment was extracted for chemical characterization. After purification it was found that the pigment could be separated into seven fractions, exhibiting three maximal peaks in their absorbance spectrum, a typical property of carotenoids. From these fractions, two new apocarotenoids, F4 and F5, later named heteranthin and ditaxin (Figure 13), respectively, were in major proportion (Méndez-Robles et al. 2004, 2006).

Based on the methodology previously described by Sánchez-Contreras et al. (2000), nine microbial colonies, grown on lutein as their only carbon source and able to degrade it, were isolated

from *T. erecta* (Del Toro-Sánchez et al. 2006). When their capability to cleave the total pigment from *D. heterantha* seeds and its two main fractions was tested, only one of them was able to degrade the pigment and heteranthin. A herbal aroma was formed in both cases, while practically no volatiles were detected from cultures supplemented with ditaxin. Microscopic observations of the colony showed a yeast morphology, and molecular methods enabled the identification of the yeast as *Saccharomyces cerevisiae* by database comparison of the DNA region for the 5.8S rRNA gene (Del Toro-Sánchez et al. 2006).

Better pigment and apocarotenoid degradation, as well as aroma production, occurred at an agitation rate of 60 rpm. *S. cerevisiae* cells were cultured supplemented with either the total pigment or heteranthin, monitoring both substrates degradation, aroma generation, glucose consumption, and growth kinetics. The maximum aroma production was attained at 60 h of the process, with heteranthin yielding 15% less volatile compounds. In both cases the C<sub>10</sub> compounds, safranal and 3-hydroxy- $\beta$ -cyclocitral, represented the principal constituents in the following proportions, respectively: 26.9 and 10.8% for the total pigment, and 35.6 and 15.9% for F4. A possible degradation scheme of heteranthin to safranal was proposed (Figure 14), in which 3-hydroxy- $\beta$ -cyclocitral appeared to be the precursor of this flavor compound. However, the primary cleavage product derived from heteranthin was not identified and therefore, the initial reaction remained unknown (Del Toro-Sánchez et al. 2006). The occurrence of C<sub>13</sub>-norisoprenoids, i.e., ionones, was also observed, indicating that in addition to the cleavage at position 7,8 a breakdown at the 9,10 double bond also took place. 3-oxo- $\alpha$ -ionone, 3-oxo-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionone, and 3-oxo- $\alpha$ -ionol, probably responsible for the floral aroma perceived, were detected in higher amounts in cultures supplemented with F4 rather than

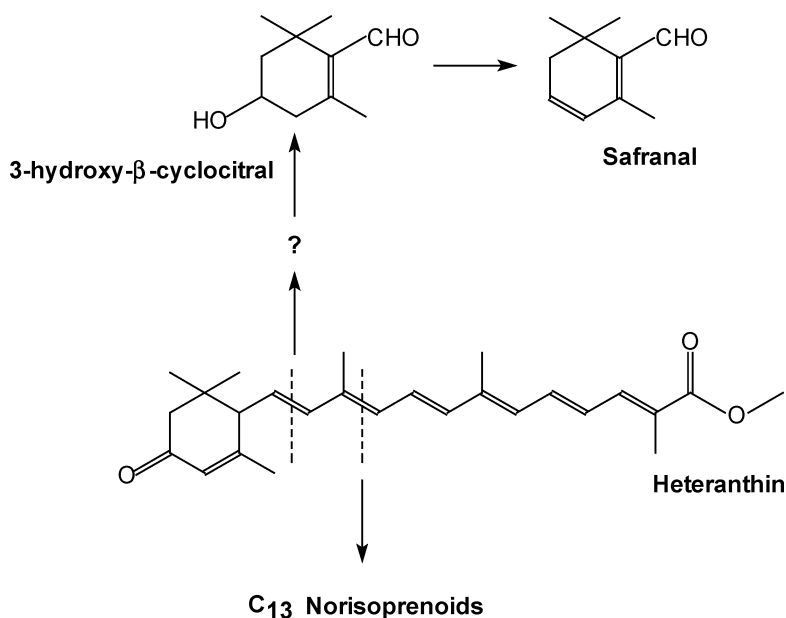


FIG. 14. Bioconversion scheme of heteranthin to safranal (Del Toro-Sánchez et al. 2006).



with the total pigment. Other heteranthin-derived volatiles detected in minor quantities were the C<sub>9</sub>-compounds: isophorone and 4-oxo-isophorone.

To obtain more information on the bioconversion process, the cleaving activity was further studied. By a color fading test, using agarose plates stained with the pigment or the apocarotenoid, halos were only observed with intracellular extracts derived from cultures grown in the presence of either substrate. No degradation took place with extracellular protein. *In vitro* analysis showed that the cleavage was due to enzymatic activity, as no significant values were measured in the negative controls, where no protein extract was added. After 60 min, a degradation of 60 and 42% of the total pigment and heteranthin was respectively registered, suggesting the possible existence of one or more intracellular oxidases involved in the process (Del Toro-Sánchez et al., in preparation).

Although its major application relies in its desirable property of transmitting color and flavor to food, saffron has been used as textile dye, beauty product, and medicinal agent. This spice, derived from *C. sativus* flower, particularly the dried stigmas, is a traditional ingredient still employed in European cuisine (Spanish, French, Italian, and with less extent, German) (Winterhalter and Straubinger 2000). The aim to identify the key components of saffron flavor (taste, aroma, and color) has driven research into knowing its chemical composition. Therefore, during the past decades extensive studies on the synthesis, nature, and stability have been performed to its volatile and non-volatile constituents.

Regarding the volatile compounds, as safranal represents the major component of the essential oil content (60–70%), for many years it was thought to be responsible for the characteristic aroma (Cadwallader 2002). Further analysis have shown the contribution of more than 100 compounds, from which a part of them is derived from glycoside precursors. However in contrast to what other authors affirm, Carmona et al. (2007) concluded that the number of volatiles in saffron is not as high as believed and the aroma profile depended of its geographical origin. The generation of aroma compounds from saffron is still unclear, although a pathway for the formation of safranal was proposed by Pfander and Schurtenberger (1982). In this process, zeaxanthin is symmetrically cleaved at the 7,8 (7', 8') positions by the dioxygenase described above (CsZCD) (Bouvier et al. 2003), resulting in the formation of picrocin and crocetin. By the action of glycosidases or during thermal treatment or cooking, the first compound might be converted into safranal (Figure 15). Very interestingly, Carmona et al. (2006) described the generation of this volatile by carotenoid thermal degradation, following a different route. As they proposed, crocetin or its ester derivatives might play a crucial role.

Even when carotenoid breakdown at the 7,8 double bond has been described in cyanobacteria (see above), the research performed by Del Toro-Sánchez and coworkers (2006) constituted the first report on microbial (apo)carotenoid cleavage resulting in safranal production. On the other side, a food flavoring application might be contemplated, as *D. heterantha* seeds are more economic than saffron, so far, the most expensive spice in the

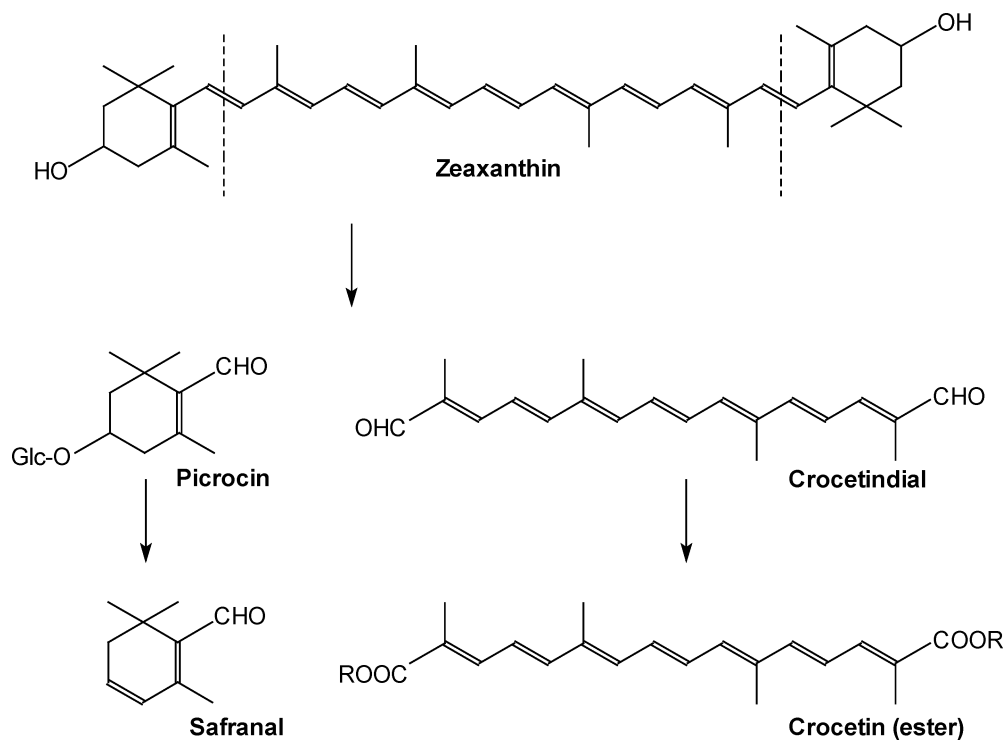


FIG. 15. The widespread pathway for safranal formation from zeaxanthin.

market. A novel possibility is opened in this area, which most probably might be further studied and later exploited in the ongoing years.

### CAROTENOID-DERIVED AROMA COMPOUNDS PRODUCTION BY OTHER CLEAVING MICROBIAL ENZYMES: A PEROXIDASE FROM *LEPISTA IRINA*

Zorn et al. (2003b) isolated and characterized on a molecular level, an enzyme, from the edible mushroom *L. irina*, able to degrade  $\beta$ -carotene. After a few days, carotenoid bleaching was observed around the mycelium grown on agar plates supplemented with the carotene. With a similar approach to their previous experiments (Zorn et al. 2003a), the supernatant obtained from submerged cultures of *L. irina* was mixed with solubilized  $\beta$ -carotene, finding almost a complete degradation after 14 h of incubation. As described above, the same volatiles were detected, with  $\beta$ -ionone as the major products; however, the occurrence of  $\beta$ -apo-10'-carotenal was revealed by an HPLC method developed for the identification of non-volatile compounds. A rapid reaction profile was observed by a kinetic assay, in which a carotenoid degradation of 90% is reached within 30 min, and the maximal amount of  $\beta$ -ionone produced is attained after 60 min.

Concentrated supernatants were analyzed by isoelectric focusing gel chromatography with immobilized pH gradient, coupled to a zymographic test. An agarose layer stained with  $\beta$ -carotene was used to cover the focused gel, and after incubation, a distinctive bleaching band was detected. After comparison with reference proteins, the isoelectric point of the enzyme responsible for carotenoid breakdown was calculated, exhibiting a value of 3.75. Next, a purification protocol for the protein of interest was established, following three separation techniques (hydrophobic interaction, anion exchange, and size exclusion chromatographies). The maximum degradation was found at the tenth day of culture, at 34°C and pH values between 3.5 and 4.0. A yield of 63% and a purification factor of 43 were attained at the end of the process. The typical absorption spectra for heme proteins was observed for the purified enzyme.

Gel electrophoresis analysis (SDS-PAGE and IEF) showed the presence of two proteins: a main band with a molecular weight of 50.5 kDa and pI of 3.75, and a second faint band of 45 kDa and pI of 3.50. However, subsequent characterization exhibited identical N-terminal sequences for both proteins, probably suggesting the occurrence of isoenzymes. Further sequence information of the main protein allowed the construction of a cDNA library, screened by means of polymerase chain reaction (PCR). A 1.28 kbp cDNA was obtained and sequenced, showing great similarity to reported peroxidase from the white rot fungus *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Deñás et al. 1999). The cloned fragment contained an open reading frame of 1083 nucleotides, which encoded a polypeptide of 361 residues with a 30 aa signal peptide. In contrast to the molecular weight estimated by SDS-PAGE, a 34.6 kDa mass was calculated, attributing this

considerable difference to a high degree of glycosylation (Zorn et al. 2003b).

Based on the sequence analysis, it was concluded that the enzyme responsible for  $\beta$ -carotene cleavage at the double bond between C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> belonged to a novel class of peroxidases. Even though the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is necessary for peroxidase activity, the purified enzyme was able of breaking down the carotenoid in the absence of peroxides. Enzymes from white rot fungi known for their degrading action over a wide variety of compounds have been described in literature; nevertheless, the work by Zorn and collaborators (2003b) represented the first report on an extracellular microbial peroxidase capable of carotenoid cleavage. Future research conducted by this group is expected in this area, as the activity observed from *M. scorodoni* might follow a similar mechanism.

### FUTURE PROSPECTS: NOT ONLY AROMAS

As stated above, flavors and fragrances have been appreciated by mankind for centuries. Traditionally, essential oils were extracted from natural substrates, making this a very tedious and laborious task. In general, the production of aromas by microbial methods offers new advantages. Novel approaches are still to come, and for the case of carotenoid-derived aroma compounds, research in various fields might certainly take place, as new substrates, enzymes and genes from different organisms (animals, plants, and microorganisms) are being discovered. A gene encoding a carotenoid oxygenase (*carX*) was identified in the ascomycete *Fusarium fujikuroi* (Thewes et al. 2005), and very recently, Prado-Cabrero et al. (2007) reported on the synthesis of retinal by the gene product. Car X expressed in engineered *E. coli* cells exhibited cleavage activity at the 15,15' double bond of  $\beta$ -carotene but not of lycopene. Additionally, *in vitro* tests showed the ability of this oxygenase to synthesize retinal from  $\beta$ -carotene, as well as from torulene,  $\gamma$ -carotene, and  $\beta$ -apo-8-carotenal (Prado-Cabrero et al. 2007).

Little is known about the function exerted by carotenoid breakdown products in living systems, with the exception of retinoids and the so-called plant hormones, both still to be studied. With the exception of the mechanism proposed by Zorn et al. (2003b) for the *L. irina* peroxidase, the oxidative cleaving reactions by oxygenases from different taxa and their regulation have not been elucidated yet, so further research is awaiting.

Besides their applications in flavoring, innovative studies have been conducted in the pharmacological sector. It has been shown that a diet rich in fruits and vegetables, considered as isoprenoid reservoirs, renders a protective effect against diverse kinds of cancer (Singletary 2000). A chemopreventive and inhibitory effect exerted by  $\beta$ -ionone has been described in cancer types such as melanoma (He et al. 1997; Jung et al. 1998), gastric adenocarcinoma (Liu et al. 2004), and hepatocarcinogenesis (de Moura Espíndola et al. 2005). In all cases, the inhibition of mevalonate synthesis, possibly representing the impairing of the malignant cells is assumed.

