



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

**BIOCONVERSIÓN DE FLAVONOIDES CÍTRICOS UTILIZANDO CÉLULAS
MICROBIANAS ENTERAS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.B.I CHRISTIAN HERNÁNDEZ GUZMÁN

DIRECTOR

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

ASESOR

Dra. LILIA ARELY PRADO BARRAGAN

Dr. MIQUEL GIMENO SECO

México D.F. Julio de 2015.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) Nivel Competencia Internacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Y se agradece al CONACyT por la beca otorgada (302006) para la realización de este trabajo.

México D.F., 30 de Julio de 2015.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

BIOCONVERSIÓN DE FLAVONOIDES CÍTRICOS UTILIZANDO CÉLULAS MICROBIANAS ENTERAS

Que presentó

Christian Hernández Guzmán

Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



JURADO

Presidente: Miquel Gimeno Seco
Universidad Nacional Autónoma de México



Secretario: Lilia Arely Prado Barragán
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal: Dr. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal: Dr. Ma. Ascención Ramírez Coronel
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



*A mi Madre María Luisa, por su amor
y sacrificio en todos estos años,
gracias a ti he logrado llegar hasta aquí
y convertirme en lo que soy.*

A Toño, Irene y al resto de mi Familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Huerta, por ser un gran líder, excelente persona y sobre todo por tener mucha paciencia.

A los Doctores Arely Prado, Miquel Gimeno, Angélica Román y Ascención Ramírez, por sus atinadas correcciones y asesorías.

A los Doctores Ernesto, Gerardo, Arely y Sergio, por su extraordinaria labor en la Planta Piloto 4.

A Adela (ADe'O), por estar siempre a mi lado.

A Isa y Alex, por todos esos Miércoles de alitas y por esos fabulosos viajes, que se sigan repitiendo.

A mis extra ordinarios amigos Lety y Goyo, por todos esos Martes de Botanero y a Lalo el nuevo integrante del Drink Team.

A la pandilla Cangreburguers y Gallo Draft, por una excelente familia y una gran fusión como GalloBurguers.

A la enojona de Edith, Tribi, Kary, Towy, Geo, Xoch, Marce y Bombón.

A las chicas Cancún Norma y Rox, se les extraña.

A mis amigos belgas, Hanne, Dries y Tim, por una temporada de vacaciones.

A mis amigos y compañeros de la Planta Piloto 4.

A todos los que participaron e hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al CONACyT por el financiamiento al proyecto CB-2013-01 y beca para estudios de posgrado.

ÍNDICE	
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
NOMENCLATURA	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS	16
1.2. BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS	17
1.3. FLAVONOIDES	18
1.4. REACCIONES DE REGIO-SELECTIVIDAD	23
1.5 BIOCONVERSIÓN DE COMPUESTOS UTILIZANDO CÉLULAS MICROBIANAS ENTERAS	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
2.1 JUSTIFICACIÓN	28
2.2 HIPÓTESIS	28
2.3 OBJETIVO GENERAL	29
2.4 OBJETIVOS PARTICULARES	29
2.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. REACTIVOS	31
3.2. CEPAS UTILIZADAS PARA LA SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO	31
3.3. CONTEO CELULAR	32
3.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO	33
3.5. PESO SECO	33
3.6. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CONCENTRACIÓN CELULAR	33
3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR POR DENSIDAD ÓPTICA	34
3.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	34

3.9.	SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO EN LA BIOCONVERSIÓN	34
3.10.	IDENTIFICACIÓN DE LA REGIO-SELECTIVIDAD	35
3.11.	ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
4.1.	SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO PARA LA BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA.....	38
4.2.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Y. lipolytica</i>	40
4.3.	SISTEMA 1 (ACUOSO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR <i>Y. lipolytica</i>	42
4.4.	SISTEMA 2 (ORGÁNICO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR <i>Y. lipolytica</i>	43
4.5.	SISTEMA 3 (BIFÁSICO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR <i>Y. lipolytica</i>	44
4.6.	FRAGMENTACIÓN DE MASAS	47
5.	CONCLUSIONES.....	51
6.	RECOMENDACIONES.....	53
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8.	ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Biosíntesis de compuestos fenólicos por la “Vía del Shikimato y fenilalanina”. (Tomado de: González-Jiménez, 2010).	17
Figura 1.2. Estructura genérica de los flavonoides.	18
Figura 1.3. Estructura genérica de los flavonoides y de las distintas subclases (Tomado de: Álvarez-Castro y Orallo-Cambeiro, 2003).	19
Figura 1.4. Estructura de la naringenina.	21
Figura 1.5. Reacción de hidrólisis de la naringina en prunina, ramnosa, naringenina y glucosa por la naringinasa que contiene actividad α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa. (Tomado de Ribeiro y col., 2008).	22
Figura 1.6. Flavonas cítricas polimetoxiladas.	22
Figura 1.7. Biotransformación de naringenina a ponciretina utilizando células enteras de <i>E. coli</i>	23
Figura 1.8. Reacciones generales de oxidación catalizadas por las monooxigenasas y dioxigenasas. (Tomado de Castellanos-Molina, 2007).	24
Figura 2.1. Diagrama general de la estrategia propuesta empleada en el presente trabajo para el cumplimiento de los objetivos planteados.	30
Figura 3.1. Cepas utilizadas en el proceso de bioconversión: (a) <i>P. sanguineus</i> , (b) <i>Y. lipolytica</i> , (c) <i>S. cyaneus</i> y (d) <i>C. pubecens</i>	31
Figura 3.2. Selección del microorganismo utilizando frascos serológicos.	35
Figura 4.1 Cinética de bioconversión de naringenina.	38
Figura 4.2. Cinética de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> (0-48 horas).	40
Figura 4.3. Producción de biomasa y viabilidad celular de <i>Y. lipolytica</i> , 30 °C, pH 5.5, medio mineral, 200 rpm, 1×10^6 células/mL, 30 g/L glucosa.	41
Figura 4.4. Cromatograma (HPLC) de bioconversión por <i>Y. lipolytica</i> de la naringenina, a) 24 h y b) 192 h después de agregarse el precursor.	42
Figura 4.5. Cromatograma (HPLC) donde se presenta el proceso de bioconversión de naringenina por <i>Y. lipolytica</i> con; a) 24 h y b) 192 h de incubación.	43
Figura 4.6. Cromatograma (HPLC) donde se presenta el proceso de bioconversión de la naringenina por <i>Y. lipolytica</i> con a) 24 horas y b) 192 h de incubación. (Sistema 3, Fase Acuosa).	44
Figura 4.7. Espectro HPLC-MS de la bioconversión de naringenina por <i>Y. lipolytica</i> después de 192 h.	47
Figura 4.8. Fragmentación en el proceso de bioconversión del naringenin por <i>Y. lipolytica</i> con 192 horas de incubación.	48
Figura 4.9. Posible mecanismo de bioconversión. (Tomado de: Seitz y col. 2007).	49
Figura 4.10. Ciclo catalítico de la enzima P450 generalizado. (Tomado de: Emre y Peter, 2007).	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Estructura de algunos Flavonoides.....	20
Tabla 3.1. Gradiente utilizado para el análisis de HPLC	37
Tabla 4.1. Resumen del ANOVA para el análisis en el consumo de naringenina, Sistema 1.....	39
Tabla 4.2. Resumen del ANOVA para el análisis de regio-selectividad, Sistemas 1, 2 y 3.	45
Tabla 4.3. Resumen del ANOVA para el análisis de regio-selectividad, Sistema 1 y Sistema 3.	46

NOMENCLATURA

μM	Micromolar
mM	Milimolar
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplado a Masas
g	Gramos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
kDa	Kilo Dalton
DO	Densidad óptica
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros
R^2	Coefficiente de correlación
PDA	Agar papa Dextrosa
tr	Tiempo de retención
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

EL objetivo de este trabajo fue evaluar la bioconversión del flavonoide cítrico naringenina a compuestos enriquecidos ya sean hidroxilados y/o metoxilados utilizando células microbianas enteras empleando. A través de un “screening” con cuatro cepas, se seleccionó a *Yarrowia lipolytica 2.2ab* por expresar actividad para realizar la bioconversión de la molécula de naringenina. El “screening” se llevó a cabo a nivel micro escala en frascos serológicos con medio sólido para su crecimiento y posteriormente llevar a cabo el proceso de bioconversión. La identificación de los flavonoides enriquecidos, hidroxilados producidos durante un proceso de bioconversión por células microbianas enteras en un cultivo superficial, se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas (HPLC-MS). Se observó la producción del compuesto hidroxilado ($C_{15}H_{12}O_6$) a las 48 h de bioconversión; y a partir de las 192 h se identificaron otros compuestos. Además se evaluó la regio-selectividad en la hidroxilación utilizando tres sistemas diferentes: fase acuosa, bifásico (acuoso-orgánico) y fase orgánica. La regio-selectividad puede ser útil para la modificación biológica de flavonoides para desarrollar nuevos fármacos. Se observó que la cepa *Y. lipolytica 2.2ab* presenta el sistema enzimático adecuado para lograr la bioconversión de naringenina a productos hidroxilados. *Y. lipolytica* es capaz de expresar la enzima monooxigenasa citocromo P450, la cual ha sido estudiada por tener la capacidad de llevar a cabo la oxidación de diferentes compuestos xenobióticos. Además, las enzimas P450 son potenciales candidatos para llevar a cabo la hidroxilación regio-selectiva de una gran cantidad de compuestos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the bioconversion of citrus flavonoid naringenin to be enriched compounds and hydroxylated and / or methoxylated using whole microbial cells using. Through a "screening" four strains were selected for *Yarrowia lipolytica 2.2ab* expressing for bioconversion activity of the molecule naringenin. The "screening" was performed at the micro scale serological jars with solid medium for growth and subsequently carry out the process of bioconversión. Identifying enriched flavonoids, hydroxylated produced during a process of bioconversion by whole microbial cells on a surface culture, was performed by high performance liquid chromatography coupled to mass performance (HPLC-MS). Production of the hydroxy compound (C₁₅H₁₂O₆) at 48 h of bioconversion was observed; already from 192 h other compounds were identified. Furthermore the regio-selectivity in the hydroxylation was evaluated using three different systems: water phase, two-phase (aqueous-organic) and organic phase. The regio-selectivity can be useful for modification of biological flavonoids to develop and produce new drugs. It was observed that the strain *Y. lipolytica 2.2ab* presents the appropriate enzyme system to achieve the bioconversion of naringenin to hydroxylated products. *Y. lipolytica* is capable of expressing the enzyme cytochrome P450 monooxygenase, which has been studied by having the ability to perform oxidation of different xenobiotic compound. Moreover, P450 enzymes are potential candidates to perform the regio-selective hydroxylation of a large number of compounds.

INTRODUCCIÓN

Los flavonoides están presentes principalmente en frutas cítricas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los cuales son consumidos en la dieta para humanos de forma habitual. Además, pueden incorporarse en forma de suplementos nutricionales, junto con algunas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran en frutas cítricas en forma de agliconas así como en forma de glicósidos: estos últimos son los que aportan el color a los, frutos, flores y hojas. Los flavonoides que habitan en el interior de las células de las plantas actúan como antioxidantes, es decir presentan la propiedad de inhibir o secuestrar los radicales libres precursores de estrés oxidativo y muerte celular causantes de su degradación (Gattuso y col., 2007; Varas-Pacheco, 2004). Estos compuestos además han demostrado poseer actividad farmacológica, como antialérgico, antiinflamatorios, antivirales y/o anticarcinogénicos, antidepresivos, antitrombóticos y vasodilatadores (Zhang, 2007). Investigaciones recientes apuntan hacia el potencial de los compuestos fenólicos como compuestos antioxidantes, los datos de Leatherhead Food International (LFI), muestran que el mercado mundial de antioxidantes funcionales está incrementando año con año en torno a un 3 %, y se valoró en 400 millones de dólares en 2004, y en 438 millones de dólares en 2007. Europa, los E.U.A., y Japón representan el 90 % del mercado. Los flavonoides representan cerca del 45 % de este mercado de compuestos antioxidantes funcionales, lo que equivale a casi 200 millones de dólares (Tomado de: http://www.nutrinat.com/actualidad-salud/suplementosnaturales/antioxidantes/antioxidanteselaugedelospolifenoles#.VbKr0_I_Ok o, 2009). Su estructura se compone de tres anillos con actividad antioxidante. Dos de los anillos son bencénicos que están conectados a través de un anillo pirona que tiene un oxígeno, la estructura de este último los clasifica en seis subclases: flavones, flavonoles, flavononas,

catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Zhang, 2007). La existencia de flavonoides en la naturaleza y sus potenciales beneficios en la salud humana ha causado un gran interés en su estudio, prueba de ello son las considerables publicaciones que hay sobre la actividad biológica de estos compuestos. Se ha empleado el uso de células microbianas enteras para llevar a cabo la bioconversión de flavonoides con el fin de aumentar el potencial antioxidante, el grado de hidroxilación o metoxilación de los flavonoides incrementan sus propiedades antioxidantes (Kitamura y col. 2013).