## ACKNOWLEDGEMENTS

During part of his doctoral studies, E. R.-B. was a scholarship recipient from CONACyT and DGEP-UNAM. The "Bioconversion of Lutein to Compounds with Tobacco Aroma" project is currently funded by DGAPA (PAPIIT): IN202707-3. We are deeply grateful to Gabriela Maldonado-Robledo for her assistance and her critical comments on the final version, and to Beatriz Ruiz and Marco A. Ortiz for their technical support in part of this work.

## REFERENCES

- Abate, A., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F.G., and Serra, S. 2004. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 32(1–2), 33–51.
- Aguedo, M., Ly, M.H., Belo, I., Teixeira, J.A., Belin, J.M., and Wache, Y. 2004. The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. *Food Technol. Biotechnol.* 42(4), 327–336.
- Aleu, J., and González Collado, I. 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 13(4–6), 77–93.
- Anzaldi, M., Sottofattori, E., Rizzetto, R., Granello de Casaletto, B., and Balbi, A. 1999. Synthesis and antimicrobial activity of heterocyclic ionone-like derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 34 (10), 837–842.
- Armstrong, D.W., Brown, L.A., Porter, S., and Rutten, R. 1993. Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. In *Progress in flavour precursor studies*, eds. P. Schreier, and P. Winterhalter, 425–438. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Armstrong, G.A. 1994. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176(16), 4795–4802.
- Armstrong, G.A. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 629–629.
- Auldridge, M.E., McCarty, D., and Klee, H.J. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(3), 315–321.
- Berger, R.G. 1995. *Aroma biotechnology*. Springer, Heidelberg.
- Berger, R.G., Krings, U., and Zorn, H. 2002. Biotechnological flavour generation. In *Food flavour technology*, ed. A.J. Taylor, 60–104. Sheffield, UK: Academic Press.
- Bhosale, P., and Bernstein, P.S. 2005. Microbial xanthophylls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(4), 445–455.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., and Leyser, O. 2004. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* 14(14), 1232–1238.
- Bosser, A., and Belin, J.M. 1994. Synthesis of  $\beta$ -ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/ $\beta$ -carotene system involving free radical formation. *Biotechnol. Prog.* 10, 129–133.
- Bouvier, F., Suire, C., Muttener, J., and Camara, B. 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15(1), 47–62.
- Bouvier, F., Isner, J.C., Dogbo, O., and Camara, B. 2005. Oxidative tailoring of carotenoids: A prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci.* 10(4), 187–194.
- Brenna, E., Fuganti, C., Serra, S., and Kraft, P. 2002. Optically active ionones and derivatives: Preparation and olfactory properties. *Eur. J. Org. Chem.* 2002(6), 967–978.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9 (15), 1551–1558.
- Britton, G. 1998. Biosynthesis of carotenoids. In *Plant pigments*, ed. T.W. Goodwin, 133–182. USA: Academic Press.
- Buonauro, R., and Servili, M. 1999. Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54(5–6), 155–169.
- Burton, H.R., and Kasperbauer M.J. 1985. Changes in chemical composition of tobacco lamina during senescence and curing. 1. Plastid pigments. *J. Agric. Food Chem.* 33, 879–883.
- Cadwallader, K.R. 2002. Flavor chemistry of saffron. In *Carotenoid-derived aroma compounds*, eds. P. Winterhalter, and R.L. Rouseff, 220–239. USA: ACS Symposium Series 802.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M.R., and Alonso, G.L. 2006. Generation of saffron volatiles by thermal carotenoid degradation. *J. Agric. Food Chem.* 54(18), 6825–6834.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M.R., and Alonso, G.L. 2007. A new approach to saffron aroma. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(2), 145–159.
- Chang, M.C.Y., and Keasling, J.D. 2006. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat. Chem. Biol.* 2(12), 674–681.
- Cheetham, P.S.J. 2004. Bioprocesses for the manufacture of ingredients for foods and cosmetics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 86, 83–158.
- Code of Federal Regulations. 1990. 21. USA: Food and Drug Administration.
- Connolly, J.D., and Hill, R.A. 1991. *Dictionary of terpenoids*. UK: Chapman & Hall.
- de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24(2), 134–142.
- de Moura Espíndola, R., Mazzantini, R.P., Ong, T.P., de Conti, A., Heidor, R., and Moreno, F.S. 2005. Geranylgeraniol and  $\beta$ -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 26(6), 1091–1099.
- Del Toro-Sánchez, L., Sánchez, S., Ortiz, M.A., Villanueva, S., and Lugo-Cervantes, E. 2006. Generation of aroma compounds from *Ditaxis heterantha* by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(1), 155–162.
- Enzell, C. 1985. Biodegradation of carotenoids- an important route to aroma compounds. *Pure & Appl. Chem.* 57(5), 693–700.
- European Commission. 1988. Council Directive 88/388/EEC.
- Fernández-González, M., Di Stefano, R., and Briones, A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20(1), 35–41.
- Fleischmann, P., Studer, K., and Winterhalter, P. 2002. Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J. Agric. Food Chem.* 50(6), 1677–1680.
- Fleischmann, P., Watanabe, N., and Winterhalter, P. 2003. Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry* 63(2), 131–137.
- Goodwin, T.W. 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 273–297.
- Grivel, F., and Larroche, C. 2001. Phase transfer and biocatalyst behaviour during biotransformation of beta-ionone in a two-phase liquid system by immobilised *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* 7(1), 27–34.
- Harborne, J.B. 2001. Terpenoids: Lower. In *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons, Ltd www.els.net Accessed: Feb. 5, 2007.
- He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A.A., and Elson, C.E. 1997. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *J. Nutr.* 127(5), 668–674.
- Höckelmann, C., and Jüttner, F. 2004. Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of *Calothrix* and *Plectonema*. *Water Sci. Technol.* 49(9), 47–54.
- Höckelmann, C., and Jüttner, F. 2005. Off-flavours in water: Hydroxyketones and  $\beta$ -ionone derivatives as new odour compounds of freshwater cyanobacteria. *Flavour Fragr. J.* 20, 387–394.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A.A., Katzir, N., Tadmor, Y., and Lewinsohn, E. 2006. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* 67(15), 1579–1589.
- Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R., and Ohigashi, H. 2004a. The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 65(19), 2667–2678.

- Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R., and Ohigashi, H. 2004b. Biosynthesis of abscisic acid by the direct pathway via ionylideneethane in a fungus, *Cercospora cruenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(12), 2571–2580.
- Johnson, E.A., and Schroeder, W.A. 1996. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 53, 119–178.
- Jung, M., Mo, H., and Elson, C.E. 1998. Synthesis and biological activity of  $\beta$ -ionone-derived alcohols for cancer chemoprevention. *Anticancer Res.* 18(1A), 189–192.
- Jüttner, F. 1976.  $\beta$ -Cyclocitral and alkanes in *Microcystis* (Cyanophyceae). *Z. Naturforsch.* 31c, 491–495.
- Jüttner, F., and Höflacher, B. 1985. Evidence of  $\beta$ -carotene 7,8(7',8') oxygenase ( $\beta$ -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. *Arch. Microbiol.* 141(4), 337–343.
- Karnaik, V.N. 1990. Carotenoids: Recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol., B* 95(1), 1–20.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E., and von Lintig, J. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276(17), 14110–14116.
- Kloer, D.P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P., and Schulz, G.E. 2005. The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308(5719), 267–269.
- Kloer, D.P., and Schulz, G.E. 2006. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(19–20), 2291–2303.
- Kransnobajew, V., and Helminger, D. 1982. Fermentation of fragrances: Bio-transformation of  $\beta$ -ionone by *Lasiodiplodia theobromae*. *Helv. Chim. Acta* 65(5), 1590–1601.
- Krings, U., and Berger, R.G. 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49(1), 1–8.
- Kuzuyama, T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(8), 1619–1627.
- Larroche, C., Creuly, C., and Gros, J.B. 1995. Fed-batch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(2), 222–227.
- Lee, P.C., and Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(1–2), 1–11.
- Leffingwell and Associates. 2006. In Flavor & fragrance industry leaders. [www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm) Accessed: Feb. 1, 2007.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D., and Tadmor, Y. 2005. Not just colors- carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 16(9), 407–415.
- Liu, J.R., Chen, B.Q., Yang, B.F., Dong, H.W., Sun, C.H., Wang, Q., Song, G., and Song, Y.Q. 2004. Apoptosis of human gastric adenocarcinoma cells induced by  $\beta$ -ionone. *World J. Gastroenterol.* 10(3), 348–351.
- Longo, M.A., and Sanromán, M.A. 2006. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44(3), 335–353.
- Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schmidt-Dannert, C., Wohlleben, W., Hauer, B., and Schmid, R.D. 1998. Stereo- and regioselective hydroxylation of  $\alpha$ -ionone by *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10), 3878–3881.
- Maldonado-Robledo, G., Rodríguez-Bustamante, E., Sánchez-Contreras, A., Rodríguez-Sanoja, R., and Sánchez, S. 2003. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62(5–6), 484–488.
- Marasco, E.K., Vay, K., and Schmidt-Dannert, C. 2006. Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* spp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J. Biol. Chem.* 281(42), 31583–31593.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., and Günata, Z. 2005. A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C<sub>13</sub>-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* 56(420), 2721–2731.
- Maury, J., Asadollahi, M.A., Moller, K., Clark, A., and Nielsen, J. 2005. Microbial isoprenoid production: An example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 100, 19–51.
- Méndez-Robles, M.D., Flores-Chavira, C., Jaramillo-Flores, M.E., Orozco-Ávila, I., and Lugo-Cervantes, E. 2004. Chemical composition and current distribution of “azafrán de bolita” (*Ditaxis heterantha* Zucc; Euphorbiaceae): A food pigment producing plant. *Econ. Bot.* 58(4), 530–535.
- Méndez-Robles, M.D., Permady, H.H., Jaramillo-Flores, M.E., Lugo-Cervantes, E.C., Cardador-Martínez, A., Canales-Aguirre, A.A., López-Dellamary, F., Cerda-García-Rojas, C.M., and Tamariz, J. 2006. C-26 and C-30 apocarotenoids from seeds of *Ditaxis heterantha* with antioxidant activity and protection against DNA oxidative damage. *J. Nat. Prod.* 69(8), 1140–1144.
- Mijts, B.N., and Schmidt-Dannert, C. 2003. Engineering secondary metabolite pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(6), 597–602.
- Mikami, Y., Fukunaga, Y., Arita, M., and Kasaki, T. 1981. Microbial transformation of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -methylionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(3), 610–617.
- Moise, A.R., von Lintig, J., and Palczewski, K. 2005. Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in metabolism of carotenoids. *Trends Plant. Sci.* 10(4), 178–186.
- Moore, T. 1930. Vitamin A and carotene: The absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A *in vivo*. *Biochem. J.* 24(3), 692–702.
- Nes, W.D., and Zhou, W. 2001. Terpenoids: Higher. In Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd [www.els.net](http://www.els.net) Accessed: Feb. 5, 2007.
- Olson, J.A., and Krinski, N.I. 1995. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiological modulators. *FASEB J.* 9(15), 1547–1550.
- Omeliński, V.L. 1923. Aroma-producing microorganisms. *J. Bacteriol.* 8(4), 393–419.
- Pfander H., and Schurtenberger H. (1982) Biosynthesis of C<sub>20</sub>-carotenoids in *Crocus sativus* L. *Phytochemistry* 21(5), 1039–42.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J., and Al-Babili, S. 2007. Retinal biosynthesis in fungi: Characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot. Cell* 6(4), 650–657.
- Rabenhorst, J. 2000. Biotechnological production of natural aroma chemicals by fermentation processes. In Biotechnology, eds. H.J. Rehm, and G. Reed, 333–350. Weinheim, Germany: Wiley.
- Rodríguez-Bustamante, E., Maldonado-Robledo, G., Ortiz, M.A., Díaz-Ávalos, C., and Sánchez, S. 2005. Bioconversion of lutein using a microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(2), 174–182.
- Rodríguez-Bustamante, E., Maldonado-Robledo, G., Sánchez-Contreras, A., Klimova, T., Arreguín-Espinosa, R., and Sánchez, S. 2006. Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to  $\beta$ -ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(4), 568–573.
- Römer, S., and Fraser, P.D. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221(3), 305–308.
- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H., and Al-Babili, S. 2005. Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 55(4), 1015–1024.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* 31(1), 223–235.
- Sánchez-Contreras, A., Jiménez, M., and Sanchez, S. 2000. Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54(4), 528–534.
- Sandmann, G. 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385(1), 4–12.
- Sarry, J.E., and Günata, Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* 87(4), 509–521.
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D.P., Wilde, A., and Al-Babili, S. 2006. Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: *in vitro* characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem. J.* 398(3), 361–369.
- Schoch, E., Benda, I., and Schreier, P. 1991. Bioconversion of  $\alpha$ -damascone by *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1), 15–18.

- Schrader, J., Etschmann, M.M.W., Sell, D., Hilmer, J.M., and Rabenhorst, J. 2004. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds—current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.* 26(6), 463–472.
- Schwartz, S.H., Qin, X., and Loewen, M.C. 2004. The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* 279(45), 46940–46945.
- Schwartz, S.H., Qin, X., and Zeevaert, J.A.D. 2001. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* 276(27), 25208–25211.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaert, J.A.D., and McCarty, D.R. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276(5320), 1872–1874.
- Serra, S., Fuganti, C., and Brenna, E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* 23(4), 193–198.
- Simkin, A.J., Schwartz, S.H., Auldrige, M., Taylor, M.G., and Klee, H.J. 2004a. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* 40(6), 882–892.
- Simkin, A.J., Underwood, B.A., Auldrige, M., Loucas, H.M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D.G., and Klee, H.J. 2004b. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls the emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* 136(3), 3504–3514.
- Singletary, K. 2000. Diet, natural products and cancer chemoprevention. *J. Nutr.* 130(2S Suppl), 465S–466S.
- Somogyi, L.P. 1996. The flavour and fragrance industry: serving a global market. *Chem. Ind.* 4, 170–173.
- Steinhart, H., Stephan, A., and Bücking M. 2000. Advances in flavor research. *J. High. Resol. Chromatogr.* 23(7-8), 489–496.
- Tang, Y.-X., and Suga, T. 1994. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -ionones by immobilized cells of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 37(3), 737–730.
- Thewes, S., Prado-Cabrero, A., Prado, M.M., Tudzynski, B., and Avalos, J. 2005. Characterization of a gene in the *car* cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Mol. Genet. Genomics* 274(3), 217–228.
- Vandamme, E.J., and Soetaert, W. 2002. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77(12), 1323–1332.
- von Lintig, J., and Vogt, K. 2000. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving  $\beta$ -carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* 275(16), 11915–11920.
- von Lintig, J., Hessel, S., Isken, A., Kiefer, C., Lampert, J.M. Woolstra, O., and Vogt, K. 2005. Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim. Biophys. Acta* 1740(2), 122–131.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Ly, M.H., and Belin, J.M. 2002. Co-oxidation of  $\beta$ -carotene in biphasic media. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 19–20, 197–201.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., and Belin, J.M. 2006. Dispersion of  $\beta$ -carotene in processes of production of  $\beta$ -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species. *Process Biochem.* 41, 2337–2341.
- Wahlberg, I. 2002. Carotenoid-derived aroma compounds in tobacco. In Carotenoid-derived aroma compounds, eds. P. Winterhalter, and R.L. Rouseff, 131–144. USA: ACS Symposium Series 802.
- Welsh, F.W., Murray, W.D., and Williams, R.E. 1989. Microbial and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9(2), 105–169.
- Winterhalter, P., and Rouseff, R.L. eds. 2002. Carotenoid-derived aroma compounds (ACS symposium series 802) USA: ACS.
- Winterhalter, P., and Straubinger, M. 2000. Saffron-renewed interest in an ancient spice. *Food Rev. Int.* 16(1), 39–59.
- Wu, Z., Robinson, D.S., Hughes, R.K., Casey, R., Hardy, D., and West, S.I. 1999. Co-oxidation of  $\beta$ -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.* 47(12), 4899–4906.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W.D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H., and Hunziker, W. 2000. Cloning and expression of  $\beta$ , $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271(2), 334–336.
- Yamazaki, Y., Hayashi, Y., Arita, M., Hieda, T., and Mikami, Y. 1988. Microbial conversion of  $\alpha$ -ionone,  $\alpha$ -methylionone, and  $\alpha$ -isomethylionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(10), 2354–2360.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., and Berger, R.G. 2003a. Cleavage of  $\beta$ , $\beta$ -carotene by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62(4):331–336.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., and Berger, R.G. 2003b. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta$ , $\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biol. Chem.* 384(7), 1049–1056.

E. Rodríguez-Bustamante · G. Maldonado-Robledo ·  
A. Sánchez-Contreras · T. Klimova ·  
R. Arreguín-Espinosa · S. Sánchez

## Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to $\beta$ -ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material

Received: 25 November 2005 / Revised: 6 January 2006 / Accepted: 8 January 2006 / Published online: 25 February 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** In this work, we report on the synthesis and ability of the mesoporous material MCM-41 to adsorb the norisoprenoid  $\beta$ -ionone. This compound, with a violet aroma note, can be produced from lutein by the yeast *Trichosporon asahii* through a bioconversion process. We found that  $\beta$ -ionone inhibited the yeast growth and constrained aroma formation. Growth inhibition was overcome using silicate MCM-41 as sorbent device in a fermentation system that allowed product removal from the culture medium by headspace manipulation. Compared to a commercial silica gel, the mesoporous material exhibited a 4.5-fold higher  $\beta$ -ionone adsorption. Contrasting to cultures without the sorbent device, the presence of MCM-41 allowed a marked increase (14-fold) in  $\beta$ -ionone production. Our results suggested that confinement of the norisoprenoid into the sorbent material bypassed its toxicity which allowed a better  $\beta$ -ionone production.

This study represents the first report on the use of MCM-41 to recover an aroma produced by fermentation and therefore, a novel application for a mesoporous material.

### Introduction

Flavors and fragrances represent an important group of compounds for sectors of the chemical industry related to food, cosmetics, and detergents (Somogyi 1996).  $C_{13}$  norisoprenoids, also known as ionones, are potent aromas derived from the specific breakdown of carotenoids ( $\beta$ -carotene, lutein, zeaxanthin, and astaxanthin). Among them, the violet smelling  $\beta$ -ionone has an increasing commercial interest (Winterhalter 1996; Winterhalter and Rouseff 2002). The use of microorganisms offers an attractive alternative for the production of aromas in comparison with conventional organic synthesis or extraction from plants (Klings and Berger 1998; Rabenhorst 2000). Zorn et al. (2003) screened more than 50 filamentous fungi and yeasts by their ability to cleave  $\beta$ -carotene and produce flavor compounds. Among them, ten different strains showed an efficient degradation of  $\beta$ -carotene but only three (*Ischnoderma benzoinum*, *Marasmius scorodonium*, and *Trametes versicolor*) produced volatile compounds, with  $\beta$ -ionone being the main product. In an earlier work, we reported on the production of tobacco aroma compounds from lutein by a microbial system comprised by two microorganisms, later identified as *Trichosporon asahii* and *Paenibacillus amylolyticus* (Sánchez-Contreras et al. 2000, Rodríguez-Bustamante et al. 2005). In this process, *T. asahii* is responsible for cleaving lutein to  $\beta$ -ionone, whereas *P. amylolyticus* reduces  $\beta$ -ionone into its 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol derivatives, which are present in the tobacco aroma note (Maldonado-Robledo et al. 2003). When *T. asahii* cells are cultivated in YTN medium with 40  $\mu$ M lutein, a  $\beta$ -ionone production of 23.4  $\mu$ M is reached at the second day of fermentation and this production is maintained for two more days (Maldonado-Robledo et al. 2003). It is known that  $\beta$ -ionone acts as an antifungal agent

E. Rodríguez-Bustamante (✉) ·  
G. Maldonado-Robledo · S. Sánchez (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, México  
e-mail: erodriguezb@gmail.com  
Tel.: +52-55-56229199  
Fax: +52-55-56229212  
e-mail: sersan@biomedicas.unam.mx

A. Sánchez-Contreras  
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
D.F. 04510, México

T. Klimova  
Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, México

R. Arreguín-Espinosa  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, México

by inhibiting the respiratory chain, and therefore preventing the microbial oxygen consumption (Larroche et al. 1995). Similarly, when *T. asahii* is exposed to  $\beta$ -ionone concentrations of more than 10  $\mu\text{M}$ , the yeast growth is strongly inhibited (Maldonado-Robledo et al. 2003). This effect might explain the limited growth and null tobacco aroma production when *T. asahii* is grown in the presence of 40  $\mu\text{M}$  lutein (Sánchez-Contreras et al. 2000). Hence, it is expected that removal of the  $\beta$ -ionone being formed might by-pass the growth inhibition and improve the aroma produced. Recovery of aromas from fermentation cultures has been reported by several workers (Schäfer et al. 1999; Keszler et al. 2000; Rito-Palomares et al. 2000). Some of these procedures are based on the manipulation of the headspace, collecting the aroma compounds by organophilic pervaporation, solid-phase extraction, or an aqueous two-phase system. Due to their high surface area, silica materials have been traditionally used in adsorption processes (Jain et al. 1998). The M41S family of zeolites molecular sieves, reported by Mobil Research and Development Corporation researchers (Kresge et al. 1992), has been extensively studied due to its desirable properties of pore sizes (15–100 Å) and high surface areas ( $>1,000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). Recently, these inorganic composites have been focused as chromatographic supports for the separation of biopolymers such as proteins (Kisler et al. 2001; Sakaguchi et al. 2005). Actually, there are no reports on fragrances and aroma recovery by exploiting the method of headspace manipulation coupled with M41S materials as sorbent devices. Due to its textural properties, MCM-41 (Mobil Crystalline Material), a mesoporous member of the M41S family, which has hexagonal arrangement of uniformly sized channel mesopores, high surface area, and periodic nanoscale pore spacing, has been the focus of recent studies for possible applications. The most promising utilizations are related to heterogeneous catalysis, adsorption, ion exchange, and as drug delivery vehicle (Vallet-Regi et al. 2001; Kallus et al. 2003; Newalkar et al. 2003; Hou et al. 2004; Tanchoux et al. 2004; Humphrey et al. 2005). By using a headspace method, the aim of this work was to explore the ability of MCM-41 to adsorb the aroma  $\beta$ -ionone and evaluate its influence on the *T. asahii* growth and the conversion of lutein to  $\beta$ -ionone.

## Materials and methods

### Preparation and characterization of silicate materials

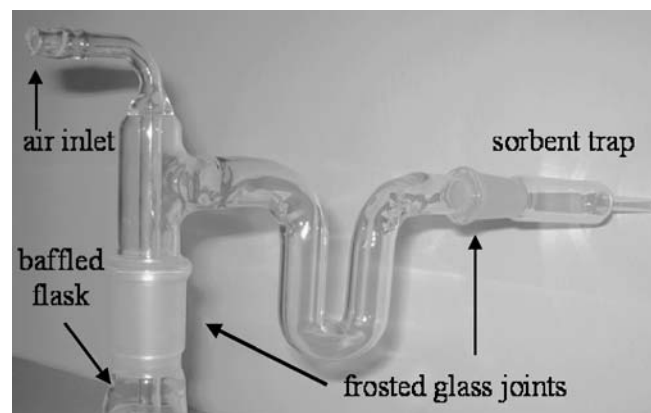
Pure silica MCM-41 was synthesized according to the procedure reported earlier by Franke et al. (1995). Commercial silica was purchased from Merck (silica gel 60 ASTM 35-70 mesh) and used as reference. The sorbent devices (silica gel 60 and MCM-41) were characterized by  $\text{N}_2$  physisorption. Nitrogen adsorption/desorption isotherms were measured with a Micrometrics ASAP 2000 automatic analyzer at liquid  $\text{N}_2$  temperature. Specific surface areas were calculated from the adsorption isotherms by the Brunauer, Emmett, and Teller (BET) method

(Brunauer et al. 1938) and pore size distributions from the desorption isotherms by the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method (Barrett et al. 1951). Before the physisorption method, both samples were out gassed for 6 h at 270°C.

### Microorganism, growth conditions, lutein degradation and aroma production

*T. asahii* BM-H-105 is preserved at the Microbial Culture Collection of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48, Mexico D.F., Mexico). The culture was grown in 250-ml baffled flasks, especially designed for our purpose by adapting frosted glass joints to glass pipes (Fig. 1). The assembled system was autoclaved, using thread covers in the air inlets. For aroma recovery, silicate materials (0.5 g) were used in a U-shape glass pipe, which avoids sorbent from dropping into the fermentation broth.

The flasks contained 50 ml of a culture medium, previously developed by an experimental design methodology (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). The medium contains (per liter) 5.5 g yeast extract, 30.0 g NaCl, and 1.0 ml of a trace elements solution. The trace elements solution contains (per liter) 2.85 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.8 g  $\text{MnCl}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 1.36 g  $\text{FeSO}_4$ , 1.77 g  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0269 g  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0208 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0.0404 g  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , and 0.0252 g  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . For each formulation, the medium was adjusted to pH 7.2 with NaOH. Lutein (kindly donated by Bioquimex S.A. de C.V., Queretaro, Mexico) was filter-sterilized (0.45  $\mu\text{m}$  type HA; Millipore) and added immediately before inoculation to have a final concentration of 334  $\mu\text{M}$  (190 mg/l). This concentration, which was chosen based on a previous study with a microbial mixture (*T. asahii* and *P. amyloxyticus*), was aimed to maximize the tobacco aroma production (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). The flasks were inoculated with 2.5 ml of a *T. asahii* suspension containing  $1\times 10^6$  colony forming units (CFU)/ml and then covered with aluminum foil to avoid lutein decomposition. Cultures



**Fig. 1** Fermenting system designed for fragrances and aroma recovery, consisting of a baffled flask (bottom) adapted by frosted glass joints to glass pipes with air inlet (top left) and sorbent trap (top right) at each extreme

were incubated at 29°C and 180 rpm on a rotary shaker (New Brunswick Scientific).

#### Aroma determination and product identification

At 96 h incubation, silicate materials were collected from the fermentation systems in 250-ml Erlenmeyer flasks, and the aroma extracted from the sorbent by vigorous stirring with 200 ml diethyl ether/petroleum ether (1:1) for 20 min. After filtration (Whatman 40), the solvent was eliminated by transferring the extraction mixture to a 500-ml round flask at 40°C under mild rotation and reduced pressure to avoid aroma decomposition. The organic extract was resuspended in 250  $\mu$ l  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and from this suspension, 5  $\mu$ l was applied onto a thin-layer chromatography Alugramsilg-UV254 plate (0.54 mm thick). To quantify the aroma, the plate was developed with a mixture of hexane/ethyl acetate/acetic acid (95:5:5) and analyzed by densitometry (Camag II densitometer) at 293 nm, using authentic  $\beta$ -ionone as standard (95% pure).

For product identification, 0.1  $\mu$ l of the resuspended organic extract was analyzed in a gas chromatograph (Hewlett-Packard 5890 series II) equipped with a 30-m capillary column of Carbowax 20 M, at 50°C for 5 min, utilizing a temperature program of 4°C/min for 25 min. The mass analysis was achieved in a coupled apparatus (Hewlett-Packard model 5945A) using electron impact technique. The mass spectra were compared with the NIST/EPA/NIH mass spectral library database (NIST/EPA/NIH 1992).

#### Growth determination

Growth values (dry cell weight) were determined from 5 ml samples of the fermentation medium, previously washed twice by centrifugation (12,000  $\times g$ , 15 min) with 0.85% NaCl. The washed cells were dried for 24 h at 100°C over aluminum pads and allowed to cool in a desiccator before weighted.

#### Determination of lutein degradation

Culture samples (1 ml) were taken every 12 h, centrifuged (5,400  $\times g$  for 10 min), and the supernatant extracted by stirring with 1 ml acetone and 2 ml of diethyl ether/petroleum ether (1:1). The organic extract was separated from the aqueous phase by centrifugation and the solvent eliminated with a soft  $\text{N}_2$  flow. Similar to the aroma determination, the concentrate was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50  $\mu$ l), applying 5  $\mu$ l onto a thin-layer chromatography Alugramsilg-UV254 plate (0.54 mm thick). The plate was developed with a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /ethyl acetate (80:20), and the chromatogram analyzed using a densitometer (Camag II) at 450 nm to determine residual lutein. As standard, a 70% pure alfalfa xanthophyll (Sigma Chemical, St. Louis MO) was employed.

## Results

### Characterization of the sorbent materials

$\text{N}_2$  isotherms of MCM-41 corresponded to the characteristic shape of mesoporous materials, which sharply contrasted with the isotherms of silica gel 60 due to the presence of hysteresis (Fig. 2). This latter behavior might be due to spaces between particles or to irregular pore distribution. Textural properties of the aroma recovery materials were calculated from these data. MCM-41 showed the highest surface area (1,020  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ), which represented more than 4-fold of the area measured for silica gel 60 (240  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ). No considerable differences were found between the pore volumes ( $\sim 0.80 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) of the two silicates tested; however, the pore sizes of the commercial material (70 Å) doubled that exhibited by MCM-41 (29 Å).