Los procesos de bioconversión llevan a cabo modificaciones químicas a un determinado precursor utilizando sistemas biológicos. Los sistemas biológicos son nombrados biocatalizadores y se caracterizan por ser enzimas o células enteras, los cuales pueden ser microorganismos naturales o recombinantes. Normalmente se utilizan enzimas libres, sin embargo, es preferente el uso de células enteras ya que son de fácil adquisición y bajo costo. Asimismo, las membranas de las células enteras protegen las enzimas de energías internas que puedan causar rompimiento, de la toxicidad de solventes y favorecen el suministro de cofactores requeridos para la consecución de reacciones intercelulares (Castellanos-Molina, 2007).

El capítulo 1 introduce al estado del arte del tema de estudio. El capítulo 2 presenta el planteamiento del problema, hipótesis, justificación; y objetivos general y particular Así como la estrategia experimental utilizada. Los materiales y métodos, los equipos (HPLC, cámara de Neubauer, espectrofotómetro) y los reactivos utilizados para la realización de este trabajo se describen en el capítulo 3. En el capítulo 4 se presentan los resultados experimentales y las discusiones en base a referencias bibliográficas. Las conclusiones obtenidas se mencionan

en el capítulo 5, estas conclusiones fueron obtenidas con fundamento a la discusión de resultados, concluyendo que el objetivo ha sido cumplido. También se señalan algunas sugerencias para la posible continuación del trabajo en el capítulo 6.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, algunos incluyen derivados funcionales como glicósidos (Creus, 2004; González-Jiménez, 2010). Algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenólicos no son polifenoles, sino monofenoles. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, ya que constituyen uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas. Los compuestos fenólicos son sintetizados de *novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. También, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta, por ejemplo las antocianinas son compuestos responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las flores y frutos (Creus, 2004).

Los compuestos polifenólicos se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Por su estructura química tenemos 2 grandes grupos: los **no flavonoides** que comprenden los compuestos fenólicos no carboxílicos con estructuras C6, C6-C1, C6-C3 y los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (C6-C1) y ácido cinámico (C6-C3) respectivamente. El segundo grupo son los **flavonoides** con estructura C6-C3-C6, formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado como las antocianinas, flavonas, flavononas, flavanoles, isoflavonas y flavanonoles, taninos condensados y lignanos (García-Ramírez, 2001; Creus, 2004).

1.2. BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se sintetizan esencialmente de la ruta metabólica del Shikimato la cual origina fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos (Figura 1.1), también son sintetizados a partir de la ruta del acetato la cual produce algunas quinonas y fenoles simples (González-Jiménez, 2010).

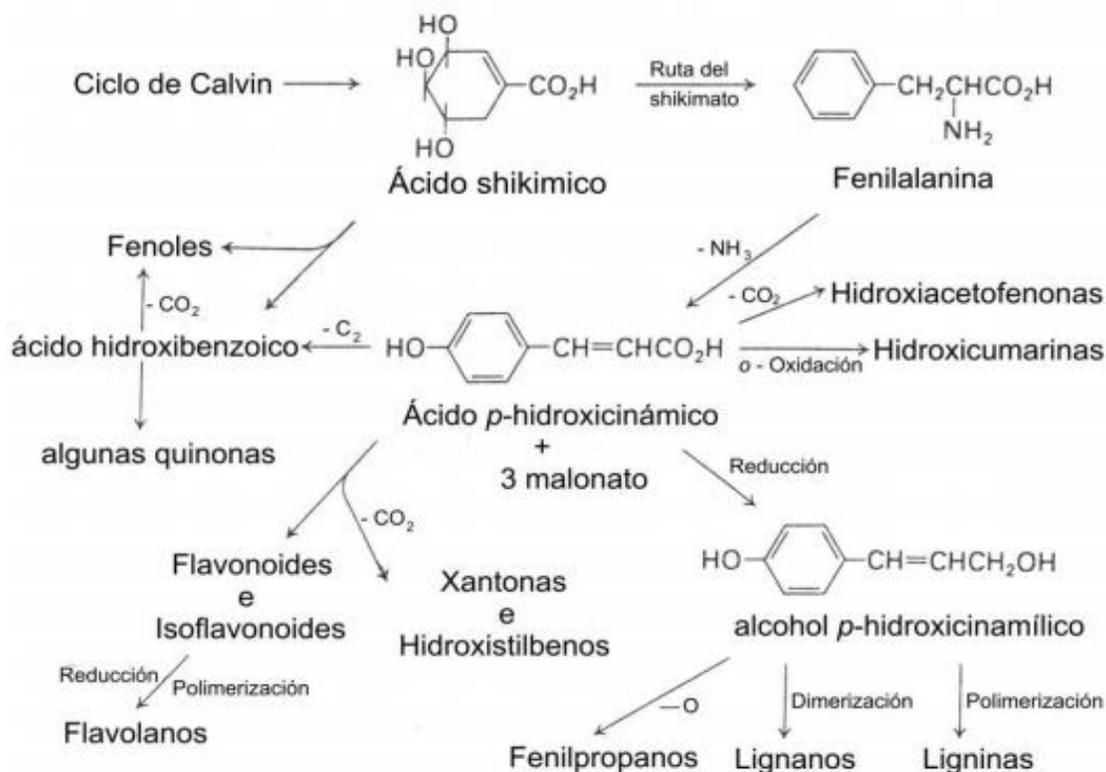


Figura 1.1. Biosíntesis de compuestos fenólicos por la “Vía del Shikimato y fenilalanina”. (Tomado de: González-Jiménez, 2010).

Los flavonoides son el grupo más importante de los compuestos fenólicos, incluyendo flavonas, flavononas, isoflavonas y antocianidinas, las que se sintetizan vía condensación del fenilpropano (C6–C3), la cual se ciclan en condiciones ácidas con la participación de 3 moléculas de malonil coenzima A, debido a esto los flavonoides tienen la estructura básica

de los difenilpropanoides (C6–C3–C6) que consta de dos anillos aromáticos unidos a 3 carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado. La forma oxidativa de esta cadena de 3 carbonos determina las distintas clases de flavonoides (González-Jiménez, 2010).

1.3. FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que ejercen una amplia gama de actividades funcionales como, antimutagénicos, antibacterianos, antiinflamatorios, acciones antialérgicas, antivirales, antitrombóticos, vasodilatadores y fundamentalmente como antioxidante (Markovic, 2007). Su estructura se compone de tres anillos con actividad antioxidante (Figura 1.2). Dos de los anillos son bencénicos que están conectados a través de un anillo pirona que tiene un oxígeno, la estructura de este último los clasifica en seis subclases: flavonas, flavonoles, flavononas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Zhang, 2007).

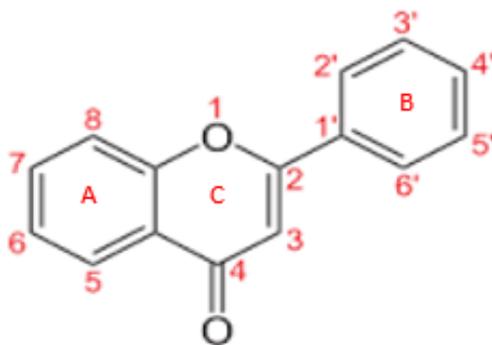


Figura 1.2. Estructura genérica de los flavonoides.

Las diferentes subclases de flavonoides se diferencian en la saturación de concentración y en los sustituyentes del anillo C (Figura 1.3), mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos subgrupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y

B. De esta forma, se han identificado hasta 4.000 compuestos diferentes (Álvarez-Castro y Orallo-Cambeiro, 2003).

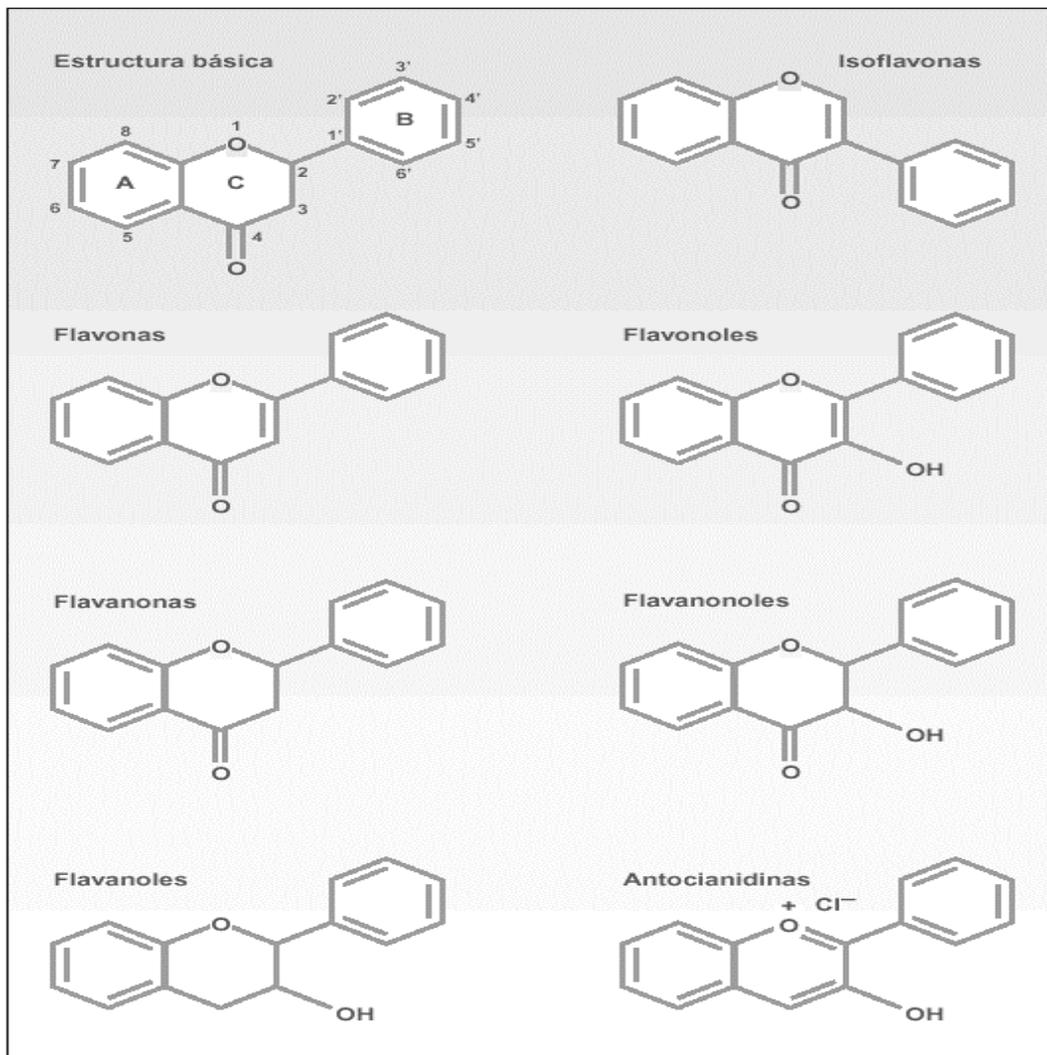


Figura 1.3. Estructura genérica de los flavonoides y de las distintas subclases (Tomado de: Álvarez-Castro y Orallo-Cambeiro, 2003).

Los flavonoides están presentes principalmente en frutas cítricas como derivados glicósidos. Los glicósidos son por lo general O-glicósidos, con un azúcar unido generalmente al grupo hidroxilo aglicona en C-7, o en algunos casos en el C-3. Las agliconas son las formas que carece de los restos de azúcar son menos frecuentes en los jugos, debido a su naturaleza hidrofóbica y por lo tanto su baja solubilidad en agua. Los carbohidratos más comunes de

azúcar incluyen D-glucosa y L-ramnosa. (Gattuso y col., 2007). En la tabla 1.1 se presentan algunos tipos de flavonoides que han sido identificados en jugos de cítricos (Gattuso y col., 2007).

Tabla 1.1. Estructura de algunos Flavonoides.

Flavanonas					Estructura		
	R ₁	R ₂	R ₃				
1	Hesperetin	H	OH	OMe			
2	Naringenin	H	H	OH			
3	Taxifolin	OH	OH	OH			
4	Isosakuranetin	H	H	OMe			
5	Eriodictyol	H	OH	OH			
Flavonas					Estructura		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
1	Acacetin	H	H	H		OMe	
2	Isoscutellarein	H	OH	H		OH	
3	Luteolin	H	H	OH		OH	
4	Kaempferol	OH	H	H		OH	
5	Quereetin	OH	H	OH		OH	
6	Apigenin	H	H	H		OH	
7	Diosmetin	H	H	OH		OMe	
8	Chrysoeriol	H	H	OMe	OH		
Flavonas polimetoxiladas					Estructura		
	R ₁	R ₂	R ₃				
1	Quereetogetin	OMe	H	OMe			
2	3,3',4',5,6,7,8-Heptamethoxyflavone	OMe	OMe	OMe			
3	Natsudaidain	OH	OMe	OMe			
4	Nobiletin	H	OMe	OMe			
5	Sinensetin	H	H	OMe			
6	Tangeretin	H	OMe	H			
7	Tetramethylscutellarein	H	H	H			

Las dietas para humanos suplementadas con flavononas reducen el colesterol del plasma, recientes estudios han demostrado que las flavonas polimetoxilados en combinación con tocotrienoles de palma reducen los triglicéridos del plasma, el colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (Morin y col., 2008). En jugos de naranja dulce comercial, la concentración de naringina es de 21.3 mg L⁻¹ y naringenina 8 mg L⁻¹, en comparación con los jugos de

toronja comercial donde la concentración promedio de naringina es de 435 mg L⁻¹ y naringenina (figura 1.4) 42 mg L⁻¹, respectivamente (Gattuso y col., 2007).

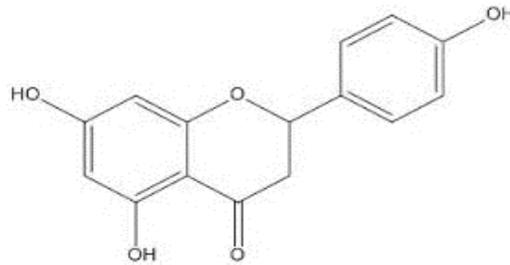


Figura 1.4. Estructura de la naringenina.

Los flavonoides naringina y naringenina, de origen cítrico, son productos químicos funcionales con propiedades importantes en los campos de la salud, alimentación y la agricultura. La naringina es el componente amargo primario en el jugo de toronja, puede ser hidrolizado (Figura 1.5) por la actividad de la α -L-ramnosidasa de la naringinasa en ramnosa y prunin, el prunin puede seguir siendo hidrolizado por el componente β -D-glucosidasa de la naringinasa, en glucosa y naringenina sin sabor (Ribeiro y col., 2008).

Los flavonoides absorben radiación electromagnética en la zona UV - VIS y de esta forma representan una protección natural para las plantas contra la radiación UV del sol. Por otra parte presentan una barrera química de defensa contra microorganismos: hongos, bacterias y virus (López y col. 2003). Está bien documentado que la actividad secuestrante de radicales libres de los flavonoides principalmente depende de la disposición de los sustituyentes dentro de su estructura. Sin embargo, la correlación entre la actividad antioxidante y la estructura de flavonoides todavía no es clara (Mandalari y col., 2007). Estudios previos demostraron que los flavonas polimetoxiladas (Figura 1.6) reducen los niveles de colesterol del plasma en dosis más bajas que las requeridas por flavononas no metoxiladas. La flavona polimetoxilada,

nobiletin, se encontró a más altas concentraciones en naranjas y mandarinas (Morin y col., 2008).

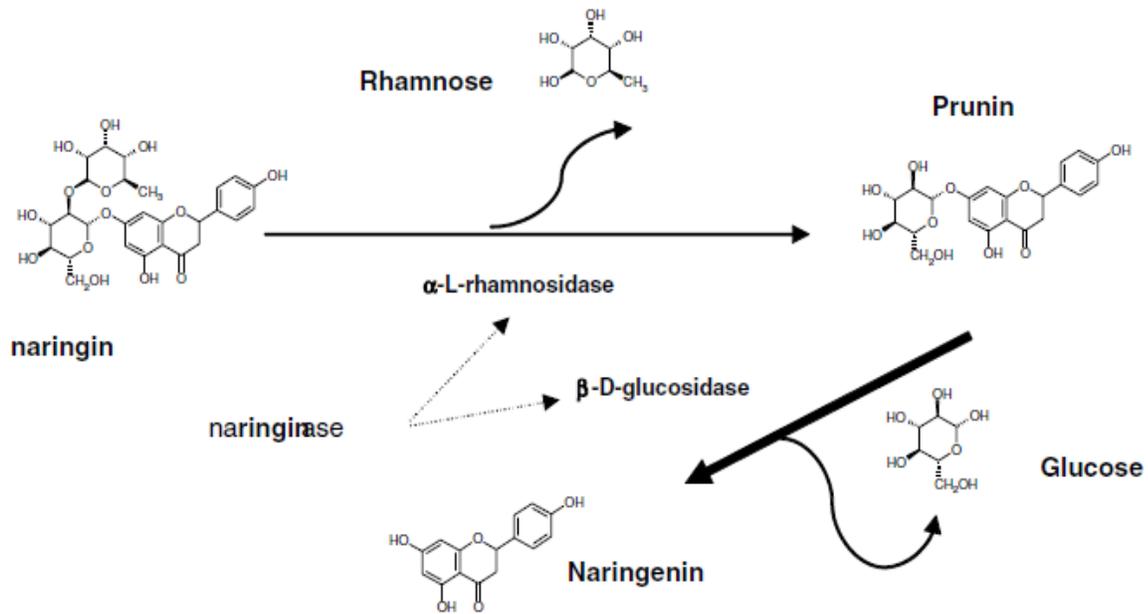


Figura 1.5. Reacción de hidrólisis de la naringina en prunina, ramnosa, naringenina y glucosa por la naringinasa que contiene actividad α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa. (Tomado de Ribeiro y col., 2008).

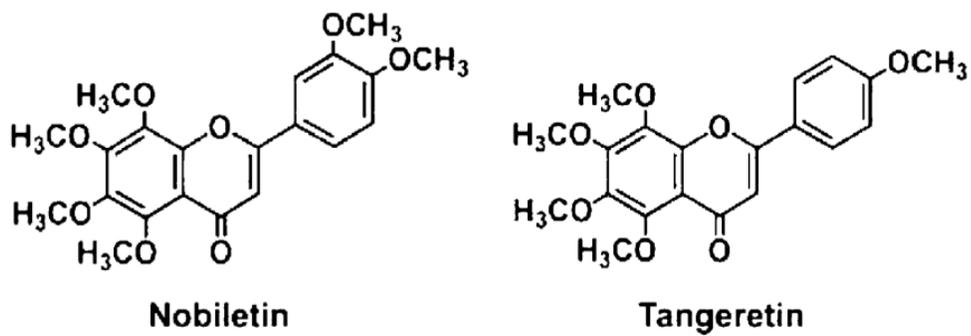


Figura 1.6. Flavonas cítricas polimetoxiladas.

1.4. REACCIONES DE REGIO-SELECTIVIDAD

Los flavonoides tienen varios grupos hidroxilo que pueden ser blanco de reacciones de modificación como la metilación, acetilación, y la glicosilación. Entre estas reacciones, la metilación puede ser mediada por O-metiltransferasas (OMTs), que transfieren un grupo metilo a un grupo hidroxilo. La O-Metilación de flavonoides puede alterar propiedades tales como la solubilidad y la localización intracelular. Las OMTs de plantas han sido ampliamente estudiadas, algunas tienen pesos moleculares que van desde 38 hasta 43 kDa. La metilación de flavonoides usando varias combinaciones de OMTs con diferente regio-selectividad puede ser útil para la síntesis de flavonoides más complejos, y las modificaciones biológicas de los flavonoides podrían ser utilizados en la creación de flavonoides O-metilados para el desarrollo y la producción en masa de nuevos fármacos (Kim y col., 2006). Kim y col. (2005) analizaron la cinética de biotransformación de naringenina con *E. coli* que expresa SOMT-2, convirtiendo naringenina a ponciretina (Figura 1.7), un proceso de biotransformación que se puede aplicar para la producción comercial de ponciretina, el cual al tener un sustituyente metoxilo en el carbono 4' hace que aumente su actividad antioxidante.

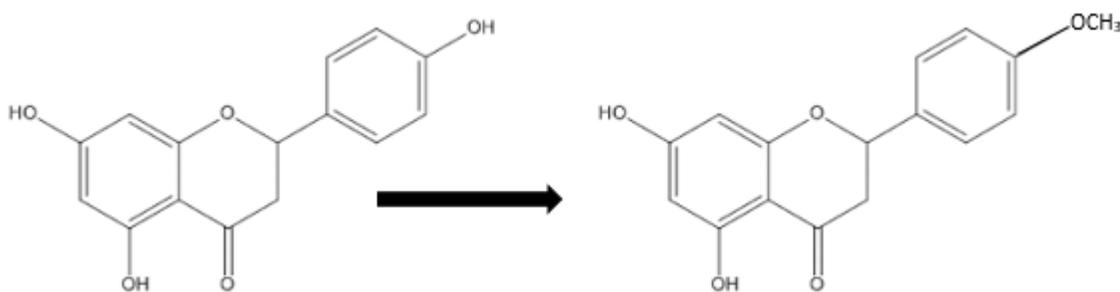


Figura 1.7. Biotransformación de naringenina a ponciretina utilizando células enteras de *E. coli*.

Los O-hidroxi-isoflavones han demostrado tener potentes propiedades antioxidantes que contribuyen a su efecto reductor de colesterol, el efecto antitumoral, la protección

cardiovascular, propiedades anti-cancerígenas, anti-inflamatorios, anti-alergénicos, y como un potente inhibidor de la enzima tirosinasa, asociada con la inhibición de la formación de melanina. La hidroxilación enzimática en posición Orto es atractiva y notable en biosíntesis. El grado de hidroxilación o metoxilación de los flavonoides incrementan sus propiedades antioxidantes. (Kitamura y col., 2013). Las enzimas oxigenasas abarcan diversas familias de proteínas que catalizan la introducción de uno o dos átomos de oxígeno en diversos precursores (Figura 1.8). El aire se emplea como fuente de oxígeno molecular y el poder reductor son obtenidos del NADH o NADHP gracias a proteínas transportadoras de electrones (Castellanos-Molina, 2007).

Las enzimas oxigenasas catalizan reacciones con alta regio-selectividad y predominan principalmente las reacciones de hidroxilación. Las monooxigenasas más exploradas hasta ahora corresponden al grupo Citocromo P450, un grupo variable de enzimas que contienen enzimas *hemo* y catalizan reacciones oxidativas en precursores partiendo desde pequeños alcanos hasta moléculas complejas como esteroides y ácidos grasos (Castellanos-Molina, 2007; Cirino y Arnold, 2002).

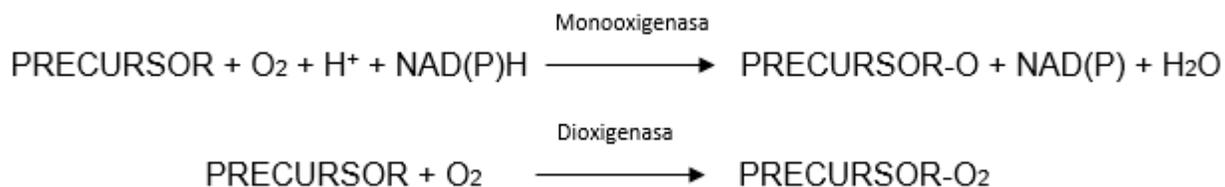


Figura 1.8. Reacciones generales de oxidación catalizadas por las monooxigenasas y dioxigenasas. (Tomado de Castellanos-Molina, 2007).

La enzima monooxigenasa Citocromo P450 es un candidato potencial en la reacción de hidroxilación altamente regio-selectiva preferentemente de compuestos hidrófobos como

oxidante en una gran variedad de reacciones, incluyendo la transferencia de oxígeno molecular a los enlaces C-H no activados de un precursor (Roh, 2013). Se ha informado que la capacidad antioxidante de compuestos hidroxilados es más alta que en compuestos originales (Roh y col., 2009). Las enzimas monooxigenasas de origen microbiano participantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos tienen aplicaciones latentes en áreas como la fabricación de productos farmacéuticos, en la síntesis orgánica, y en la biorremediación de suelos contaminados. Estas enzimas provenientes de microorganismos pertenecen en su gran mayoría a especies bacterianas, levaduras y hongos. Los biocatalizadores, por lo general, actúan favorablemente en condiciones suaves de reacción, tienen alta actividad catalítica y proporcionan una mejor regio-selectividad. En determinados casos se puede observar menor regio-selectividad cuando se emplean células microbianas enteras debido que las células contienen una variedad de grupos de enzimas capaces de bioconvertir al precursor. De gran manera, la regio-selectividad puede ser alterada para nuestro beneficio modificando el medio, añadiendo solventes orgánicos o agregando inhibidores de enzimas no requeridas en el proceso. (Castellanos-Molina, 2007).

1.5 BIOCONVERSIÓN DE COMPUESTOS UTILIZANDO CÉLULAS MICROBIANAS ENTERAS

Los procesos de bioconversión llevan a cabo modificaciones químicas a un determinado precursor utilizando sistemas biológicos. Los sistemas biológicos son nombrados biocatalizadores y se caracterizan por ser enzimas o células enteras, los cuales pueden ser microorganismos naturales o recombinantes. Normalmente se utilizan enzimas libres, sin embargo, es preferente el uso de células enteras ya que son de fácil adquisición y bajo costo. Asimismo, las membranas de las células enteras protegen las enzimas de energías internas que puedan causar rompimiento, de la toxicidad de solventes y favorecen el suministro de

cofactores requeridos para la consecución de reacciones intercelulares (Castellanos-Molina, 2007).