### Aroma recovery

Two silica materials were compared for aroma recovery. As shown in Fig. 3, MCM-41 achieved an aroma recovery (327  $\mu\text{M}$ ) 4.5-fold higher than the commercial silicate (73  $\mu\text{M}$ ). This value (327  $\mu\text{M}$ ), represented more than 98% of the theoretical aroma production expected (334  $\mu\text{M}$ ). These differences in aroma recovering capacity could be attributed to their surface areas. The surface area measured for MCM-41 was four times higher than that for the silica gel 60, and this value seemed proportional to the amount of aroma recovered. To prove this, the amount of silica gel 60 tested in the fermenting system was quadrupled so that the surface area equaled the one exhibited by MCM-41. Nevertheless, the aroma recovery was lower than expected, registering a concentration of 130  $\mu\text{M}$ . Therefore, in addition to the mesoporous material high surface area, its ordered structure might also contribute to its good recovering capacity. This silicate material was employed for the fermentation kinetics studies.

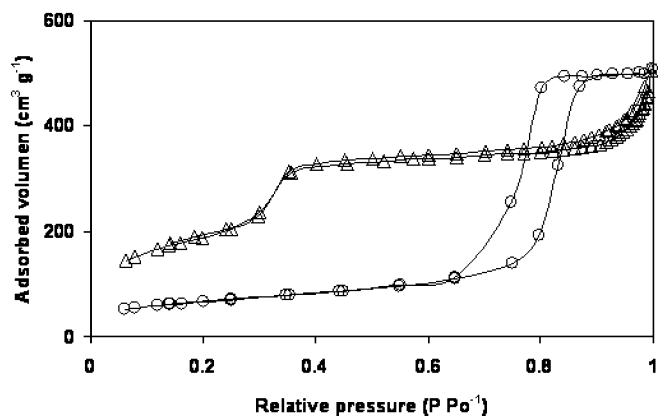
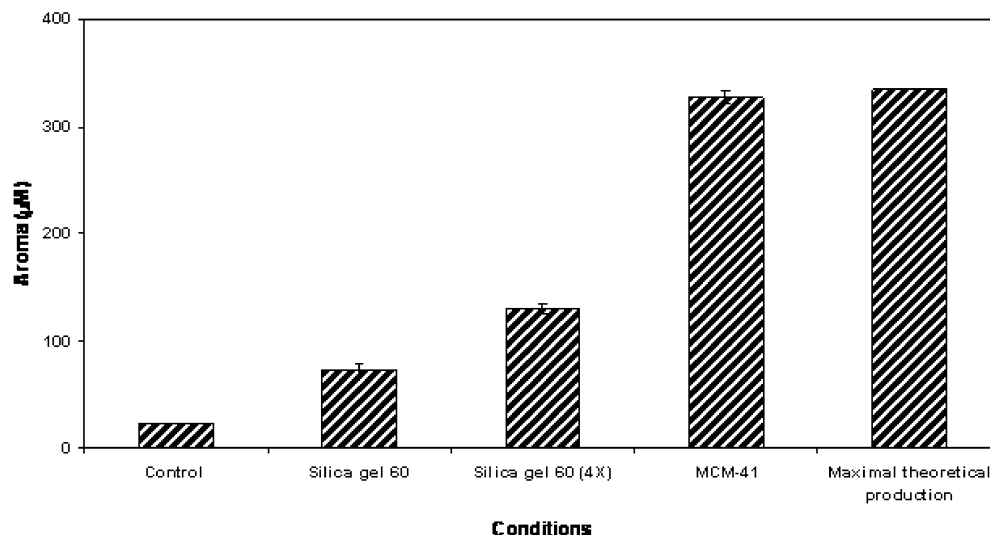


Fig. 2  $\text{N}_2$  adsorption and desorption isotherms of silica gel 60 ( $\circ$ ) and MCM-41 ( $\Delta$ ) from which the textural properties (surface area, pore volume, and pore size) of each material were calculated



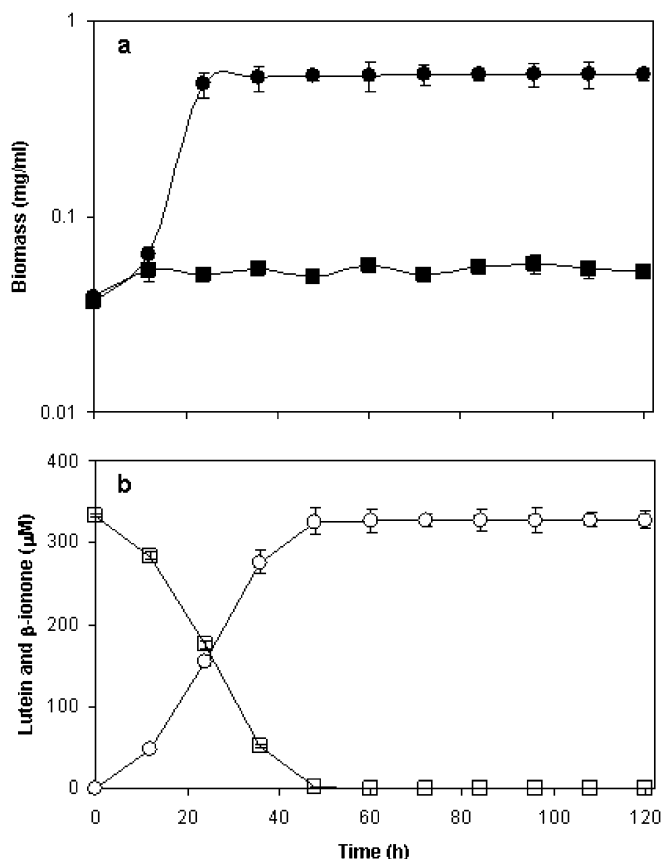
**Fig. 3** Aroma recovery from lutein ( $334 \mu\text{M}$ ) at 96 h fermentation using both silicate materials (silica gel 60 and MCM-41). Control is the aroma produced in the absence of sorbing material. Maximal theoretical aroma production is  $334 \mu\text{M}$ . Cells were grown at  $29^\circ\text{C}$  and 180 rpm



### Product characterization

Determination of the volatiles adsorbed to silica materials at the end of the bioconversion process showed only one compound in all the cases tested, indicating no degradation of the desired product. The nature of this substance was established by comparison with an authentic standard

contained in the database of the NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST/EPA/NIH 1992) and identified as  $\beta$ -ionone by its fragmentation spectra. The spectrometric results showed the following values:  $\beta$ -ionone  $m/z$  192 ( $\text{M}^+$ ), 177/100 ( $\text{M-Me}^+$ ), 149/8, 135/12, 93/7, 91/6.4, 43/26, 41/6. For MCM-41, which had a good recovery capacity, the chromatograph showed only an intense peak (data not shown).



**Fig. 4** Growth kinetics (a) of *T. asahii* cells with (●) and without (■)  $\beta$ -ionone removal. (b) Lutein consumed ( $\square$ ) and  $\beta$ -ionone produced ( $\circ$ ) in the presence of MCM-41. Cells were grown at  $29^\circ\text{C}$  and 180 rpm

### Fermentation kinetics

To evaluate the MCM-41 performance during the fermentation, *T. asahii* cells were incubated in the presence and absence of the mesoporous material. Figure 4a shows the growth evolution under these conditions. As can be seen in the figure, when the ionone produced remained in the culture medium, an inhibition of the yeast growth was observed. On the other hand, removal of the toxic product allowed *T. asahii* to grow well, reaching the stationary phase at 24 h. In regard to  $\beta$ -ionone production (Fig. 4b), maximum concentration was attained at 48 h fermentation in the presence of MCM-41 and this value ( $327 \mu\text{M}$ ) coincided with total lutein consumption by the cells. On the other hand, no aroma was detected in the absence of MCM-41 and the lutein concentration remained without significant variation (not shown).

### Discussion

The mesoporosity of nanoscale materials based on silica is arising as a new and exciting research field of great scientific and technological importance (Hunks and Ozin 2005; Shpeizer et al. 2005; Zhang et al. 2005). These mesoporous molecular sieves with adjustable and uniform pore sizes in the range of 15 to 100 Å, are set to open a new gateway to future technologies. In this work, we report the synthesis and ability of MCM-41 to adsorb the violet aroma  $\beta$ -ionone, which represents a novel application for a

mesoporous product. The MCM-41 synthesized showed  $N_2$  isotherms characteristics of the mesoporous materials (Yamaguchi et al. 2004). In addition, this product exhibited a remarkable performance for aroma depuration because the  $\beta$ -ionone recovered (327.6  $\mu\text{M}$ ; 63 mg/l), corresponded to more than 98% of the theoretical production expected. When compared to a commercial silica gel, MCM-41 exhibited a better  $\beta$ -ionone recovery (4.5-fold), even though the surface areas of both materials were equaled. Therefore, it is possible that in addition to its high surface area, the MCM-41 ordered structure might also contribute to its good recovery capacity. It seems that adsorption to the mesoporous material also conferred some degree of stability to the confined product because no aroma degradation was detected during the time of fermentation.

On the microbial side, because of the continuous  $\beta$ -ionone removal from the culture medium, the toxic effect was avoided and the yeast grew well. In addition, a 14-fold increase in  $\beta$ -ionone production was observed, compared to cultures without the sorbent device. This improve in aroma production is most probably due to the microbial growth observed, as a consequence of the norisoprenoid confinement into the sorbent material. However the bypass of a possible feedback regulatory mechanism as the cause of aroma overproduction cannot be discarded.

This study represents the first report focused on the use of MCM-41 to recover an aroma produced by fermentation. The aroma produced was extracted from the mesoporous material in a high pure form, thus opening the possibility of using this methodology for aroma purification either from biological or from nonbiological chemical reactions. In addition, this "clean technology" showed biocompatibility and expected to be easy to scale up at low cost. Considering that current trends in aroma science are the search for methods with higher product recovery capacity and low or none product modification (Winterhalter and Rouseff 2002), the procedure reported in this paper turned out to be of great interest.

**Acknowledgements** E. Rodríguez-Bustamante was a recipient of a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico and from DGAPA, UNAM, Mexico. We are indebted to B. Ruiz for technical support and M.A. Ortiz for strain preservation studies.

## References

- Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP (1951) The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J Am Chem Soc* 73:373–380
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 60:309
- Franke O, Rathouský J, Schulz-Ekloff G, Zúkal A (1995) Preparation of catalysts VI. In: Poncelet G, Martens J, Delmon B, Jacobs PA, Grange P (eds) *Scientific bases for the preparation of heterogeneous catalysts (Studies in Surface Science and Catalysis 91)*. Elsevier, Amsterdam, pp 309–317
- Jain TK, Roy I, De TK, Maitra A (1998) Nanometer silica particles encapsulating active compounds: a novel ceramic drug carrier. *J Am Chem Soc* 120:11092–11095
- Hou J, Ma Q, Du X, Deng H, Gao J (2004) Inorganic/organic mesoporous silica as a novel fiber coating of solid-phase microextraction. *Talanta* 62:241–246
- Humphrey H, Yiu P, Wright PA (2005) Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid. *J Mater Chem* 15(35–36):3690
- Hunks WJ, Ozin GA (2005) Challenges and advances in the chemistry of periodic mesoporous organosilicas (PMOs). *J Mater Chem* 35–36:3716–3724
- Kallus S, Hahn A, Ramsay JDF (2003) Gas adsorption in MCM-41 porous silicas dynamic measurements using SANS. *Eur Phys J E* 12(S1):31–33
- Keszler A, Forgacs E, Kotai L, Vizcaino JA, Monte E, Garcia-Acha I (2000) Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 38:421–424
- Kisler JM, Stevens GW, O'Connor AJ (2001) Adsorption of proteins on mesoporous molecular sieves. *Mater Phys Mech* 4:89–93
- Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal template mechanism. *Nature* 359:710–712
- Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:1–8
- Larroche C, Creuly C, Gros JB (1995) Fed-batch biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:222–227
- Maldonado-Robledo G, Rodríguez-Bustamante E, Sánchez-Contreras A, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S (2003) Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:484–488
- Newalkar BL, Choudary NV, Turaga UT, Vijayalakshmi RP, Kumar P, Komameni S, Bhat TSG (2003) Adsorption of light hydrocarbons on HMS type mesoporous silica. *Microporous Mesoporous Mater* 65:267–276
- NIST/EPA/NIH (1992) Standard reference data program. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg
- Rabenhorst J (2000) Biotechnological production of natural aroma chemicals by fermentation processes. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*. Wiley, Germany, pp 333–350
- Rito-Palomares M, Negrete A, Galindo E, Serrano-Carreón L (2000) Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes. *J Chromatogr B* 743:403–408
- Rodríguez-Bustamante E, Maldonado-Robledo G, Ortiz MA, Díaz-Avalos C, Sánchez S (2005) Bioconversion of lutein using a microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:174–182
- Sakaguchi K, Matsui M, Mizukami F (2005) Applications of zeolite inorganic composites in biotechnology: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:306–311
- Sánchez-Contreras A, Jiménez M, Sánchez S (2000) Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:287–301
- Schäfer T, Bengston G, Pingel H, Böddeker KW, Crespo JPSG (1999) Recovery of aroma compounds from a wine-must fermentation by organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng* 62:412–421
- Shepeizer BG, Clearfield A, Heising JM (2005) New families of supermicroporous metal oxides: the link between zeolites and mesoporous materials. *Chem Commun* 18:2396–2398
- Somogyi PL (1996) The flavour and fragrance industry: serving a global market. *Chem Ind* 4:170–173
- Tanchoux N, Trens P, Maldonado D, Di Renzo F, Fajula F (2004) The adsorption of hexane over MCM-41 type materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 246:1–8

- Vallet-Regi M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J (2001) A New property of MCM-41: drug delivery system. *Chem Mater* 13:308–311
- Winterhalter P (1996) Carotenoid-derived aroma compounds: biogenetic and biotechnological aspects. In: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) *Biotechnology for improved foods and flavors* (ACS symposium series 637). American Chemical Society, Washington, DC, pp 295–308
- Winterhalter P, Rouseff R (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter P, Rouseff R (eds) *Carotenoid-derived aroma compounds* (ACS symposium series 802). American Chemical Society, Washington DC, pp 1–19
- Yamaguchi A, Uejo F, Yoda T, Uchida T, Tanamura Y, Yamashita T, Teramae N (2004) Self-assembly of a silica-surfactant nanocomposite in a porous alumina membrane. *Nat Mater* 3: 337–341
- Zhang H, Sun Y, Ye K, Zhang P, Wang Y (2005) Oxygen sensing materials based on mesoporous silica MCM-41 and Pt(II)-porphyrin complexes. *J Mater Chem* 15:3181–3186
- Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Berger RG (2003) Cleavage of  $\beta$ -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:331–336

# Glucose exerts a negative effect over a peroxidase from *Trichosporon asahii*, with carotenoid cleaving activity

Eduardo Rodríguez-Bustamante · Gabriela Maldonado-Robledo · Roberto Arreguín-Espinosa · Guillermo Mendoza-Hernández · Romina Rodríguez-Sanoja · Sergio Sánchez

Received: 16 December 2008 / Revised: 11 February 2009 / Accepted: 31 March 2009 / Published online: 24 April 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Tobacco aroma compounds were generated via lutein cleavage by the combined action of a yeast and a bacterium identified as *Trichosporon asahii* and *Paenibacillus amylolyticus*, respectively. In this study, an inverse relationship between glucose concentration and the generation of three compounds, present in the tobacco aroma profile, was observed in mixed cultures. In order to identify the organism sensitive to the sugar effect, both were grown separately. The presence of glucose suppressed  $\beta$ -ionone production by *T. asahii* grown with lutein. However, the biotransformation of the ionone into its reduced derivatives (7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol) by *P.*

*amylolyticus* was not affected by the sugar. This pointed to the cleavage of lutein, a step within the process necessary for the synthesis of  $\beta$ -ionone, as the target of the glucose effect. In vitro studies with crude extracts and concentrated cell-free medium derived from *T. asahii* cultures showed that the carotenoid breakdown activity was located extracellularly and only detected in supernatants from yeast cells grown in the absence of the sugar. Rather than an inhibition or a mechanism affecting the enzyme secretion, the glucose effect on lutein degradation comprised another regulatory level. Further experiments showed that the enzyme responsible for lutein breakdown and susceptible to the sugar effect exhibited a high degree of identity to fungal peroxidases, studied as well, for their involvement in carotenoid cleavage.