Pycnoporus sanguineus y *C. pubecens* son hongos de pudrición blanca los cuales han sido estudiado principalmente por su capacidad para degradar la lignina. Estos hongos son de especial interés ya que presenta una actividad no específica formando radicales libres, propiedades que determinan la capacidad de oxidación y degradación de diferentes compuestos de estructura molecular compleja. Los hongos de pudrición blanca presentan interés en aplicaciones biotecnológicas y son capaces de producir enzimas extracelulares como peroxidasas, lacasas, celulasas y la celobiosa deshidrogenasa (Chaparro y col. 2009).

Streptomyces cyaneus, es una bacteria productora de enzimas extracelulares como la lacasa que le permite utilizar sustratos más complejos como fuente de carbono, tales como, el almidón y la celulosa, hidrocarburos, lignina, taninos e incluso caucho (Moya-Lobo, 2011). Prasetyo y col., (2011) llevaron a cabo el enriquecimiento de la naringenina con compuestos fenólicos simples ricos en grupos hidroxilos y/o metoxilos utilizando lacasas producidas por *Trametes hirsuta* para mejorar su actividad antioxidante. Kitamura y col., (2013) reportaron la bioconversión de flavonoides a sus correspondientes productos hidroxilados usando células recombinantes de *Escherichia coli*, las cuales expresaron la enzima monooxigenasa citocromo P450BM3.

Castellanos-Molina, (2007) llevó a cabo un proceso de bioconversión en micro escala que permitió la oxidación del L-limoneno y α -pipeno, predominantes en las cáscaras de frutos cítricos. Como biocatalizador empleó una cepa certificada de *Aspergillus niger* y los bioensayos los llevó a cabo empleando viales tipo headspace, en donde la cepa de *Aspergillus niger* creció superficialmente para llevar a cabo la bioconversión. Demyttenaere y Kimpe,

(2001) realizaron la biotransformación de terpenos en medio superficial utilizando células enteras de *Penicillium digitatum*. Las células enteras de *Yarrowia lipolytica* han demostrado previamente potencial para llevar a cabo procesos de oxidación de *sesquiterpenos* en medio superficial utilizando diferentes sistemas (monobásico y bifásico); fases acuosas y orgánicas (Palmerín-Carreño y col., 2015). *Yarrowia lipolytica* es una de las levaduras " no convencional " más estudiadas, es un microorganismo estrictamente aerobio capaz de producir metabolitos de gran importancia y posee una potente actividad secretora, lo que justifica el uso en la industria (como un biocatalizador), en biología molecular y en los estudios de genética. También, *Y. lipolytica* se ha tomado en cuenta como un modelo conveniente para estudios de dimorfismo en levaduras. *Y. lipolytica* tiene la actividad para degradar compuestos orgánicos, incluyendo hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en algunos casos junto con la producción de biosurfactantes. *Y. lipolytica* es capaz de producir ácido cítrico y aromas de una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo azúcares, alcanos, aceites vegetales, hidrolizados de almidón, etanol, y glicerol (Coelho y col., 2010). Madej y col., (2013) llevaron a cabo la bioconversión de la naringenina a productos hidroxilados de mayor valor agregado (Cartamidina e Isocartamidina) utilizando células enteras de *Rhodotorula marina* para mejorar sus actividades funcionales y fundamentalmente su actividad antioxidante.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN

El consumo de flavonoides provenientes de alimentos de origen vegetal en la dieta humana ha tenido gran incremento en nuestros días, debido a que dichos compuestos se han relacionado con una serie de efectos benéficos a la salud, como antimutagénicos, antibacterianos, antiinflamatorios, acciones antialérgicas, antivirales, antitrombóticos, vasodilatadores y fundamentalmente como antioxidante. Por ello, se justifica el estudio de la naringenina, flavonoide abundante en la toronja, al que se le han demostrado efectos antioxidantes. Las dietas para humanos suplementadas con flavonoides polimetoxilados reducen triglicéridos del plasma, colesterol total y lipoproteínas de baja densidad. Al llevar el enriquecimiento de la naringenina, ya sea hidroxilandola o metoxilandola, se pretende mejorar su actividad antioxidante e identificar los cambios que sufre la naringenina utilizando células microbianas enteras. Este estudio también será de apoyo como revisión bibliográfica para estudios posteriores.

2.2 HIPÓTESIS

La bioconversión de flavonoides cítricos a sus correspondientes compuestos enriquecidos utilizando células microbianas enteras permite mejorar el rendimiento y la identificación de la regio-selectividad de la bioconversión.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la bioconversión del flavonoide cítrico Naringenina a compuestos enriquecidos utilizando células microbianas enteras.

2.4 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar una cepa con capacidad de bioconversión de un flavonoide cítrico modelo a productos enriquecidos.
2. Identificar la regio-selectividad de la bioconversión de un flavonoide cítrico modelo a compuestos enriquecidos utilizando células microbianas enteras.

2.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL: Se utilizó un conjunto de materiales y métodos para cumplir con los objetivos propuestos. Para la realización experimental del presente trabajo, se establecieron dos etapas generales; en la primera se llevó a cabo la selección de una cepa que presentase la capacidad de bioconversión de un flavonoide modelo naringenina. En la segunda etapa se planteó identificar la regio-selectividad en la bioconversión del flavonoide modelo y si esta se ve modificada en diferentes sistemas mono y bifásico. La figura 2.1 se esquematiza la estrategia general utilizada.

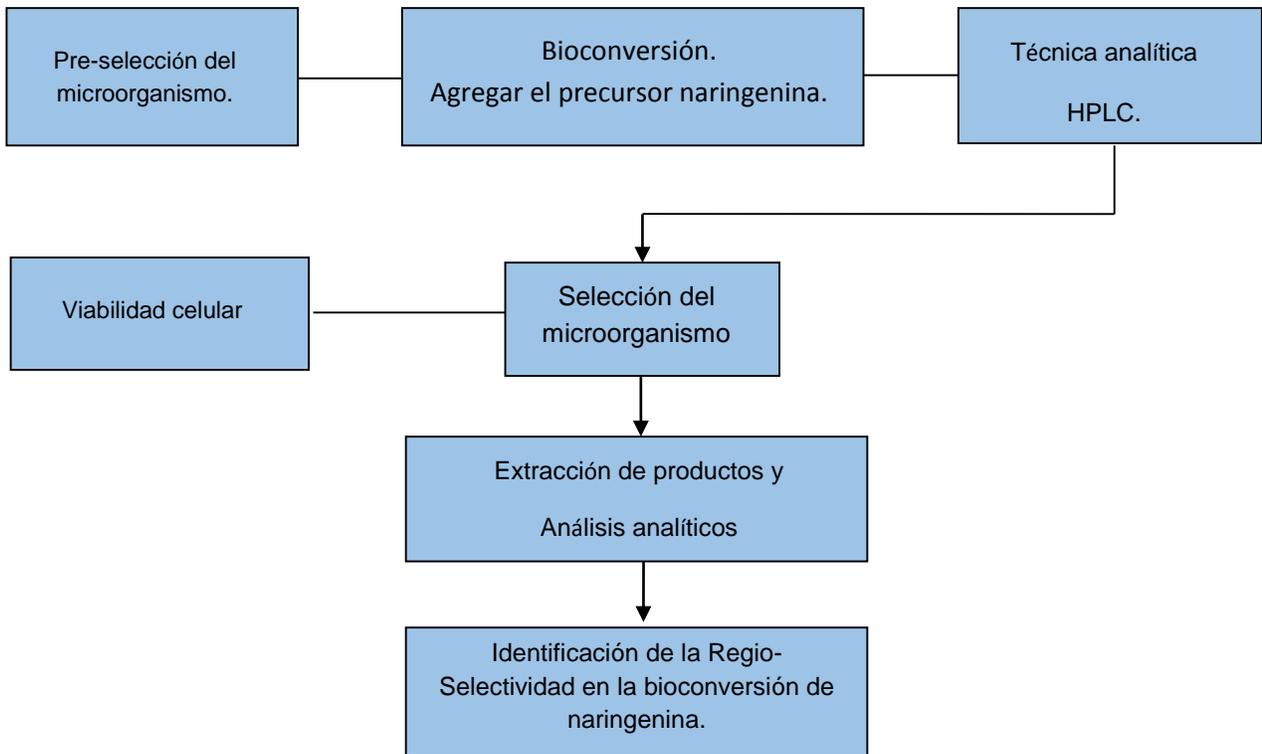


Figura 2.1. Diagrama general de la estrategia propuesta empleada en el presente trabajo para el cumplimiento de los objetivos planteados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

El flavonoide Naringenina (≥ 95 %) y el polipropilenglicol fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Los solventes metanol (≥ 99 %) y ácido acético glacial (≥ 99 %) fueron obtenidos de J.T. Baker.

El acetonitrilo grado HPLC fue obtenido de Karal S.A. de C.V.

3.2. CEPAS UTILIZADAS PARA LA SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

Las cepas utilizadas en este estudio pertenecen al cepario de la Planta Piloto 4 (PP4) del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Se pre-seleccionaron cuatro cepas: *Streptomyces cyaneus*, *Picnoporus sanguineus*, *Yarrowia lipolytica* y *C. pubecens* (figura 3.1). El screening se llevó a cabo utilizando frascos serológicos de acuerdo a la técnica desarrollada por Palmerín-Carreño y col. (2015).

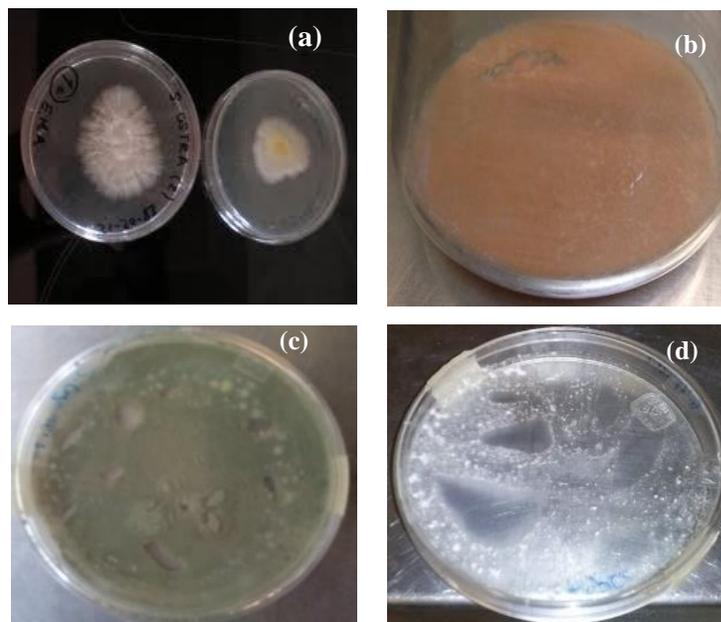


Figura 3.1. Cepas utilizadas en el proceso de bioconversión: (a) *P. sanguineus*, (b) *Y. lipolytica*, (c) *S. cyaneus* y (d) *C. pubecens*.

Los cultivos preservados en tubos inclinados, fueron propagados en matraces Erlenmeyer con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubados durante 7 días a 30 °C. Pasados los 7 días

se re-suspendieron las células con 10 mL de NaCl 0.15 M y se conservaron a 4 °C. Para la preparación del inóculo de 1×10^6 células/mL, se tomaron células re-suspendidas y se inocularon en frascos serológicos de 25 mL con 5 mL de medio PDA e incubados durante 7 días a 30 °C.

3.3. CONTEO CELULAR

Se realizaron tres diluciones en base 10, la primera dilución de 1:10 se obtuvo adicionando 100 μ L de células con 900 μ L de solución salina NaCl 0.15 M (Meyer, 2363-500), se agitó la dilución para que fuese homogénea, la segunda dilución 1:100 se realizó tomando 100 μ L de la dilución 1:10 y 900 μ L de NaCl 0.15 M, la tercera dilución 1:1000 se realizó de la misma manera, tomando 100 μ L de la dilución 1:100 y completando con 900 μ L de NaCl 0.15 M. Previo a efectuar el conteo de células, se agitó cada dilución en un vórtex (Thermolyne, 16700 Mixer), la muestra se tomó con una micropipeta y por capilaridad se adicionó en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Bright-Line 0.100 mm); se efectuaron las lecturas en un microscopio (ZE155, modelo-184200), se enfocó con el objetivo 10x y se contaron las células presentes con el objetivo 40x dentro de los cuatro cuadrantes de los extremos en la cámara. Se realizó el cálculo del número de células, tomando el número total de las células dividiéndolo por los cuatro cuadrantes contados, se multiplicó por 10^4 (volumen de la cámara de Neubauer) y después por el factor de dilución, el resultado se registró como el número de células contenidas en un mililitro.