---

E. Rodríguez-Bustamante · G. Maldonado-Robledo · R. Rodríguez-Sanoja · S. Sánchez (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, Mexico  
e-mail: sersan@biomedicas.unam.mx

E. Rodríguez-Bustamante  
e-mail: erodriguezb@gmail.com

G. Maldonado-Robledo  
e-mail: Gabriela.Maldonado@mexicocity.ppdi.com

R. Rodríguez-Sanoja  
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

R. Arreguín-Espinosa  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, Mexico  
e-mail: arrespin@servidor.unam.mx

G. Mendoza-Hernández  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, D.F. 04510, Mexico  
e-mail: menher@servidor.unam.mx

**Keywords** Glucose negative effect · Lutein cleavage ·  $\beta$ -ionone and its reduced derivatives · Fungal peroxidases

## Introduction

Carotenoids and their breakdown products exhibit essential biological functions in living systems. By means of an oxidative process, via non-enzymatic or enzymatic mechanisms, carotenoids can be cleaved into smaller molecules, known as apocarotenoids. For an excellent and very complete insight on carotenoid cleavage aspects, refer to the work by Kloer and Schulz (2006). Depending on the carotenoid precursor and the cleavage site, different kinds of compounds, encompassing retinoids, phytohormones, and aromas, can be formed. As proposed by Winterhalter and Rouseff (2002), the mechanism for generating aroma compounds from carotenoids comprised three general steps: (1) oxidative cleavage, (2) enzymatic transformation, and (3)

acid-catalyzed conversions. Research concerning the production of carotenoid-derived aromas has mainly been focused on plants, and even though reports on microbial breakdown are increasing, still little is known about the conversion of carotenoids into aroma compounds by microorganisms (Rodríguez-Bustamante and Sánchez 2007). Microbial cleavage of carotenoids has been studied in cyanobacteria, i.e., *Microcystis* sp. (Jüttner and Höflacher 1985), *Synechocystis* sp. (Ruch et al. 2005; Kloer et al. 2005), and *Nostoc* sp. (Marasco et al. 2006; Scherzinger et al. 2006; Scherzinger and Al-Babili 2008), and in fungi: ascomycetes (Prado-Cabrero et al. 2007; Saelices et al. 2007; Estrada et al. 2008), basidiomycetes (Zorn et al. 2003a, b; Scheibner et al. 2008), and zygomycetes (Burmester et al. 2007).

Due to their ability to grow on lutein as the only carbon source, our research group isolated 19 microbial colonies. From these, only one was capable of generating a strong tobacco aroma. Therefore, the bioconversion of the carotenoid lutein into compounds present in the tobacco aroma profile, carried out by a microbial mixture, was reported (Sánchez-Contreras et al. 2000). The mixture comprised a yeast and a bacterium in a 1:100 proportion (Sánchez-Contreras et al. 2000), later identified as *Trichosporon asahii* and *Paenibacillus amylolyticus*, respectively (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). With respect to the role exhibited by each microorganism, the bioconversion route was divided in two parts: (1) lutein cleavage for its use as carbon source, performed by *T. asahii*, rendering  $\beta$ -ionone, and (2) assimilation and subsequent reduction of this compound by *P. amylolyticus*, yielding 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone, and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol (Maldonado-Robledo et al. 2003). After following a classical design of experiments methodology, focused on maximizing the titer of aroma compounds, the effect that different culture medium components had over the process was evaluated (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). Particularly, glucose drew our attention as a significant and negative estimate was calculated for it in spite of its low concentration compared to other nutrients. The influence of glucose or other carbon sources over carotenoid cleavage for the production of compounds with aroma has not been previously reported; therefore, the aim of the present work was to identify whether only one or both microorganisms might be sensitive to glucose, as well as a potential enzymatic activity susceptible to the sugar effect.

## Materials and methods

### Microorganisms and growth conditions

*T. asahii* BM-H-105 and *P. amylolyticus* BM-B 340 strains are preserved and maintained as previously reported

(Rodríguez-Bustamante et al. 2005). Both microorganisms were grown as a mixed culture in 500-ml bottles with cotton and thread covers containing 300 ml of a culture medium previously formulated by an experimental design methodology (Rodríguez-Bustamante et al. 2005). The bottles were inoculated following the microbial proportion found in the natural isolate by adding 15 ml of a suspension with *T. asahii* and *P. amylolyticus* at  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU) per milliliter and  $3 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>, respectively. The medium composition is (per liter) 5.5 g yeast extract, 30.0 g NaCl, and 1.0 ml of trace elements solution, which in addition contains (per liter) 2.85 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.80 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.36 g FeSO<sub>4</sub>, 1.77 g C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.0269 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0208 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.0404 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 0.0252 g NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. In order to evaluate the effect of glucose over the tobacco aroma titer, four cases were tested. From these, one case did not contain any glucose (condition 1), and the rest were supplemented with three different initial concentrations of the sugar: 28, 56, and 112 mM (5, 10, and 20 g l<sup>-1</sup>), respectively, named as conditions 2, 3, and 4. In all formulations, distilled water was employed and the pH adjusted to 7.2 with NaOH. Lutein (kindly donated by Industrial Orgánica S.A. de C.V., Nuevo León, Mexico) was sterilized by filtration (0.45  $\mu$ m type HA, Millipore, Bedford, MA, USA) and added at a concentration of 190 mg l<sup>-1</sup> (334  $\mu$ M) immediately before inoculation. To avoid lutein decomposition, the bottles were covered with aluminum foil. Cultures were incubated at 29 °C and 60 rpm on a rotary shaker (New Brunswick Scientific).

When cultured separately, the same medium composition was employed, as well as the four cases to be studied, also termed as conditions 1, 2, 3, and 4. However, for *T. asahii*, as it was observed that in the absence of *P. amylolyticus*  $\beta$ -ionone strongly inhibited its growth (Maldonado-Robledo et al. 2003), it was decided to use a system in which the norisoprenoid was removed from the culture medium and adsorbed to a mesoporous material (Rodríguez-Bustamante et al. 2006). Although desirable, this modification could not be applied to the microbial mixture or to the bacterium due to the fact that removing the ionone resulted in an almost null production of its reduced derivatives. Yeasts were grown in 250-ml baffled flasks, especially designed for the ionone recovery, containing 50 ml of the culture medium supplemented with lutein as described above. The microbial concentration of  $1 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> was maintained for inoculation and cultures were incubated at 29 °C on a rotary shaker (180 rpm; New Brunswick Scientific). On the other hand, *P. amylolyticus* was grown exactly as the mixed cultures using the same bacterial concentration. However, lutein was replaced with  $\beta$ -ionone in order to study the effect of the sugar over the transformation of this compound. Similarly to the carotenoid, the ionone was sterilized by filtration (0.45  $\mu$ m type HA; Millipore) and

added immediately after inoculation at a concentration of  $20 \text{ mg l}^{-1}$  ( $104 \text{ } \mu\text{M}$ ).

#### Growth determination

Growth values were determined every 12 h by dry cell weight, from samples (5 ml), of the culture medium previously washed twice by centrifugation with 0.85% (*w/v*) NaCl ( $12,000\times g$  during 15 min). The washed cells were dried for 24 h at  $80 \text{ } ^\circ\text{C}$  over aluminum pads and allowed to cool in a desiccator before weighted.

#### Determination of glucose consumption

Residual glucose concentration was determined by a colorimetric method at 520 nm in 200- $\mu\text{l}$  samples from the culture medium filtrates. The employed kit (Hycel, Australia) is based on the oxidation of the sugar by glucose oxidase rendering gluconic acid and hydrogen peroxide, which in turn reacts in the presence of peroxidase with phenol and 4-aminophenazone for the formation of a red-colored compound.

#### Determination of lutein degradation, $\beta$ -ionone formation/conversion, and aroma compounds production

Lutein degradation from mixed and *T. asahii* cultures was monitored by taking 1.0-ml samples every 12 h. Cells were separated from the culture medium by centrifugation ( $5,400\times g$  for 10 min), and the carotenoid was extracted from the supernatant by stirring with 1.0 ml acetone and 2.0 ml diethyl ether/petroleum ether (1:1). After centrifuging, the organic extract was separated from the aqueous phase and the solvent eliminated by a soft  $\text{N}_2$  flow. The resulting concentrate was dissolved in 50  $\mu\text{l}$  of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , applying 5  $\mu\text{l}$  onto a thin layer chromatography plate (Alugramsilg-UV254, 0.54 mm thick). The plate was developed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /ethyl acetate (80:20) and residual lutein was determined by analyzing the chromatogram with a densitometer (Camag II) at 453 nm. A 70% (*w/v*) pure alfalfa xanthophyll (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was used as standard.

In mixed and bacterial cultures,  $\beta$ -ionone and its reduced derivatives (7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol) were quantified from the medium every 12 h. The same protocol as for lutein determination was followed for separating cells from the culture medium, extraction of the volatiles from the supernatant, removal of the aqueous phase from the organic extract, solvent elimination, and thin layer chromatography plate (see above). However, in this case, the plate was developed with hexane/ethyl acetate/acetic acid (95:5:5). Chromatograms were also analyzed by densitometry at 293 nm to determine  $\beta$ -ionone and at 270 nm for its reduced

compounds. Authentic  $\beta$ -ionone (95% pure) purchased from Sigma Chemical and a mixture of aroma products, purified by column chromatography (Sánchez-Contreras et al. 2000), were used as standards.

$\beta$ -ionone determination in *T. asahii* cultures was accomplished according to a formerly reported method (Rodríguez-Bustamante et al. 2006). Every 12 h, the mesoporous material was collected from the recovery system and replaced with a new one. The ionone was extracted from the collected sorbent by vigorous stirring with 200 ml diethyl ether/petroleum ether (1:1) for 20 min. The silicate material was removed by filtration (Whatman 40) and the solvent eliminated by transferring the mixture to a 500-ml round flask at  $40 \text{ } ^\circ\text{C}$  under mild rotation and reduced pressure. To quantify the norisoprenoid, the organic extract was resuspended in 250  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , following afterwards the same methodology described above.

#### Localization and quantification of the potential enzymatic activity sensitive to the glucose effect

Crude extracts and supernatants derived from yeast cultures grown in the absence and in the presence of 112 mM glucose, which respectively exhibited the lowest and the highest influence over the process, were employed. Cells were separated from the culture medium by centrifugation ( $12,000\times g$  for 15 min). Supernatants were filtered (Whatman 40) and then concentrated four to fivefold, employing an Amicon stirred cell system with a maximal capacity of 200 ml and a YM-10 membrane (Millipore). On the other hand, prior to disruption, cells were washed twice with 0.85% (*w/v*) NaCl. Two cell-disrupting methods were employed: sonication and cold drying. The first method was performed with a Sonics Vibra-Cell ultrasonicator (15 pulses of 30 s with 1-min rest between each), maintaining the sample on ice, meanwhile the second one was achieved by adding cold acetone to the washed cells, freezing the dried cells overnight at  $-70 \text{ } ^\circ\text{C}$  and grinding them with solid  $\text{CO}_2$  over a mortar. Before use, the extract derived from cell drying was resuspended with ultrapure water (Milli-Q-Biocel).

Lutein-cleaving activity was determined spectrophotometrically (Uv-Vis 160U, Shimadzu) at 453 nm by following the decrease in carotenoid absorbance (Zorn et al. 2003a). From a stock solution, 110  $\mu\text{l}$  of lutein was added to a 1.5-ml cell containing 1.0 ml sodium acetate buffer 50 mM, pH 5.0, and 0.5 ml of the enzyme-containing sample. The lutein stock solution was prepared by emulsifying 5.0 mg of the carotenoid in 500 mg of Tween 80 and then dissolving the emulsion with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The mixture was transferred to a 250-ml round flask and the solvent eliminated at  $40 \text{ } ^\circ\text{C}$  under reduced pressure and

rotation. A 30-ml volume of ultrapure water was added to the emulsion, which was further concentrated for 20 min under the same conditions as for eliminating the solvent. Finally, after filtration (0.45  $\mu\text{m}$  type HA, Millipore), the aqueous emulsion was completed to a final volume of 50 ml with ultrapure water. To avoid lutein decomposition, the preparation process was carried out in the absence of light. The decrease in the carotenoid absorbance at 453 nm was monitored during 15 min, time after which the cleaving activity ( $Z$ ) in milliunit per milliliter was quantified by applying the following relation:  $Z = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_t}{V_s \varepsilon b} \times 10^6$ . In this formula,  $\Delta A/\Delta t$  represents the change in absorbance per unit of time (min),  $V_t$ , the total volume of the assay (ml),  $V_s$ , the enzyme-containing sample volume (ml),  $\varepsilon$ , the molar extinction of lutein ( $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), and  $b$ , the path length of the light (cm); the enzymatic activity unit (U) was defined as the breakdown of 1  $\mu\text{mol}$  of lutein per minute. A molar extinction coefficient in the aqueous emulsion of 52,000 was calculated with a linear regression of the Lambert–Beer law:  $A = \varepsilon b C$ , where  $A$  stands for the absorbance,  $b$ , the path length of the light (cm), and  $C$ , the molar concentration ( $\text{mol l}^{-1}$ ).