3.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 100 mL de medio mineral con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono, se adicionó un volumen adecuado de 150 μ L el cual contiene un inóculo de 1×10^6 células/mL. Los matraces se mantuvieron en agitación a 200 rpm a una temperatura de 30 °C. Durante la cinética se tomaron muestras de 4 mL cada 15 minutos durante la primera hora, cada 30 minutos durante las siguientes dos horas (con la finalidad de obtener datos de la fase exponencial de crecimiento), y posteriormente cada hora.

3.5. PESO SECO

Para la determinación de peso seco se utilizaron alícuotas de 10 mL de cultivo celular. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 min (Centrifuge-5418) y se desechó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se re-suspendieron y centrifugaron nuevamente con NaCl 0.15 M, se desechó el sobrenadante. Las células se re-suspendieron en 2 mL de agua destilada en micro tubos previamente pesados y secados durante 48 horas a 60 °C. Los microtubos fueron secados en una estufa (Felisa) a 60 °C durante 24 horas hasta tener peso constante, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La biomasa se calculó por la diferencia de peso entre los micro tubos con células y los micro tubos sin células.

3.6. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CONCENTRACIÓN CELULAR

Con la densidad óptica y el peso seco se obtuvo una curva de calibración de biomasa (g/L) vs densidad óptica (DO) a 664 nm, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9956$ (ANEXO I, Figura AI.1). La curva se empleó para determinar la concentración celular que se usaron en los experimentos de bioconversión.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR POR DENSIDAD ÓPTICA

Para la determinación de la concentración celular las muestras se analizaron midiendo la DO en un espectrofotómetro (SHIMADZU, UV-1800) a una longitud de onda de 664 nm. Las absorbancias obtenidas se interpolaron utilizando una curva estándar de DO vs concentración celular (g/L) (Sección 3.6). Se empleó como blanco el medio de cultivo sin células (Jian-Shin, 1977).

3.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo mediante la técnica propuesta por Bonora y Mares (1982). Se tomaron alícuotas de un cultivo de *Y. lipolytica* al tiempo correspondiente a al final de la fase exponencial de crecimiento (48 h). La densidad óptica se determinó a 664 nm con un espectrofotómetro (SHIMADZU, UV-1800). La curva de calibración (ANEXO I, Figura AI.3) para *Y lipolytica* se obtuvo mediante la relación de la DO contra el porcentaje de las células muertas, usando células vivas en suspensión pre-tratadas con azul de metileno como blanco.

3.9. SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO EN LA BIOCONVERSIÓN

Los experimentos de bioconversión para la selección del microorganismo se llevaron a cabo en frascos serológicos (Figura 3.2) con medio de cultivo PDA e inóculo de 1×10^6 células/mL. Después de 7 días de crecimiento a 30 °C, se agregó el precursor naringenina de la siguiente forma: Se adicionaron 5 mL de una solución de naringenina (42 mg/L previamente disueltos en 1.5 % de metanol) cubriendo el crecimiento superficial de cada cepa. Los frascos serológicos fueron colocados en un desecador llenando su base con agua, con el fin de evitar pérdidas por volatilización, manteniendo una temperatura de 30 °C.

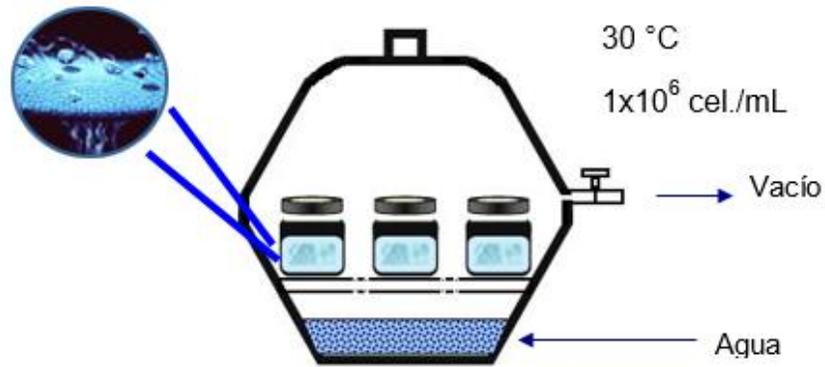


Figura 3.2. Selección del microorganismo utilizando frascos serológicos.

El diseño experimental que se propuso para la selección del microorganismo es el siguiente:

- Planteamiento del experimento: Observar el efecto del tipo de cepa sobre bioconversión de flavonoides
- Se evaluó un factor: Tipo de cepa
- Niveles de tipo de cepas: 4 cepas
- Variable respuesta: Producción de Flavonoides enriquecidos.
- Repeticiones: 3
- Se eligió un diseño experimental completamente aleatorizado

3.10. IDENTIFICACIÓN DE LA REGIO-SELECTIVIDAD

El Protocolo es similar a la selección del microorganismo. Los pasos fueron idénticos hasta donde se agrega el precursor naringenina (42 mg/L) en tres diferentes sistemas y se desarrolló de la siguiente manera:

- En frascos serológicos con medio de cultivo PDA previamente inoculados (1×10^6 células/mL) e incubados por 7 días a 30 °C, se agregó una solución de naringenina cubriendo el crecimiento superficial de cada cepa.

- En otros frascos serológicos previamente inoculados (1×10^6 células/mL) e incubados por 7 días a 30 °C, pasado el tiempo de incubación se adicionó naringenina (42 mg/L) disuelta en polipropilenglicol cubriendo el crecimiento superficial de la cepa.
- Finalmente en otros frascos serológicos previamente inoculados (1×10^6 células/mL) e incubados por 7 días a 30 °C, se adicionó una mezcla heterogénea en volúmenes iguales de una solución de naringenina (42 mg/L) y polipropilenglicol cubriendo el crecimiento superficial de la cepa.

El diseño experimental que se propuso para la identificación regio-selectiva es el siguiente:

- Planteamiento del problema: Identificar la regio-selectividad en donde actúan los microorganismos en la bioconversión de naringenina
- Se evaluó un factor: Tipo de sistema
- Niveles de Tipo de sistema: 3 (Sistema: H₂O + naringenina, Sistema: Polipropilenglicol + naringenina, Sistema: H₂O + naringenina + polipropilenglicol)
- Variable respuesta: Identificar la regio-selectividad en donde actúa el microorganismo.
- Repeticiones: 3
- Se eligió un diseño experimental completamente aleatorizado

3.11. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Utilizando la técnica propuesta por Madej y col. (2014) se llevó a cabo el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Agilent 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos (UV-VIS) y una bomba binaria (ANEXO IV, Figura IV.1), se utilizó una columna de fase inversa C-18 (ZORBAX Eclipse 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm).

Se utilizó un gradiente lineal de acetonitrilo (solvente A) y 0.1% de ácido acético (solvente B) (Tabla 3.1) a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, el volumen de inyección fue de 20 µL y la temperatura del horno de 30 °C. Las muestras antes de ser inyectados al HPLC fueron centrifugadas y filtradas (filtros de 0.2 µm).

Tabla 3.1. Gradiente utilizado para el análisis de HPLC

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	75	25
10	62	38
28	62	38
30	75	25
36	75	25

Con el método cromatográfico perfeccionado por Madej y col. (2014) para la cuantificación de compuestos fenólicos, se obtuvo la cuantificación de un flavonoide modelo, la naringenina, determinando el tiempo de retención, 14.903 min y posteriormente se realizó una curva patrón del estándar (ANEXO II, Figura AII.1). El precursor fue disuelto en metanol (grado HPLC) para llevar a cabo la curva patrón. La identificación de las formas enriquecidas se obtuvo por datos espectrales de masa utilizando cromatografía de líquidos acoplada a masas marca Dionex Ultimete 3000 equipado con una bomba analítica cuaternaria LPG-3400SD, se utilizó una columna fase inversa (Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 50 mm, 2.7 µm). Se utilizó un gradiente isocrático de 65 % de acetonitrilo y 0.1 % de ácido fórmico a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, el volumen de inyección fue de 30 µL y la temperatura del horno de 30 °C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO PARA LA BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA

En la Figura 4.1, se presentan los resultados obtenidos de la bioconversión de naringenina, para cada una de las cepas con un tiempo máximo de 192 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. De las cuatro cepas probadas *Yarrowia lipolytica*, *Sreptomyces cyaneus*, *Pychoporus sanguineus* y *C. pubecens*, se puede observar que *Y. lipolytica* fue la única cepa que llevó a cabo la bioconversión utilizando 42 mg/L de naringenina como precursor, mostrando el mejor potencial de bioconversión de naringenina a sus correspondientes compuestos enriquecidos, posiblemente hidroxilados.

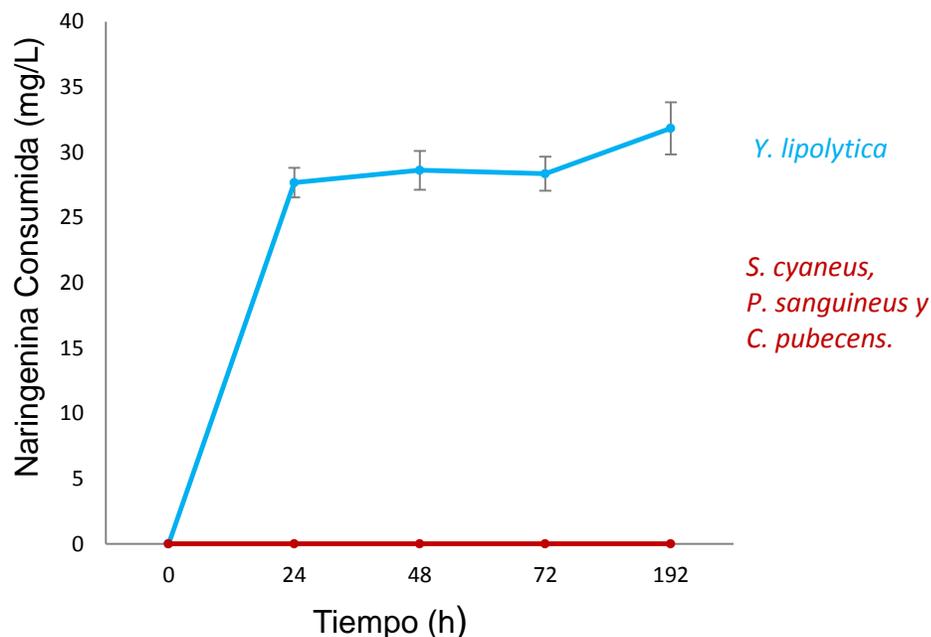


Figura 4.1 Cinética de bioconversión de naringenina.

Los resultados comparativos del análisis de varianza para la selección del microorganismo se presentan en la Tabla 4.1. El valor de probabilidad fue menor de 0.05, lo que indica que existe

diferencia significativa entre *Y. lipolytica* y las otras tres cepas probadas en el proceso de bioconversión a un nivel del 95 % de confianza. Palmerín-Carreño y col. (2015) reportaron el uso de células enteras de *Yarrowia lipolytica* para llevar a cabo la oxidación de (+)-valenceno en medio superficial.

Tabla 4.1. Resumen del ANOVA para el análisis en el consumo de naringenina, Sistema 1.
Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>Y. lipolytica</i>	3	89.3236436	29.7745479	55.1380621
<i>S. cyaneus</i>	3	0	0	0
<i>P. sanguineus</i>	3	0	0	0
<i>C. pubecens</i>	3	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1994.67833	3	664.892776	48.2347584	1.8145E-05	4.06618055
Dentro de los grupos	110.276124	8	13.7845155			
Total	2104.95445	11				

A partir de este resultado se puede concluir que el tipo de cepa influye en la bioconversión de naringenina y se consideró el descartar las cepas que no presentaron la capacidad de bioconversión de naringenina. Por lo tanto se seleccionó la cepa de *Y. lipolytica*, la cual presenta potencial de convertir la naringenina a sus correspondientes compuestos enriquecidos, posiblemente hidroxilados, para continuar con los estudios de bioconversión,

4.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Y. lipolytica*

Una vez seleccionada la cepa que lleva a cabo la bioconversión del naringenin, se realizaron cinéticas de crecimiento y viabilidad de *Y. lipolytica* en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio mineral. Se puede observar en la Figura 4.2 que la fase exponencial se presenta entre las 15 y 36 h. De las 36 a 48 h se observa claramente la fase estacionaria. Después de conocer la cinética de crecimiento, se llevó a cabo el proceso de bioconversión agregando el precursor naringenina.

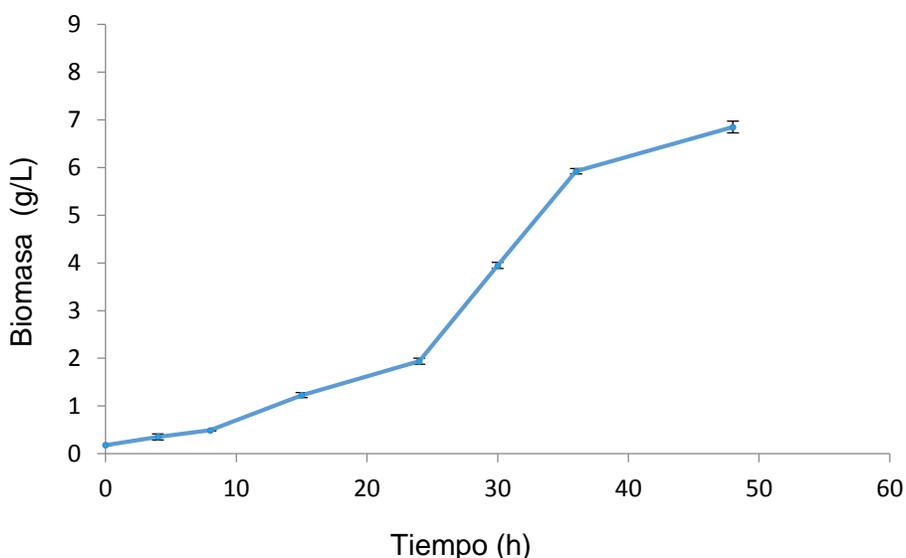


Figura 4.2. Cinética de crecimiento de *Y. lipolytica* (0-48 horas).

La figura 4.3 presenta la comparación de las cinéticas de producción de biomasa y viabilidad celular a partir de que se inoculó la levadura *Y. lipolytica* y durante el proceso de bioconversión. Se emplearon 100 mL de medio mineral líquido con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se puede observar claramente la fase estacionaria después de 48 h de crecimiento de *Y. lipolytica* con producción de biomasa de 6.1 g/L. Para llevar a cabo la bioconversión se realizó la adición del precursor a las 48 h de crecimiento.

Después de un día de haber sido agregado el precursor se comienza a observar la muerte celular, hasta llegar al 43 % de células vivas a los 192 h del proceso. Los flavonoides actúan como fitoalexinas donde las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques, presentando una barrera química de defensa contra microorganismos: hongos, bacterias y virus (López y col. 2003, Gimeno 2004).

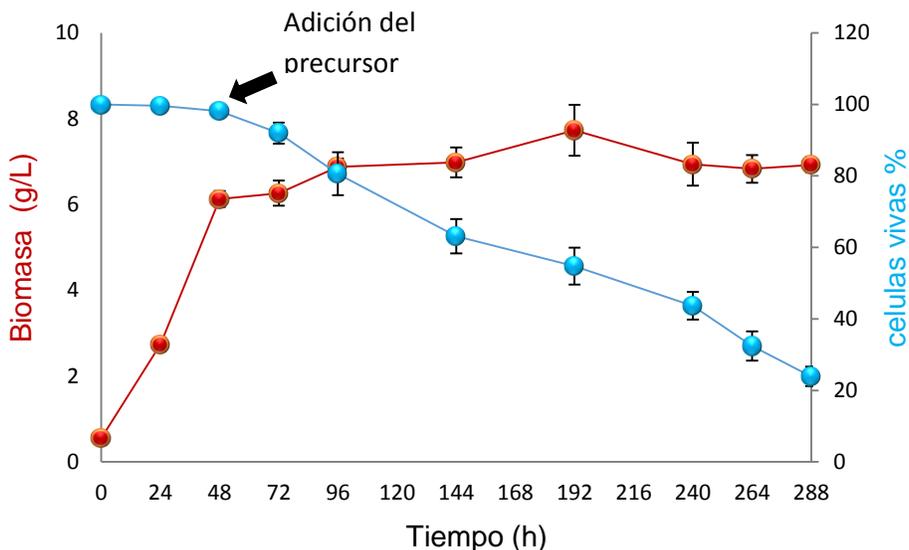


Figura 4.3. Producción de biomasa y viabilidad celular de *Y. lipolytica*, 30 °C, pH 5.5, medio mineral, 200 rpm, 1×10^6 células/mL, 30 g/L glucosa.

Sin embargo, al analizar las muestras del proceso de bioconversión por HPLC los resultados obtenidos nos indicaron que no se realizó la oxidación de naringenina para obtener productos enriquecidos en este caso productos hidroxilados. Posiblemente, esto se debió al cambio de medio de cultivo con respecto al cultivo superficial. Por lo que se decidió continuar con los experimentos de bioconversión en cultivo superficial.

4.3. SISTEMA 1 (ACUOSO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR *Y. lipolytica*

El sistema 1 se llevó a cabo utilizando frascos serológicos llevando la bioconversión de naringenina sobre un cultivo superficial. Los cromatogramas de las muestras obtenidas durante la bioconversión de naringenina utilizando *Y. lipolytica* a las 24 y 192 h, se presentan en la Figura 4.4a y 4.4b, respectivamente. En la Figura 4.4a se observan 3 picos mayores a tiempos de retención diferente (trs de 2.531, 3.489 y 4.456 min, respectivamente), mientras que el tiempo de retención de 13.989 min corresponde al estándar de naringenina; por lo que otros picos podrían ser posibles productos de la bioconversión por *Y. lipolytica*.

En la Figura 4.4b se presentan 5 picos que en función a los tiempos de retención podrían corresponder a posibles productos hidroxilados (trs de 2.522, 3.530, 4.227, 4.910 y 5.955 min, respectivamente) formados a las 192 h. Se observa que la naringenina aún sigue presente con una concentración de 10.16 mg/L después de 192 h de bioconversión. Estas muestras fueron analizadas por cromatografía de líquidos acoplada a masas para su posible identificación (sección 4.5).

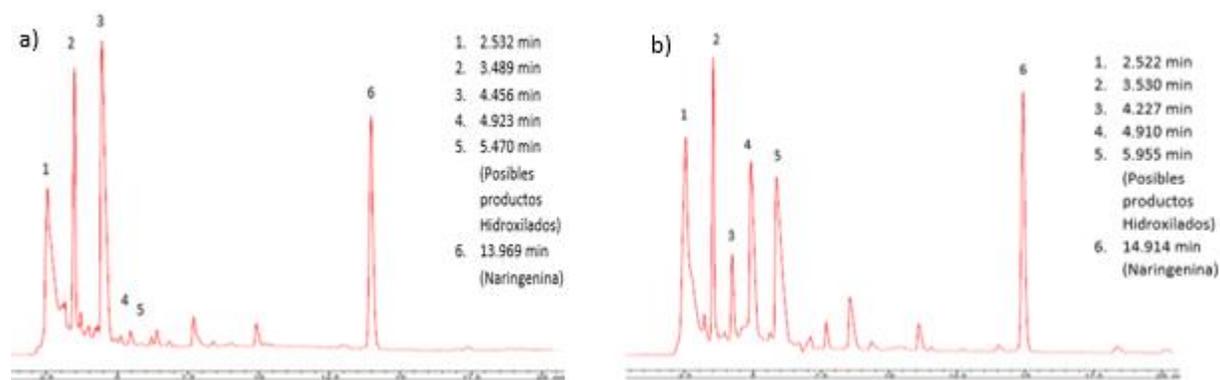


Figura 4.4. Cromatograma (HPLC) de bioconversión por *Y. lipolytica* de la naringenina, a) 24 h y b) 192 h después de agregarse el precursor.

4.4. SISTEMA 2 (ORGÁNICO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR *Y. lipolytica*

El sistema orgánico se llevó a cabo en frascos serológicos, se agregó una solución de naringenina disuelta en polipropilenglicol cubriendo el crecimiento superficial de cada cepa, con el fin de identificar y comparar la regio-selectividad con los sistemas 1 y 3. En la Figura 4.5a y 4.5b se presentan los cromatogramas del proceso de bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* a las 24 y 192 h, respectivamente. Los primeros 2 picos (trs de 3.837 y 14.438 min, respectivamente) que se observan en la Figura 4.5a pertenecen al metanol y al solvente orgánico en este caso del polipropilenglicol, el tercer pico que se observa pertenece al precursor naringenina. En este sistema no se presenta bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica*. La enzima citocromo monoxigenasa P450 que expresa las células enteras de *Yarrowia lipolytica* ha demostrado previamente potencial para llevar procesos de oxidación de *sesquiterpenos* utilizando una fase orgánica en medio superficial (Palmerin-Carreño y col., 2013). Por lo que se llegó a suponer, que el polipropilenglicol tiene una alta afinidad por el precursor (además de poseer una alta viscosidad) el cual no permitió llevar a cabo la oxidación de la naringenina a compuestos enriquecidos de interés para este estudio.

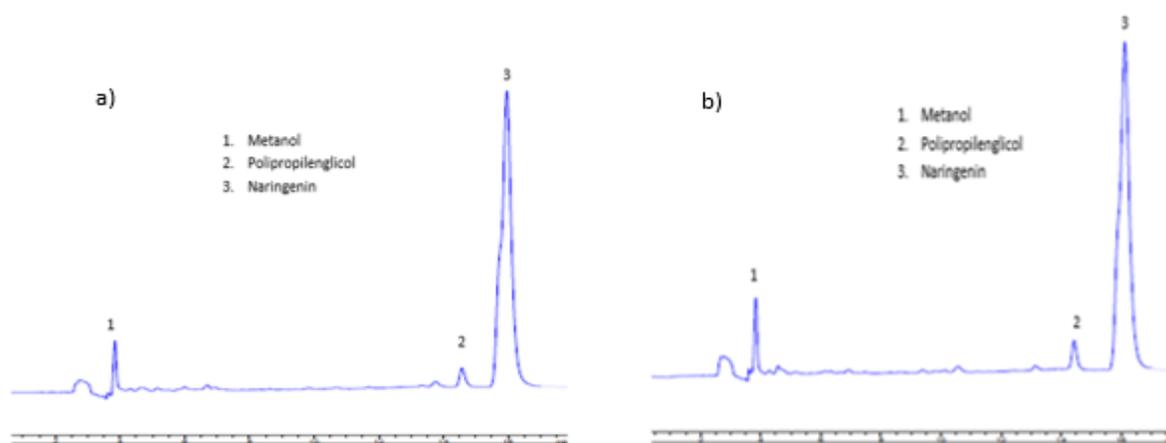


Figura 4.5. Cromatograma (HPLC) donde se presenta el proceso de bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* con; a) 24 h y b) 192 h de incubación.

4.5. SISTEMA 3 (BIFÁSICO) BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR *Y. lipolytica*

En frascos serológicos, se agregó una mezcla heterogénea en volúmenes iguales de una solución de naringenina y polipropilenglicol cubriendo el crecimiento superficial de la cepa, formando un sistema bifásico, este sistema se llevó a cabo con el fin de identificar y comparar la regio-selectividad con los sistemas 1 y 2. En la Figura 4.6 se presentan los cromatogramas del sistema 3 de las muestras tomadas de la fase acuosa, en donde se observan posibles productos hidroxilados. En la figura 4.6a se presentan tres posibles productos hidroxilados de interés para este estudio (trs de 2.702, 3.418 y 3.861 min, respectivamente) después de 24 h de bioconversión por *Y. lipolytica*.

En la figura 4.6b se presenta el cromatograma del proceso de bioconversión de naringenina llevado a cabo por *Y. lipolytica* 192 h. Se observan los mismos tres posibles productos que a las 24 h (trs de 2.811, 3.408 y 3.865 min, respectivamente), pero también se llega a percibir otros posibles productos de menor abundancia. Lo que podría indicar que el sistema 3 también se lleva a cabo la bioconversión de naringenina.

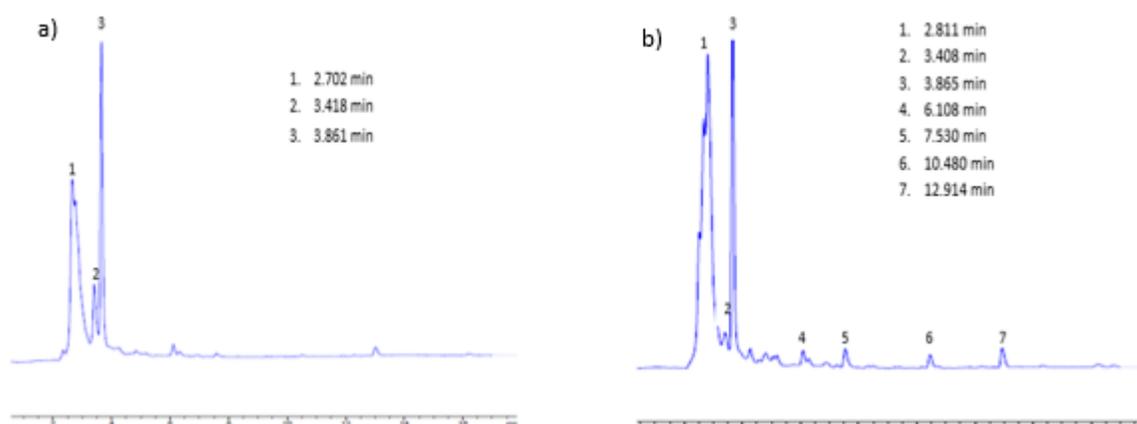


Figura 4.6. Cromatograma (HPLC) donde se presenta el proceso de bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* con a) 24 horas y b) 192 h de incubación. (Sistema 3, Fase Acuosa).

También se observó que la fase orgánica del sistema bifásico no mostró productos oxidados de interés para este estudio, ya que al igual que el sistema 2 (Sistema Orgánico) no se observan picos relevantes aparte de la naringenina y los solventes.