#### Protein electrophoresis

By ultrafiltration (14,000 $\times g$ ), using Amicon filters [Ultra-15 centrifugal filters with Ultracel-10 membrane, nominal molecular weight limit (NMWL) of 10 kDa, Millipore], a volume of 12 ml from both supernatants was desalted, washing it with ultrapure water (Milli-Q-Biocel) and then reconcentrated. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in a Mini PROTEAN 3 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the method described by Laemmli (1970), with 4% and 10% ( $w/v$ ) polyacrylamide, respectively, in the stacking and resolving gels. The amount of protein of a 100- $\mu\text{l}$  sample from the two culture filtrates was spectrophotometrically determined at 562 nm with a bicinchoninic acid assay kit (Sigma), and 30  $\mu\text{g}$  of supernatant protein from each culture was applied to the gel lanes. The electrophoresis was run at constant amperage: 10 mA for the upper (concentrating) gel and 20 mA for the lower (resolving) one. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories), and a low range standard mixture for SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories) was used for estimating the molecular weight.

#### Purification scheme of the carotenoid-cleaving enzyme

Unless otherwise specified, all the purification process was carried out at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and after each step, protein content and lutein breakdown activity of every sample was determined.

For a higher protein production, *T. asahii* was grown in 2.8-l flasks, Fernbach type, containing 800 ml of medium without glucose and ten glass beads to improve aeration. At the time in which the enzymatic activity was found to be maximal, the culture medium was separated from the yeast cells by centrifugation (12,000 $\times g$  for 15 min). After filtration (Whatman 40), the supernatant was concentrated four to fivefold as described above (Amicon stirred cell system with a capacity of 200 ml and a YM-10 membrane, Millipore). The total volume of the concentrated culture supernatant was precipitated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  into four fractions (0–20%, 20–40%, 40–60%, and 60–100% of ammonium saturation). Each fraction was centrifuged (6,000 $\times g$  for 90 min), resuspended in 5.0 ml of ultrapure water (Milli-Q-Biocel), and dialyzed overnight against distilled water in order to eliminate the excess of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Once dialyzed, the fraction exhibiting the highest cleaving activity was subjected to isoelectrofocusing (preparative Rotofor cell, Bio-Rad), adding 10 ml of ampholytes (pH 3.5–10.0, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Bromma, Sweden) and ultrapure water (Milli-Q-Biocel) to a final volume of 40 ml. The sample was injected to the Rotofor cell and run at 12 V during 4 h until the amperage was constant. After this time, 20 fractions were collected, verifying the correct focusing of the sample by measuring their pH values (pH211 Microprocessor pH Meter, HANNA instruments). The active fractions were mixed together, along with 5 ml of ampholytes (pH 3.5–5.0, Pharmacia LKB Biotechnology AB) and ultrapure water (Milli-Q-Biocel) to a final volume of 20 ml. Again, the protein sample was reinjected to the Rotofor cell and run at 8 V for 1.5 h, time after which the amperage was constant. Once more, the correct focusing was verified and the carotenoid cleavage activity of each fraction looked for. The active fractions were mixed together and then concentrated by ultrafiltration (14,000 $\times g$ ) using Microcon Centrifugal Filter units (YM-10, NMWL of 10 kDa, Millipore). Finally, for further purification, the protein was subjected to a chromatographic separation. After filtration (0.22  $\mu\text{m}$  type HA; Millipore), the sample was applied to an ÄKTA prime high performance liquid chromatography (HPLC) device (Amersham Pharmacia Biotech) equipped with a 1-ml HiTrap Q anion exchange column previously equilibrated with sodium acetate buffer 200 mM, pH 5.0. Proteins were eluted through a linear NaCl gradient (0–1.0 M) in the same buffer with a flow rate of 0.2  $\text{ml min}^{-1}$ . SDS-PAGE was performed as described above in order to corroborate the enzyme purity.

#### Characterization of the carotenoid-cleaving enzyme

Absorption spectrum of the purified enzyme was carried out with a Uv–Vis 160U, Shimadzu, utilizing a program that varied the wavelengths ( $\lambda$ ). In order to determine the pH and

temperature of maximal cleaving activity, the previously described methodology for measuring the decrease in lutein absorbance was employed using buffer solutions of different pH values and varying the temperature.

#### Tandem mass spectrometry and sequence comparison

For identification, the protein band, previously stained with Coomassie Blue R-250, was carefully excised from the SDS-PAGE gel employed for verifying the enzyme purity. Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) was performed as described by Xolalpa et al. (2007). Database searching (NCBI-nr) and protein identification were accomplished from the MS/MS spectra with MASCOT software (<http://www.matrixscience.com>). Tolerances of 0.5 Da for the precursor and 0.3 Da for the fragment ion masses with the taxonomy set to “fungi” were used. Carbamidomethylcysteine was the fixed modification, and one missed cleavage for trypsin was allowed. The criterion for accepting a protein hit as a valid identification were two or more peptide match to the same protein sequence with at least the 95% of confidence. Selected spectra were manually verified. On the other hand, for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) MS, the purified enzyme was dissolved in 20  $\mu$ l of a methanol–water mixture (70:30). Nano-electrospray tandem mass spectra were obtained on a Bruker-Daltonics-Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker-Flanzen Analytical, GmbH, Germany) in the positive-ion mode, as reported by Jensen et al. (1998). Protein sequence comparisons were carried out by employing the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (Altschul et al. 1997), with the algorithm set to “blastp” (protein-protein BLAST).

In all cases, the results shown are the mean values of at least two independent experiments carried out in triplicate. The observed variations were consistently less than 10%.

## Results

### Evaluation of the glucose effect over the microbial mixture

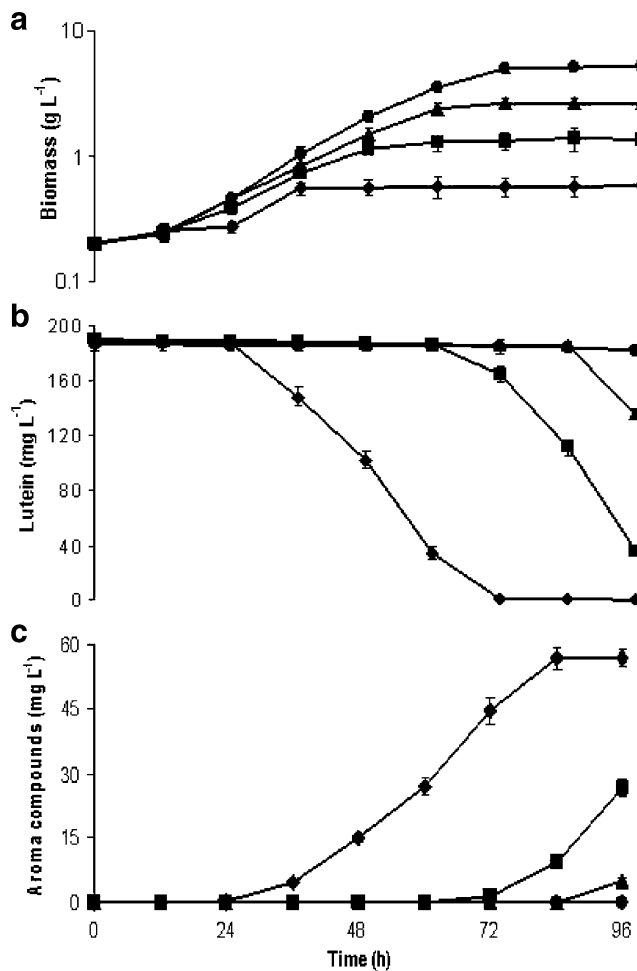
In order to assess the effect of the glucose concentration over the microbial growth, lutein degradation, and aroma production, kinetic studies were carried out while working with both microorganisms cultured under different sugar concentrations. As the glucose concentration increased in the culture medium, the microbial growth was favored (Fig. 1a). In contrast to conditions where glucose was added to the medium, a 24-h lag phase was observed in the case in which the sugar was absent (condition 1). For this condition, the microbial growth registered was the lowest, reaching a value of 0.6 g biomass per liter at the 36 h of the

process. The best growth (5.3 g biomass per liter) was attained for the case with the highest glucose concentration (condition 4) at 72-h incubation, while conditions 2 and 3 exhibited intermediate values of 1.4 and 2.7 g biomass per liter at 48 and 60 h, respectively. No glucose was detected in condition 1, a result that apparently might seem obvious; nevertheless, any contribution of glucose by the yeast extract was therefore discarded. The time of total consumption of glucose depended on the amount of sugar supplied to the culture. For conditions 2, 3, and 4, this was of 60, 72, and 84 h, respectively (data not shown). Lutein degradation is presented in Fig. 1b. For condition 1, lutein cleavage took place after 24 h, which corresponded to the time when the microbial mixture began its exponential growth (Fig. 1a), and total breakdown of the carotenoid was achieved after 72 h of the bioconversion process. Conditions 2 and 3 exhibited a time delay for lutein degradation, which, interestingly, started 12 h after glucose was consumed. In both cases, the complete cleavage of lutein was not attained. No breakdown of the carotenoid took place in condition 4, presumably because the time selected for monitoring the bioconversion process was not enough for observing it, even though glucose had already been consumed. Regarding the production of the aroma compounds (Fig. 1c), the same tendency, compared to the carotenoid cleavage, was followed. Case 1 exhibited a titer of 57 mg l<sup>-1</sup>, 90% with respect to the maximum theoretical value. An aroma production of 27 and 5 mg l<sup>-1</sup> was measured for conditions 3 and 4, representing the 42% and 8%, respectively, compared to the maximal titer. As it was expected, due to the null breakdown of lutein, no aroma compounds were detected in the case with the highest concentration of glucose (condition 4). The latter results showed an inverse relationship between glucose concentration and the aroma production (Fig. 1c). Apparently, lutein breakdown was negatively influenced by the presence of the sugar (Fig. 1b); however, it remained unknown whether the biotransformation of  $\beta$ -ionone into its reduced derivatives might also be affected. Therefore, with the aim of identifying the microorganism and the step within the bioconversion route susceptible to the sugar effect, it was decided to grow *T. asahii* and *P. amylolyticus* separately.

### Evaluation of the glucose effect over *T. asahii*

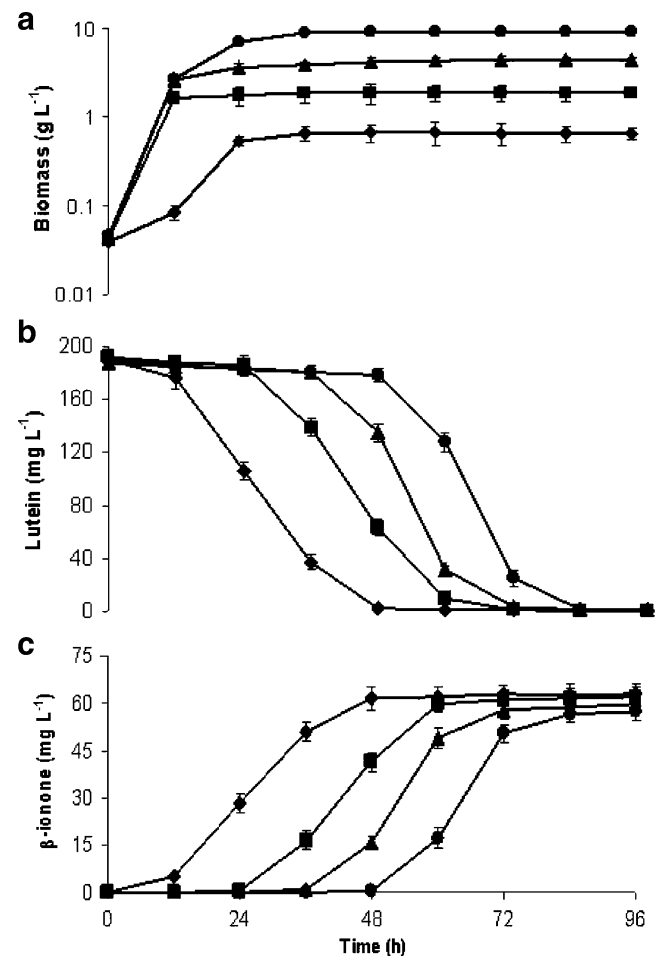
With the purpose of evaluating the effect of glucose over the yeast growth, the breakdown of lutein, and, consequently, the production of  $\beta$ -ionone, culture kinetics of *T. asahii* cells, grown under the formerly employed sugar concentrations, were performed. As it was observed when the microorganisms were cultured together, the yeast growth (Fig. 2a) was benefited with the presence of glucose, as condition 4, the case with the highest





**Fig. 1** Time course of growth (a), lutein degradation (b), and aroma production (c) by the microbial mixture testing a case without glucose (*diamond*) and three different initial concentrations (mM) of the sugar: 28 (*square*), 56 (*triangle*), and 112 (*circle*). Cultures were grown at 29 °C and 60 rpm

concentration of the sugar, reached a 15-fold higher value (9.3 g biomass per liter) with respect to the case without glucose (0.6 g biomass per liter). Compared to the microbial mixture, *T. asahii* exhibited higher growth values, a situation that might be attributed to the increase in the agitation speed and probably a better oxygenation of the cultures. This variation was necessary to allow the removal of  $\beta$ -ionone from the culture medium, as it was previously observed that this compound prevented the fungal growth (Maldonado-Robledo et al. 2003; Rodríguez-Bustamante et al. 2006). In addition, it is thought that sugar consumption was also favored, as no glucose was detected after 12, 24, and 36 h of the process for conditions 2, 3 and 4, respectively (data not shown), 48 h earlier than when the fermentation was carried out with both microorganisms. In all conditions, it was found that lutein was totally cleaved, but its degradation appeared to be dependent on the time in which the sugar was completely consumed (Fig. 2b). For



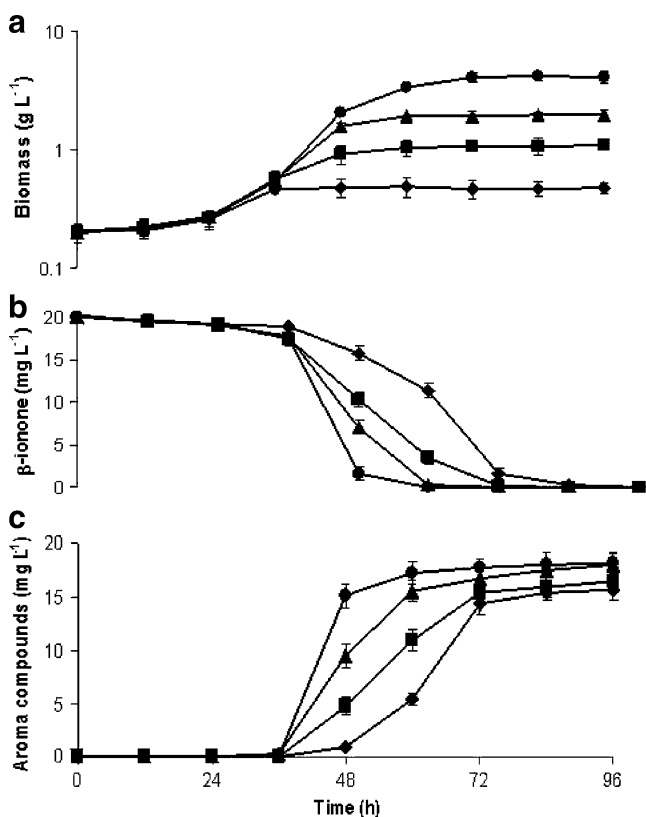
**Fig. 2** Time course of growth (a), lutein degradation (b), and  $\beta$ -ionone production (c) by *T. asahii* cells testing a case without glucose (*diamond*) and three different initial concentrations (mM) of the sugar: 28 (*square*), 56 (*triangle*), and 112 (*circle*). Cultures were grown at 29 °C and 180 rpm

the culture grown without glucose (case 1), mild degradation of lutein was observed at the beginning of the process; however, after 12 h, the cleavage became more pronounced. The rest of the cases exhibited carotenoid breakdown right after glucose had been completely utilized, indicating a sequential use of the carbon sources. Interestingly, in conditions 2, 3, and 4, faster degradation of lutein was found; for example, while the carotenoid was fully cleaved after 48 h for condition 1, total lutein degradation was achieved only 36 h after breakdown started in condition 4. Even though it might seem that glucose favored the carotenoid breakdown, it is important to bear in mind that lutein degradation only took place once the sugar was not present in the culture medium. The latter might be attributed to a possible better carotenoid cleavage as a consequence of the higher biomass concentrations attained with the increase of glucose (Fig. 2a). Finally,  $\beta$ -ionone production correlated with the time dependence observed

for lutein degradation (Fig. 2c), as the generation of the norisoprenoid took place once glucose was absent from the culture medium. A titer around  $60 \text{ mg l}^{-1}$  ( $312 \text{ }\mu\text{M}$ ), representing almost 93% compared to the maximal yield, was attained in all cases. In accordance to what was found when working with the microbial mixture, once again, lutein cleavage appeared to be the target for the glucose effect; however, the influence exerted by the sugar over the bacterium still remained to be evaluated.