La regio-selectividad se llevó a cabo comparando la bioconversión en los sistemas utilizando los cromatogramas [figuras 4.4b (Sistema 1) y 4.6b (Sistema 3)] en donde se observan picos de interés (Sistema 1; tiempos de retención de 2.522 min y 3.530 min, Sistema 3; tiempos de retención de 2.811min y 3.865 min) después de 192 h de bioconversión.

En la tabla 4.2 se presenta el análisis de varianza para la determinación de la regio-selectividad en los tres sistemas diferentes. El valor de probabilidad fue menor de 0.05, lo que indica que existe diferencia significativa en los sistemas utilizados para la bioconversión de la naringenina, a un nivel del 95 % de confianza.

Tabla 4.2. Resumen del ANOVA para el análisis de regio-selectividad, Sistemas 1, 2 y 3.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Sistema 1	3	89.3236436	29.7745479	55.1380621		
Sistema 2	3	0	0	0		
Sistema 3	3	110.007299	36.6690997	1.68643266		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2278.68142	2	1139.34071	60.1505063	0.00010721	5.14325285
Dentro de los grupos	113.648989	6	18.9414982			
Total	2392.33041	8				

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados del análisis de varianza para la determinación de la regio-selectividad en el sistema 1 y sistema 3, este análisis se llevó a cabo para comparar si existe diferencia significativa entre estos 2 sistemas. El valor de la probabilidad fue mayor de 0.05, lo que indica que no existe diferencia significativa en los sistemas 1 y 3 a un nivel del 95 % de confianza. Los sistemas 1 y 3 influyen en el proceso de oxidación de la naringenina llevado a cabo por *Y. lipolytica*.

Tabla 4.3. Resumen del ANOVA para el análisis de regio-selectividad, Sistema 1 y Sistema 3.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
		89.323643	29.774547	55.138062
Sistema 1	3	6	9	1
		110.00729	36.669099	1.6864326
Sistema 3	3	9	7	6

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
	71.302267		71.302267	2.5095609		7.7086474
Entre grupos	5	1	5	8	0.18833189	2
	113.64898		28.412247			
Dentro de los grupos	9	4	4			
	184.95125					
Total	7	5				

4.6. FRAGMENTACIÓN DE MASAS

En la Figura 4.7 se presentan los posibles productos de bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 192 h después de la adición del precursor detectados por HPLC-MS. En el cromatograma se observa el resultado obtenido, en este caso el pico con mayor importancia para este estudio fue el pico 5 con un tiempo de retención de 11.3 min. Este fue el pico de mayor interés para este trabajo debido a que su peso molecular es de 288 g/mol, indicándonos que *Y. lipolytica* es un biocatalizador que lleva a cabo la bioconversión de naringenina, obteniendo un producto hidroxilado con formula condensada de $C_{15}H_{12}O_6$.

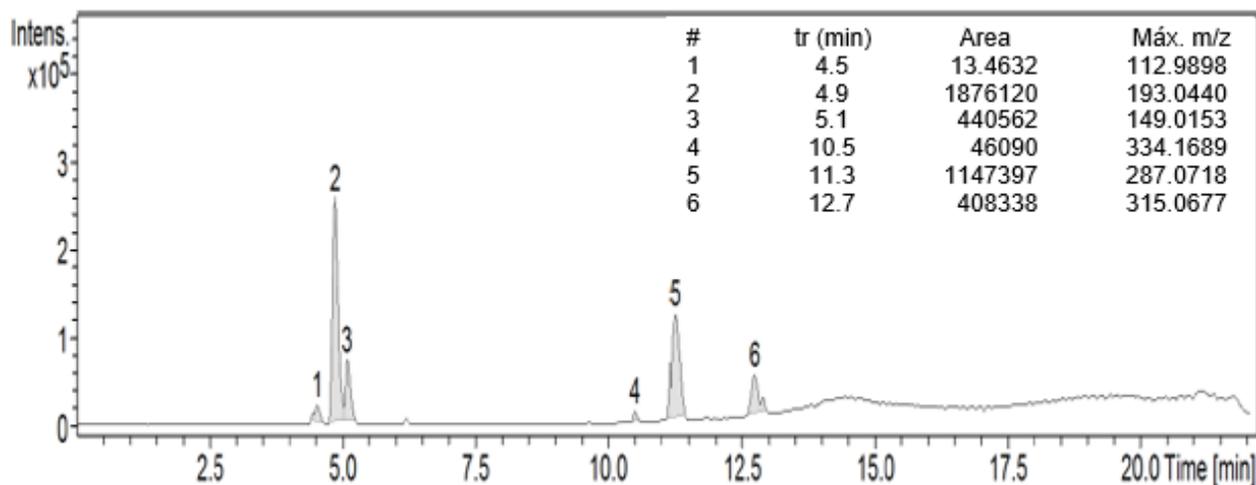


Figura 4.7. Espectro HPLC-MS de la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* después de 192 h.

La fragmentación de masas se presenta en la Figura 4.8, el cual nos indica que hay bioconversión llevada a cabo por *Y. lipolytica* biocatalizando al precursor naringenina, los resultados obtenidos en la fragmentación nos indica que el producto hidroxilado por *Y. lipolytica* tiene un peso molecular de 288 g/mol con formula $C_{15}H_{12}O_6$. El uso del HPLC-MS fue de gran ayuda para este trabajo al poder indicarnos que *Y. lipolytica* es un biocatalizador del

naringenin; sin embargo, el equipo no identificó el apelativo del producto debido a que no se contaba con una biblioteca adecuada, sin embargo, fue de gran apoyo para evidenciar la bioconversión. Los demás productos no son descartados, tal vez pueden ser productos con mayor valor agregado, en un estudio futuro pueden ser analizados para determinar con mayor precisión el tipo de compuestos que se están produciendo, ya que para fines de este estudio el objetivo es obtener un producto hidroxilado por la oxidación de la naringenina en un proceso de bioconversión llevado a cabo por *Y. lipolytica*. De acuerdo al peso molecular (288 g/mol) que presenta el producto no identificado este podría ser eriodictiol, cartamidina, isocaetamidina y aromadetrina. La identificación del producto se llevará a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear en un estudio posterior. La naringenina ha sido oxidada por células enteras de *Rhodotorula marina* a productos hidroxilados, obteniendo cartamidina e isocartamidina los productos fueron identificados por Resonancia Magnética Nuclear (Madej y col., 2014).

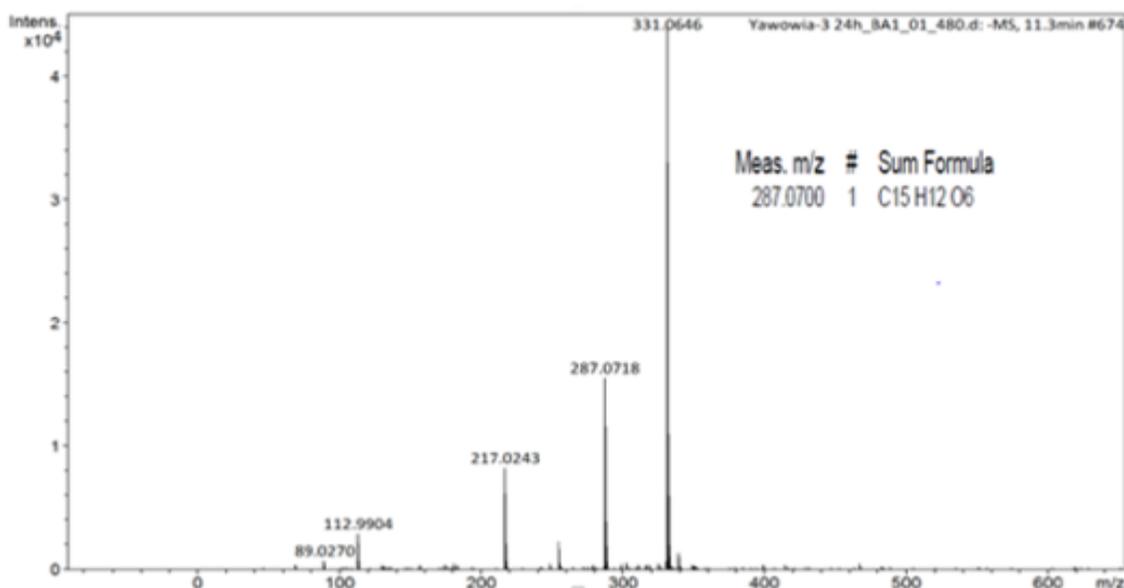


Figura 4.8. Fragmentación en el proceso de bioconversión del naringenin por *Y. lipolytica* con 192 horas de incubación.

La Figura 4.9 presenta el posible mecanismo de bioconversión para este estudio. Se propone que la bioconversión se lleva a cabo por la acción de la enzima monooxigenasa P450, la cual es producida por *Y. lipolyca*. La enzima P450 presenta las características necesarias para llevar a cabo la reacción de hidroxilación regio-selectiva como oxidante en una gama de todas las reacciones, incluyendo la transferencia de oxígeno molecular a los enlaces C-H de un sustrato (Roh, 2013). El aire sirve como fuente de oxígeno molecular y los equivalentes de reducción son obtenidos del NADH o NADHP gracias a proteínas de transferencia de electrones.

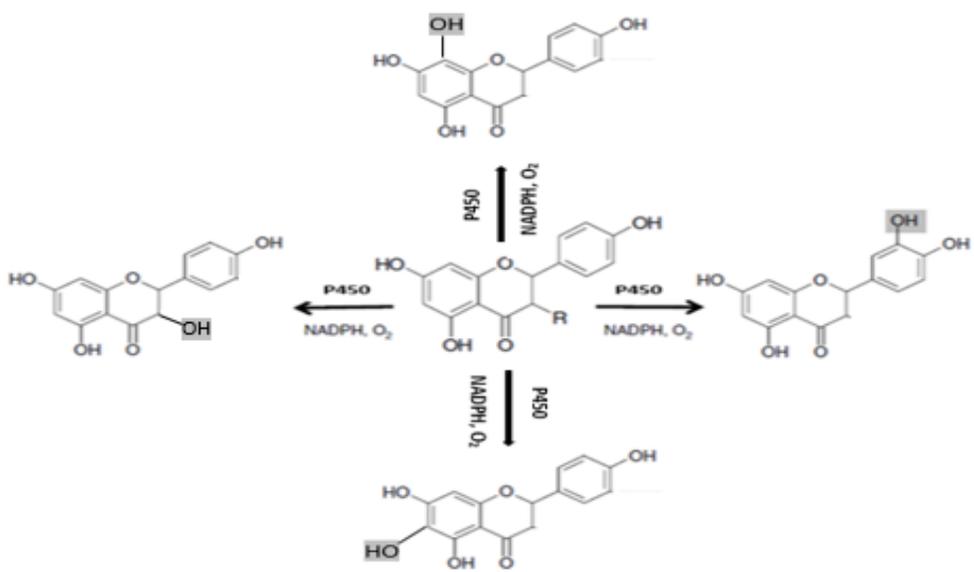


Figura 4.9. Posible mecanismo de bioconversión. (Tomado de: Seitz y col. 2007).

En la Figura 4.10 se presenta de manera general el ciclo catalítico de la enzima P450, que interviene en la bioconversión de naringenina a productos hidroxilados. Las enzimas oxigenasas catalizan reacciones con alta regio-selectividad y predominan principalmente las

reacciones de hidroxilación (Cirino y Arnold, 2002). El producto esperado en la bioconversión por la levadura *Y. lipolytica* podría ser un flavonoide con mayor capacidad antioxidante y con diversas aplicaciones en la industria. Las enzimas monooxigenasas de origen microbiano participantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos tienen aplicaciones latentes en áreas como la fabricación de productos farmacéuticos, en la síntesis orgánica, y en la biorremediación de suelos contaminados. Estas enzimas provenientes de microorganismos pertenecen en su gran mayoría a especies bacterianas, levaduras y hongos (Castellanos-Molina, 2007).

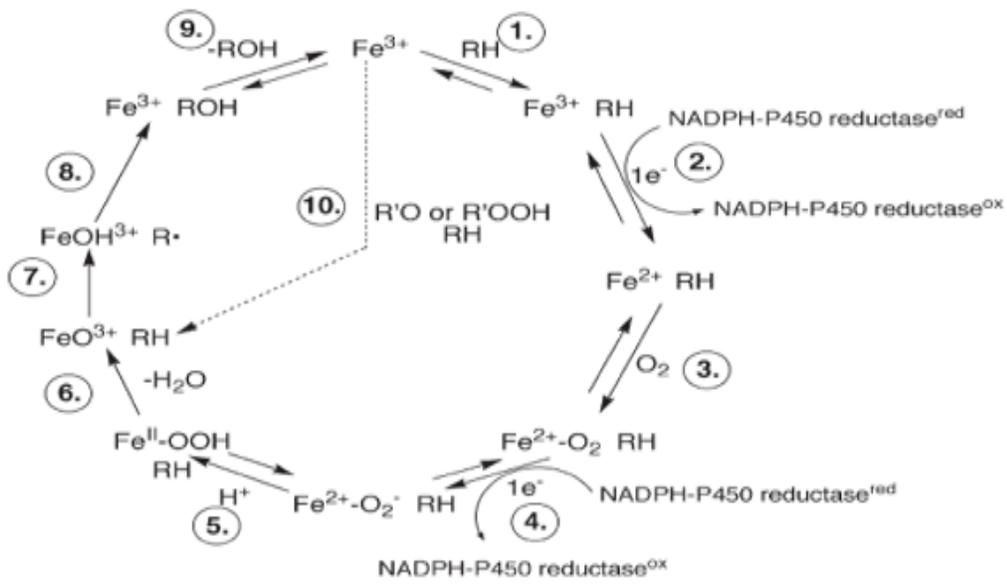


Figura 4.10. Ciclo catalítico de la enzima P450 generalizado. (Tomado de: Emre y Peter, 2007).