#### Evaluation of the glucose effect over *P. amylolyticus*

Analogously to the previous experiments, kinetics of *P. amylolyticus* cultures, supplemented with different amounts of glucose, were conducted. Focused on knowing whether or not the influence of the sugar also comprised the bacterium, cell dry weight, residual  $\beta$ -ionone, and production of its derivatives were determined. Equally to what was formerly observed for both microorganisms and for *T. asahii* cells, the bacterial growth resulted benefited with the presence of glucose (Fig. 3a). The growth values registered were similar but slightly lower to the ones obtained when



**Fig. 3** Time course of growth (a),  $\beta$ -ionone transformation (b), and aroma production (c) by *P. amylolyticus* cells testing a case without glucose (diamond) and three different initial concentrations (mM) of the sugar: 28 (square), 56 (triangle), and 112 (circle). Cultures were grown at  $29^\circ\text{C}$  and 60 rpm

working with both microorganisms (Fig. 1a). Specifically, the dry cell weight measured in cases 1, 2, 3, and 4 were 0.4, 1.1, 2.0, and  $4.1 \text{ g}$  of biomass per liter, respectively. In contrast to when the microorganisms were grown together, *P. amylolyticus* cultures supplemented with glucose exhibited a 12-h longer lag phase, a behavior not found for case 1 in which the duration of this phase was just the same compared to its microbial mixture counterpart. Total consumption of glucose was also achieved 12 h after the time necessary for it with the two microorganisms, i.e., 72, 84, and 96 h, respectively, for conditions 2, 3, and 4 (data not shown). The concentration of  $20 \text{ mg l}^{-1}$  ( $104 \text{ }\mu\text{M}$ ) of  $\beta$ -ionone added to the bacterial cultures was chosen based on the maximal production of the norisoprenoid theoretically attained by the microbial mixture. Contrary to what was observed for lutein cleavage, the transformation of  $\beta$ -ionone (Fig. 3b), as well as the generation of its derived products (Fig. 3c), was not affected by the presence of the sugar. In fact, it was found that the increase of the glucose concentration in the culture medium allowed a better conversion of the ionone and, as a consequence, production of the compounds present in the tobacco aroma. For condition 1, no residual  $\beta$ -ionone was detected at 84 h of the process, while for condition 4, a time of 60 h was only required (Fig. 3b). In accordance to the latter, the synthesis of 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol (Fig. 3c) showed a similar tendency. The cases tested yielded a titer between  $15$  and  $18 \text{ mg l}^{-1}$ , being the lowest for condition 1 and the highest for condition 4. A time dependence for the production of the aroma compounds was also observed; however, opposite to microbial mixture and *T. asahii* cultures,  $\beta$ -ionone transformation took place firstly in the case with the highest concentration of glucose (condition 4) and lastly in the case without the sugar (condition 1). A negative influence exerted by the sugar over *P. amylolyticus* and the steps within the bioconversion route, the two subsequent reductions of the norisoprenoid, performed by it, could, therefore, be discarded.

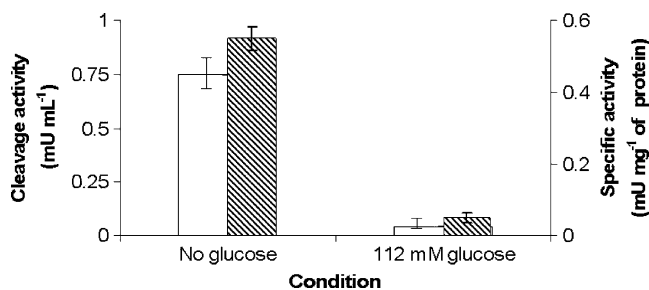
#### Evaluation of the glucose effect over lutein cleavage

After establishing lutein breakdown, carried out by *T. asahii*, as the step within the bioconversion process affected by glucose, the search of the enzymatic activity responsible for the carotenoid cleavage, which possibly might be sensitive to the sugar effect, was conducted. Yeast cultures were grown in the absence or the presence of  $112 \text{ mM}$  glucose concentration, the two conditions that exhibited the least and the most negative influence, respectively, over lutein degradation and  $\beta$ -ionone generation. *T. asahii* cells and culture supernatants were harvested at the 48 h of the process, time in which lutein was totally consumed in condition 1 (no glucose added), while no degradation was

measured in condition 4 (112 mM glucose; Fig. 2b). No carotenoid-cleaving activity whatsoever was registered in the crude extracts derived from neither of the two disrupting methods for both conditions (with or without glucose). The decrease observed in lutein absorbance was the same as in the controls employed where no protein was added to the *in vitro* assay or well; the crude extract was previously denatured at high temperature. Nevertheless, lutein breakdown was found extracellularly; however, as shown in Fig. 4, the cleaving activity was observed only for the supernatant derived from the culture in which glucose was not supplemented. A value of  $0.72 \text{ mU ml}^{-1}$  was calculated for the supernatant obtained from condition 1, representing almost 32-fold higher with respect to the controls. A much lower value ( $0.04 \text{ mU ml}^{-1}$ ) was also registered in the concentrated cell-free medium derived from condition 4. This value was not significantly higher (only 1.6-fold) than the calculated for the controls and likely suggested the occurrence of lutein cleavage due to the assay conditions and/or the susceptibility of these molecules to unspecific breakdown. Accordingly to the data observed formerly (see above), the enzymatic activity susceptible to glucose appeared to be the one responsible for lutein cleavage. Even though for condition 4 the sugar had already been consumed at the time of harvesting and in order to know if the negative effect comprised an inhibitory mechanism, glucose was added during the *in vitro* assay. No variations to the prior results were found in any trial (not shown); therefore, we excluded an inhibition by glucose *per se* and proposed the existence of another level of control.

#### Evaluation of the glucose effect over the extracellular protein profile

Once the location of the enzymatic activity responsible for the breakdown of lutein is known, the influence of glucose over the extracellular protein profile was investigated. Concentrated supernatants derived from *T. asahii* cultures

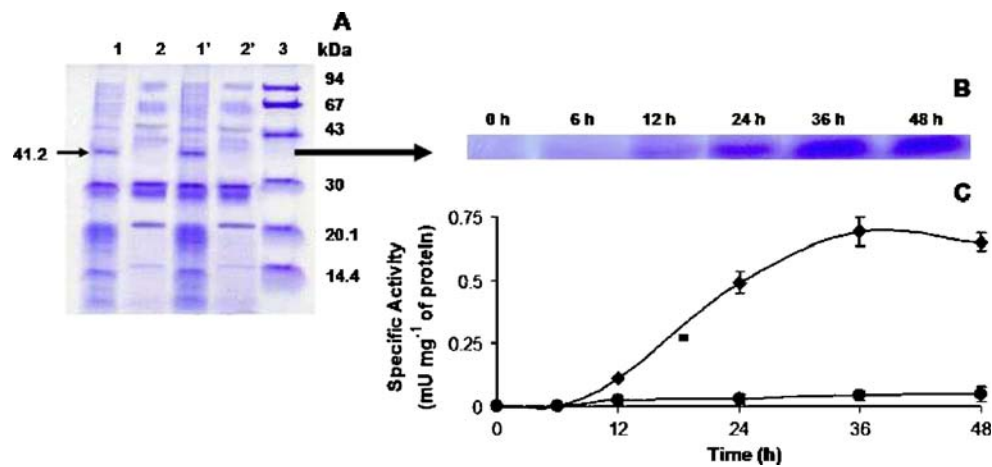


**Fig. 4** Effect of D-glucose on the volumetric (*open bars*) and specific (*diagonal bars*) lutein cleavage activity spectrophotometrically determined by the decrease in the carotenoid absorbance and calculated in supernatants derived from 48 h *T. asahii* cultures grown in the absence and the presence of the sugar (112 mM)

at 48 h of the process and grown under the two selected conditions (1 and 4) as mentioned above were subjected to electrophoresis. As presented in Fig. 5a, a very clear difference between the two protein profiles was found. The number of protein bands that appeared in the lanes (1 and 1') corresponding to the supernatant obtained from growing the yeast under no glucose (condition 1) was higher than those observed in the lanes (2 and 2') that corresponded to its supernatant counterpart derived from condition 4 (grown on 112 mM glucose). Presumably, this might account for the differences found when measuring the lutein breakdown activity from the culture supernatants. To further explore this effect, concentrated culture supernatant samples derived from the chosen conditions were taken at different times of the process. The samples were subjected to electrophoresis and tested for *in vitro* lutein cleavage. The gradual apparition of a protein band (Fig. 5b), which exhibited a molecular mass of 41.2 kDa and is pointed out with an arrow in Fig. 5a, was found only in supernatants obtained from condition 1. Analogously, a peroxidase from *Pleurotus eryngii*, previously classified as *Lepista irina*, exhibiting a similar weight (~50 kDa) has been identified as responsible for the cleavage of  $\beta$ -carotene (Zorn et al. 2003b). From the bands that were only present in the extracellular protein profile derived from *T. asahii* grown in the absence of the sugar (Fig. 5a), only this protein gradually appeared with time (Fig. 5b). This coincided with the time-dependant increase in lutein cleavage activity (Fig. 5c), so the protein just mentioned is believed to be responsible for it. No apparition of a band with the same features was detected at all in the supernatants derived from *T. asahii* cultures supplemented with glucose, and no significant cleavage activity was neither calculated in any of them (Fig. 5c), thus reinforcing our idea.

#### Purification, characterization, and sequence analysis of the carotenoid-cleaving enzyme

In order to deepen our knowledge on the enzymatic system responsible for the carotenoid degradation and sensitive to glucose, a scheme for its purification was set up. After the process, comprising four steps: (1) fractionated precipitation with ammonium sulfate, (2) isoelectrofocusing and (3) its recirculation, and (4) HPLC, a recovery of 26% and an enrichment of 287-fold were attained (Table 1). Enzyme purity was verified with an SDS-PAGE gel (not shown), and in accordance to what was observed in the previous experiment (Fig. 5a), a molecular mass of 41.8 kDa was calculated from it for the protein, which in turn correlated to the nominal mass of 39.5 kDa found by mass spectrometry. The presence of the heme group was corroborated by Uv-Vis spectroscopy as the absorption



**Fig. 5** Extracellular protein profiles of the concentrated supernatants derived from 48 h *T. asahii* cultures (a) grown in the absence (lanes 1, 1') and the presence of 112 mM D-glucose (lanes 2, 2'), including the molecular mass standards (lane 3). The relation between the apparition of the 41.2-kDa SDS-PAGE protein band (b) with its corresponding

increase in the specific lutein cleavage activities (c) from extracellular culture filtrates obtained at different incubation times from yeast cells grown in the absence of glucose (*diamond*) is also shown. The cleavage activity from supernatants derived when *T. asahii* was grown in the presence of 112 mM D-glucose is included as well (c, *circle*)

maxima was found at 403 nm (result not shown). The pH value and temperature of maximal cleaving activity were 5.0 and 35 °C, respectively (not shown), parameters very similar to the ones exhibited by the carotenoid-cleaving peroxidase isolated by Zorn et al. (2003b).

The sequence analysis of the purified enzyme revealed that the first ten amino acid residues were identified in a unique way, thus showing that the sample belonged to a homogeneous protein preparation. The determined N-terminus by MALDI-TOF was: NH<sub>2</sub>-MSFKTLVALA, which showed similarity, with a low significance value, to a broad spectrum of various kinds of proteins reported in different databases (Altschul et al. 1997). Nonetheless, when the BLAST search was limited to “fungi” [txid4751 (ORGN)], the best hits matched published sequences of fungal enzymes, particularly versatile peroxidases from *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas et al. 1999; Zorn et al. 2003b). Surprisingly, the N-terminus sequence of this study corresponded to the signal peptide of the precursors of the just

referred peroxidases, even though the enzyme from *T. asahii* was purified from the culture supernatant. Therefore, the search of internal sequences was conducted. The results obtained by MALDI-TOF were the following: (1) QFVSAAVP, (2) ATCADGRITANAACCVL, (3) AQF-FIETQLKGKLP, and (4) GFSPVEVWVLLASHS. On the other side, the result derived from LC/ESI-MS/MS was: (5) FGGGGADGSIITFSSIETTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAK. All internal sequences, except for number (1), coincided with reported fungal enzymes, exhibiting high similarity to heme-containing peroxidases from basidiomycetes (Altschul et al. 1997). As observed with the N-terminus, sequence (1) did not show significant similarity to other reported proteins (Altschul et al. 1997). However, as described above, when the search was limited to “fungi” [txid4751 (ORGN)], the best hits of the BLAST analysis matched the signal peptide of the putative versatile peroxidase precursors from *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas et al. 1999; Zorn et al. 2003b).

**Table 1** Purification process of the extracellular enzyme from *T. asahii*, responsible for lutein cleavage and susceptible to the glucose effect

Purification step	Protein (mg ml <sup>-1</sup> )	Total activity (mU)	Specific activity (mU mg <sup>-1</sup> )	Yield <sup>a</sup> (%)	Purification factor <sup>b</sup> (-fold)
Concentrated culture supernatant	1.1	133	0.6	100	1
Fractionated precipitation	0.8	70	3.5	53	6
Isoelectrofocusing	0.5	61	30.4	46	51
Isoelectrofocusing recirculation	0.3	48	80.5	36	134
Anionic exchange column	0.2	34	172.0	26	287

<sup>a</sup> Yield represents the quotient between the initial activity value (133 mU) and the total activity found in each purification step

<sup>b</sup> The purification factor was calculated by dividing the calculated specific activity of each purification step by the initial specific activity value (0.6 mU mg<sup>-1</sup>)

## Discussion

The effect of carbon sources over the microbial synthesis of some aroma compounds has been previously studied. The production of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate by *Pichia fermentans* depended on the type of carbon source (glucose, fructose, galactose, xylose, sucrose, maltose, lactose, soluble starch, sorbitol, glycerol, or ethanol) present in the culture medium (Huang et al. 2000), while *Kluyveromyces marxianus* strains increased the 2-phenylethanol titer 3.4-fold when glucose was substituted by sucrose in the form of molasses (Etschmann et al. 2003). The influence of glucose or other carbon sources over carotenoid cleavage for the production of compounds with aroma has not been reported yet. By using culture kinetics, an inverse relationship between glucose concentration, lutein degradation, and aroma production was observed in a mixed culture with *T. asahii* and *P. amylolyticus*. In addition, when *T. asahii* was grown with lutein, its breakdown for its conversion to  $\beta$ -ionone appeared to be dependent on the time in which the sugar was completely consumed. In contrast,  $\beta$ -ionone conversion to 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 7,8-dihydro- $\beta$ -ionol by *P. amylolyticus* was not affected by the presence of the sugar. In a previous work (Rodríguez-Bustamante et al. 2005), we suggested that the negative effect calculated for glucose might be due to a carbon source regulation. Although microbial cells can utilize an enormous variety of carbon sources, bacteria and fungi go to great lengths in order to ensure a preferential use, starting with the substrate that supports a better growth. In response to the presence of easily metabolized carbon sources, especially glucose, the expression of genes and the synthesis of enzymes involved in the utilization of alternative ones is suppressed by a phenomenon known as carbon catabolite repression (CCR; Carlson 1998; Gancedo 1998; Deutscher 2008; Görke and Stülke 2008). Therefore, our results suggested that the lutein cleavage step, within the bioconversion route which in turn yielded  $\beta$ -ionone, resulted negatively affected by the presence of the sugar. As the ionone is the precursor of compounds with tobacco aroma, it could be explained why when the microbial mixture was employed, their production decreased in the glucose cultures, even though the steps carried out by *P. amylolyticus* were insensitive to the sugar. Actually, the transformation of  $\beta$ -ionone into its reduced derivatives is a consequence of a co-metabolism (Maldonado-Robledo et al. 2003) rather than its utilization as an energy source, so a CCR mechanism involved in this action appears to be unnecessary. These first results make us believe that a mechanism of CCR might be involved in the bioconversion process.

In order to reinforce the former findings, the carotenoid cleavage activity was further studied. It was found that

lutein breakdown did not take place inside the cell and that the enzymatic activity was only found in supernatants obtained from *T. asahii* cultures grown in the absence of the sugar. Our results coincided with those reported by Zorn et al. (2003b) in which the degradation of  $\beta$ -carotene was detected in cell-free mediums derived from *P. eryngii* and was maximal only after glucose had been completely consumed. Gel electrophoresis analysis showed that the extracellular protein profiles differed greatly when the yeast was grown in the absence or in the presence of glucose. In particular, a protein band exhibiting a molecular mass of approximately 40 kDa was only observed in the extracellular protein profile derived from *T. asahii* grown in the absence of the sugar. This band gradually increased along with the carotenoid breakdown activity, supporting this protein as responsible for lutein cleavage and likely as the target of the glucose effect. Considering that no carotenoid-cleaving activity was registered in the crude extracts derived from cells grown in the presence of glucose and that sugar addition to the in vitro carotenoid breakdown assay did not affect its activity, the possibility that glucose might interfere with secretion of the cleavage activity or an inhibitory action of the sugar on lutein degradation, as alternative explanations to the glucose effect, can be excluded. Therefore, glucose seems to affect its synthesis, possibly by a CCR mechanism.

After purifying and partially characterizing the system responsible for carotenoid cleavage and sensitive to glucose, a better insight of the overall process was attained. The presence of the heme group, the similarity of its physicochemical parameters to the versatile peroxidase of *P. eryngii* (Zorn et al. 2003b), and the sequence analysis showing a high degree of identity to fungal peroxidases with ligninolytic activity pointed out that the purified enzyme might belong to a protein of this type. The role of peroxidases from two basidiomycetes (*P. eryngii* and *Marasmius scorodoni*) in the biotic breakdown of carotenoids, i.e.,  $\beta$ -carotene, has been recently reported (Zorn et al. 2003b; Scheibner et al. 2008). The versatile peroxidase from *P. eryngii* has mainly been studied for its implication in lignin biodegradation (Ruiz-Dueñas et al. 1999). It is known that the genus *Trichosporon*, comprising anamorphic yeasts (Basidiomyceta, Hymenomycetes, Trichosporonales), is able to assimilate and degrade atypical substrates such as hemicelluloses and phenolic compounds (Middelhoven et al. 2001), diesel constituents (aliphatic and aromatic hydrocarbons; Kaszycki et al. 2006), a phenol and cresol mixture (Alexieva et al. 2008), and reactive dyes (Vilmafix® Red 7B-HE and Vilmafix® Blue RR-BB; Pajot et al. 2008). Different species of this genus have been isolated from decaying mushrooms on trunks of living trees and from rotten wood (Middelhoven 2004, 2006). Ligninolytic activity has been detected in recently isolated

*Trichosporon* species (Pajot et al. 2007) and in culture supernatants obtained from *Trichosporon cutaneum* R57 cultures (Georgieva et al. 2007). On the other hand, Sláviková et al. (2002) found ligninase and Mn(II) peroxidase activity in *Trichosporon pullulans*, now reclassified as *Guehomyces pullulans* (Fell and Scorzetti 2004), still a basidiomycetous yeast related to the genus *Trichosporon*, cultures supplemented with lignin. Both enzymatic activities were hindered by the presence of glucose, a fact that is in accordance to our findings about the negative effect of the sugar over the bioconversion process of lutein. Therefore, we conclude that the purified enzyme from *T. asahii*, responsible for lutein breakdown and similar to fungal peroxidases involved in the biodegradation of lignin, represented the target of the glucose effect. Despite that it was purified from the culture supernatant, the fact that the N-terminus of the purified enzyme and one of the obtained internal sequences matched the signal peptide of a versatile peroxidase from *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas et al. 1999; Zorn et al. 2003b) represents a point for further study, suggesting the possible existence of a different secretion mechanism. It is not believed that this might be attributed to cell disruption, as no cleaving activity was registered intracellularly.

New alternatives for further research have been arisen from our study, such as the cloning of the gene encoding the protein of interest. By this, the complete sequence will be known, yielding certainty of the type of enzyme we are dealing with as well as the possibility of measuring mRNA for further confirmation of a repressive mechanism. Obtaining *T. asahii* mutants insensitive to the effect of the sugar is also contemplated for broadening our knowledge on this process and its regulation as well as their application in the overproduction of the ionone. Still there is plenty to find out on how glucose exerts its negative effect over the bioconversion process of lutein into compounds with aroma, specifically  $\beta$ -ionone; nevertheless, with this study, we have set up the bases that might allow us to continue looking into this phenomenon. Even though three fungal peroxidases with carotenoid cleaving activity have been described (Zorn et al. 2003b; Scheibner et al. 2008), our work constitutes the first report on the negative effect of a readily metabolized carbon source like glucose, over an enzyme, apparently a peroxidase, from *T. asahii*, responsible for the breakdown of carotenoids, particularly the xanthophyll lutein.

**Acknowledgments** E. Rodríguez-Bustamante expresses his gratitude to CONACyT and DGEP-UNAM for granting during part of his doctoral work, as well as to DAAD for its support during a research stay under the tuition of Prof. Holger Zorn and Prof. Ralf G. Berger, at the Institut für Lebensmittelchemie of the University of Hannover, in Germany. This project is currently funded by DGAPA (PAPIIT): IN202707. The technical assistance of Beatriz Ruiz, Laura Escalante,

and Marco A. Ortiz is deeply appreciated. The valuable contributions of Dr. Tatiana Klimova and Blanca I. Aldana for providing us with the mesoporous material and during the purification process of the enzyme, respectively, are also recognized.

## References

- Alexieva Z, Gerginova M, Manasiev J, Zlateva P, Shivarova N, Krastanov A (2008) Phenol and cresol mixture degradation by the yeast *Trichosporon cutaneum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1297–1301
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Burmester A, Richter M, Schultze K, Voelz K, Schachtschabel D, Boland W, Wöstemeyer J, Schimek C (2007) Cleavage of  $\beta$ -carotene as a first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is a mediated by a trisporic acid regulated  $\beta$ -carotene oxygenase. *Fungal Genet Biol* 44:1096–1108
- Carlson M (1998) Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 8:560–564
- Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11:87–93
- Estrada AF, Maier D, Scherzinger D, Avalos J, Al Babili S (2008) Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genet Biol* 45:1497–1505
- Etschmann MMW, Sell D, Schrader J (2003) Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnol Lett* 25:531–536
- Fell JW, Scorzetti G (2004) Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to *Trichosporon lignicola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:995–998
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:334–361
- Georgieva N, Yotova L, Betsheva R, Valchev I, Chadjiska Ch (2007) Biotransformation of lignin in linen with *Trichosporon cutaneum* R57. *Cellulose Chem Technol* 41:125–128
- Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6:613–624
- Huang CJ, Lee SL, Chou CC (2000) Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. *J Biosci Bioeng* 90:142–147
- Jensen ON, Larsen MR, Roepstorff P (1998) Mass spectrometric identification and microcharacterization of proteins from electrophoretic gels: strategies and applications. *Proteins* 2:74–89
- Jüttner F, Höflacher B (1985) Evidence of  $\beta$ -carotene 7, 8(7', 8') oxygenase ( $\beta$ -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. *Arch Microbiol* 141:337–343
- Kaszycki P, Czechowska K, Petryszak P, Międzobrodzki J, Pawlik B, Kołoczek H (2006) Methylotrophic extremophilic yeast *Trichosporon* sp.: a soil-derived isolate with potential applications in environmental biotechnology. *Acta Biochim Pol* 53:463–473
- Kloer DP, Ruch S, Al-Babili S, Beyer P, Schulz GE (2005) The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308:267–269
- Kloer DP, Schulz GE (2006) Structural and biological aspects on carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63:2291–2303
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685

- Maldonado-Robledo G, Rodríguez-Bustamante E, Sánchez-Contreras A, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S (2003) Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:484–488
- Marasco EK, Vay K, Schmidt-Dannert C (2006) Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* spp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J Biol Chem* 281:31583–31593
- Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW (2001) *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubierillaibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Res* 1:15–22
- Middelhoven WJ (2004) The yeast flora of some decaying mushrooms on trunks of living trees. *Folia Microbiol* 49:569–573
- Middelhoven WJ (2006) Polysaccharides and phenolic compounds as substrate for yeasts isolated from rotten wood and description *Cryptococcus fagi* of sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:57–67
- Pajot HP, de Figueroa LIC, Fariña JI (2007) Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme Microb Technol* 40:1503–1511
- Pajot HP, Figueroa LIC, Spencer JFT, Fariña JI (2008) Phenotypical and genetic characterization of *Trichosporon* sp. HP-2023. A yeast isolate from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina) with dye-decolorizing ability. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:233–244
- Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J, Al-Babili S (2007) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6:650–657
- Rodríguez-Bustamante E, Sánchez S (2007) Microbial production of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit Rev Microbiol* 33:211–230
- Rodríguez-Bustamante E, Maldonado-Robledo G, Ortiz MA, Díaz-Avalos C, Sánchez S (2005) Bioconversion of lutein using a microbial mixture—maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:174–182
- Rodríguez-Bustamante E, Maldonado-Robledo G, Sánchez-Contreras A, Klimova T, Arreguín-Espinosa R, Sánchez S (2006) Novel method for aroma recovery from the bioconversion of lutein to  $\beta$ -ionone by *Trichosporon asahii* using a mesoporous silicate material. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:568–573
- Ruch S, Beyer P, Ernst H, Al-Babili S (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: in vivo characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55:1015–1024
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol Microbiol* 31:223–235
- Saelices L, Youssar L, Holdermann I, Al-Babili S, Avalos J (2007) Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol Genet Genomics* 278:527–537
- Sánchez-Contreras A, Jiménez M, Sanchez S (2000) Bioconversion of lutein to products with aroma. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:528–534
- Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, de Boer L, Berger RG, Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1241–1250
- Scherzinger D, Al-Babili S (2008) In vitro characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by highlight. *Mol Microbiol* 69:231–244
- Scherzinger D, Ruch S, Kloer DP, Wilde A, Al-Babili S (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC 7120: in vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J* 398:361–369
- Sláviková E, Košíková B, Mikulášová M (2002) Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. *Can J Microbiol* 48:200–203
- Winterhalter P, Rouseff RL (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In: Winterhalter P, Rouseff RL (eds) Carotenoid derived aroma compounds. ACS, Washington D.C, pp 1–19
- Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C (2007) Identification of a novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7:3332–3341
- Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Berger RG (2003a) Cleavage of  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:31–336
- Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimtz M, Berger RG (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta$ ,  $\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* 384:1049–1056

## Anexo 2: Medios de cultivo empleados en el trabajo experimental

### Composición del medio YTN (por litro):

Extracto de levadura	10 g
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	30 g
Glucosa	1 g
Solución de elementos traza *	1 mL
Agar (para medio sólido)	15 g

### Composición del medio Y mejorado (por litro):

Extracto de levadura	5.5 g
Cloruro de sodio	30 g
Glucosa	Variable según el caso probado
Solución de elementos traza *	1 mL

### \* Solución de elementos traza (por litro):

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.85 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.80 g
FeSO <sub>4</sub>	1.36 g
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.77 g
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0269 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.0208 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0404 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0252 g

Para preparar ambos medios se disuelven todos los componentes en agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 con NaOH (1 N) y se esteriliza en autoclave a 20 lb de presión y 120°C durante 30 min.