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo la reacción de oxidación de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab como biocatalizador a través de un proceso factible bajo condiciones comunes de presión y temperatura. El producto de oxidación puede poseer importantes aplicaciones en la industria farmacéutica principalmente debido a su poder antioxidante, ya que el grado de hidroxilación en los flavonoides aumenta la capacidad antioxidante.

La composición de los medios de cultivo tanto superficial como líquido no afectó el crecimiento de la levadura, pero sí se observa efecto significativo en el proceso de bioconversión. Mediante un cultivo superficial empleando medio PDA se llevó a cabo la oxidación de la naringenina para obtener un producto hidroxilado.

Empleando el medio líquido con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono, no fue posible la oxidación para obtener el producto hidroxilado, en este medio la naringenina como precursor no conduce a la formación de compuestos hidroxilados

Fue posible lograr la bioconversión de naringenina empleando los sistemas 1 y 3 (Fase acuosa) en un proceso a micro escala utilizando a *Y. lipolytica* 2.2ab como biocatalizador. La naringenina como precursor no conduce a la formación de compuestos hidroxilados empleando el sistema 2 y 3 (fase orgánica) en el proceso de bioconversión utilizando a *Y. lipolytica* 2.2ab como biocatalizador, al parecer no se llevó a cabo la bioconversión por la alta viscosidad y afinidad del polipropilenglicol hacia el precursor.

Las técnicas analíticas utilizadas fueron validadas obteniendo estimaciones adecuadas con relación a los límites de precisión y detección, aunque, la técnica de HPLC-MS no presentó como tal el resultado esperado, ya que se esperaba el apelativo del producto; sin embargo, fue de gran utilidad en la identificación de la fórmula condensada del producto, por lo que es recomendable el uso en este tipo de procesos, de igual manera el producto será identificado empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear.

6.RECOMENDACIONES

La concentración de los productos hidroxilados durante el proceso de bioconversión de la naringenina llevado a cabo por células enteras de *Y. lipolytica*, se obtendrá una vez de que se tenga los resultados por Resonancia Magnética Nuclear. Se identificaran los productos y se realizará una curva estándar para obtener la concentración real de productos.

En este estudio se llevó a cabo el análisis de ciertas variantes que contribuyen en el proceso de bioconversión. Sin embargo, existen variantes que no fueron estudiadas y que pueden influir evidentemente en el proceso, por ejemplo, la concentración de oxígeno, el pH y la luminosidad. Para llevar a cabo el progreso de un sistema escalado y optimizado sería necesario incluir estas variantes.

Para este estudio los procesos de biocatálisis y bioconversión se llevaron a cabo utilizando células microbianas enteras, por lo que sería interesante el uso de cultivos de células vegetales que demuestren el potencial de bioconversión, o llevar a cabo las manipulaciones genéticas a cepas que anteriormente hayan demostrado tener capacidad de bioconversión y así poder aumentar la actividad biocatalítica.

También es posible emplear otros precursores de interés, por ejemplo flavonoides con menor actividad antioxidante que permitan la formación de compuestos importantes en la industria, principalmente en la farmacéutica.

En diversos estudios se ha llevado a cabo la aplicación de las enzimas P450 para procesos de bioconversión, el cual sería deseable estudiar diferentes microorganismos que expresen este tipo de enzimas usando diferentes precursores o aceites esenciales, fundamentalmente en aquellos en los cuales destaca un componente específico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Castro, E. y Orrallo-Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Ambito farmacéutico. Bioquímica*. 22. 10. 130-140.
2. Bonora, A. y Mares, D. (1982). A Simple colorimetric Method for Detecting Cell Viability in Cultures of Eukaryotic Microorganisms. *Current Microbiology*. 7. 217- 222.
3. Castellanos-Molina F. E. (2007). Biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites de naranja y mandarina, empleando *Aspergillus niger*. Tesis *Magíster* en Química. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga, Colombia. 54-58.
4. Chaparro, D. F., Rosas, D.C. y Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*. 26. 4. 238–243
5. Cirino, P.C. y Arnold, F.H. (2002). Protein engineering of oxygenases for biocatalysis *Current Opinion in Chemical Biology*. 6. 2. 130 -135.
6. Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., y Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. 2. 930-940.
7. Creus, E. V. A. G. (2010). "Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud." *Ámbito farmacéutico*. 23. 6. 80-84.
8. Demyttenaere, J. and Kimpe, N. (2001). Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11. 265-270.
9. Emre, M. y Peter, F. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 1770. 3. 314–329

10. García-Ramírez, B. (2005). Absorción in vivo de Oligómeros de Epicatequina. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Universidad Rovira i Virgili, Tarragona. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. España. 36-40.
11. González- Jiménez, F. E. (2010). Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. Tesis de Maestría en ciencias en alimentos. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. 12-13 p.
12. Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*. 12. 8. 1641-1673.
13. Jian-Shin C. (1977). Turbidity. *American Aociety for Microbiology. News*. 43:241.
14. Kim, B.G., Kim, H., Hur, H.G., Lim, Y., Ahn, J.H., (2006). Regioselectivity of 7-Omethyltransferase of poplar flavones. *Journal of Biotechnology*. 126. 241-247.
15. Kim, D.H., Kim, B.G., Lee, Y., Ryu, J Y., Lim, Y., Hur, H.G., Anh, J.H. (2005). Regiospecific methlation of naringenin to ponciretin by soyben O-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 119. 155-162.
16. Kitamuara E., Otamatsu T., Maeda C., Aoki Y., Ota C., Misawa N., Shindo K. (2013). Production of Hydroxilated Flavonoids with Cytocrome P450 BM3 Variant F87V ans Their Antioxidative Activities. *Biosci Biochem Biotechnol*. 77. 6. 1340-1343.
17. Lopez, S., Angela, A., Cabrera, M. G., Alvarez, R. E. y Verdun, C. E. (2003). Búsqueda de usos alternativos de própoleos en el control biológico de hongos fitopatógenos. 8.

18. Madej, A., Poplonski, J. y Huszcza, E. (2014). Improved oxidation of Naringenin to Carthamidin and Isocarthamidin by *Rhodotorula marina*. *Applied Biochemistry and Biotechnology Journal Impact Factor*. 173: 67-73.
19. Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B. y Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103. 6. 2056-2064.
20. Markovic, J. D. (2007). Flavonoids, the role and the importance in modern investigations. *Acta Agriculturae Serbica*, 12. 23. 25-36.
21. Morin B., Nichols L.N.A., Zalasky K.M., Davis J.W., Manthey J.A., Holland L.J. (2008). The citrus Flavonoids Hesperetin a Nobiletin Differentially Regulate Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription in HepG2 Liver Cells. *The Journal of Nutrition: Biochemical, Molecular and Genetic Mechanism*. 1274-1281.
22. Moya-Lobo, R. (2011). Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológico. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Departamento de Microbiología y Parasitología. España. 184.
23. Palmerín-Carreño D.M., Rutiaga-Quiñones O.M., Verde Calvo J.R., Prado-Barragán A., Huerta-Ochoa S. (aceptado-2015). Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT - Food Science and Technology*. (ISSN: 0023-6438) DOI: 10.1016/j.lwt.2015.06.065.
24. Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. (2011). Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds. *Process Biochemistry*. 46:1019-1024.

25. Ribeiro, I. A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H., & Ribeiro, M. H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 52. 13-18.
26. Roh, C. (2013). Biotransformation for multiple regioselective hydroxylation of isoflavonoid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2. 403-408.
27. Roh C., Seo, S.H., Choi, K.Y., Cha, M., Pandey, B.P., Kim, J.H., Park, J.S., Kim, D.H., Chang, I.S., Kim, B.G. (2009). Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitiles* Ma-4680. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108. 41-46.
28. Seitz, C., Ameres, S., & Forkmann, G. (2007). Identification of the molecular basis for the functional difference between flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase. *FEBS letters*. 581. 18. 3429-3434.
29. Zhang, J. (2007). Flavonoids in Grapefruit and Commercial Grapefruit Juices: Concentration, Distribution, and Potential Health Benefits. In *Florida state horticultural society*. 120. 288-294).
30. <http://www.nutrinat.com/actualidadsalud/suplementosnaturales/antioxidantes/antioxidantes-el-auge-de-los-polifenoles#.VaQwevntmkr>, visitado; el 1 de Junio del 2015.

8. ANEXOS

ANEXO I. Curva de calibración para la cuantificación de biomasa y viabilidad celular

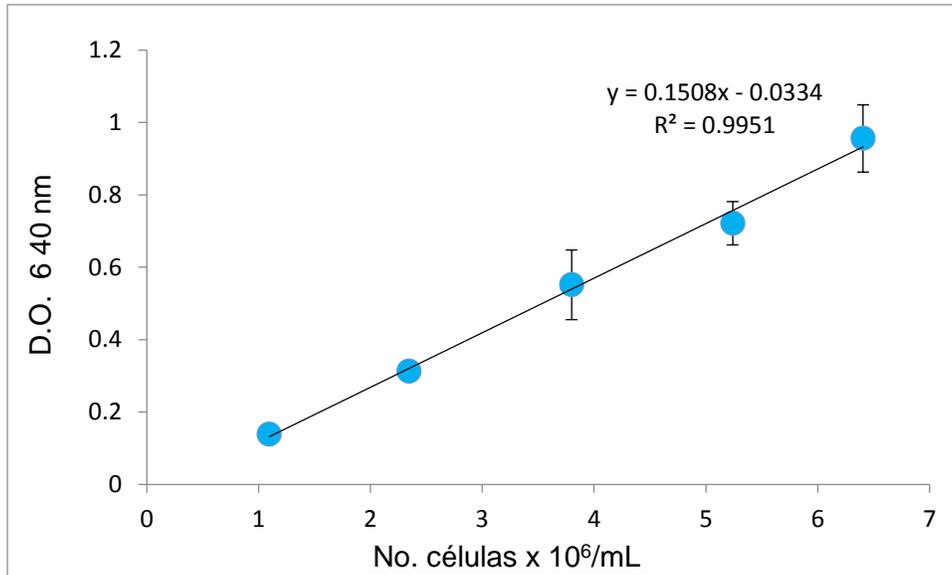


Figura A1.1. Curva patrón de crecimiento de *Y. lipolytica* (células/mL) durante el proceso de bioconversión.

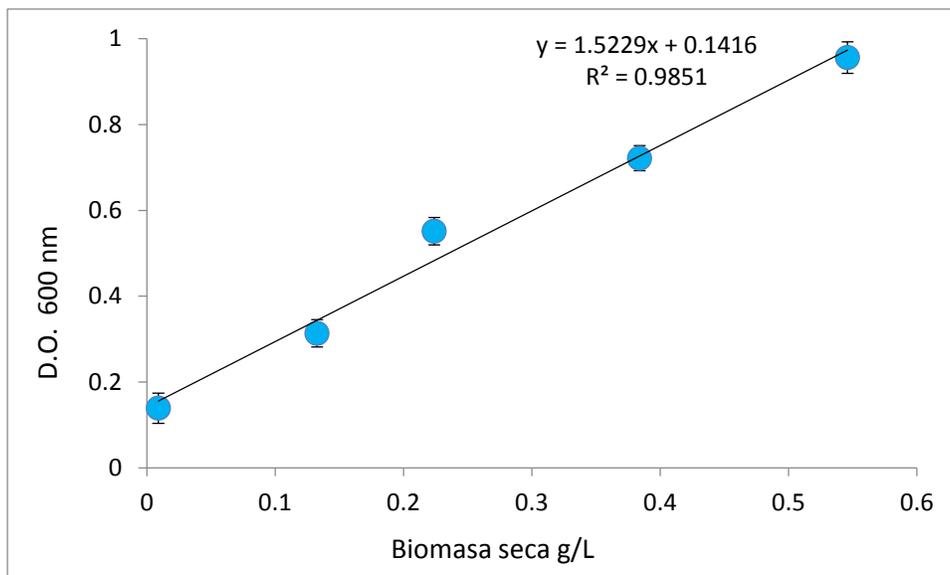


Figura A1.2. Curva patrón para la estimación de la concentración de biomasa en peso seco.

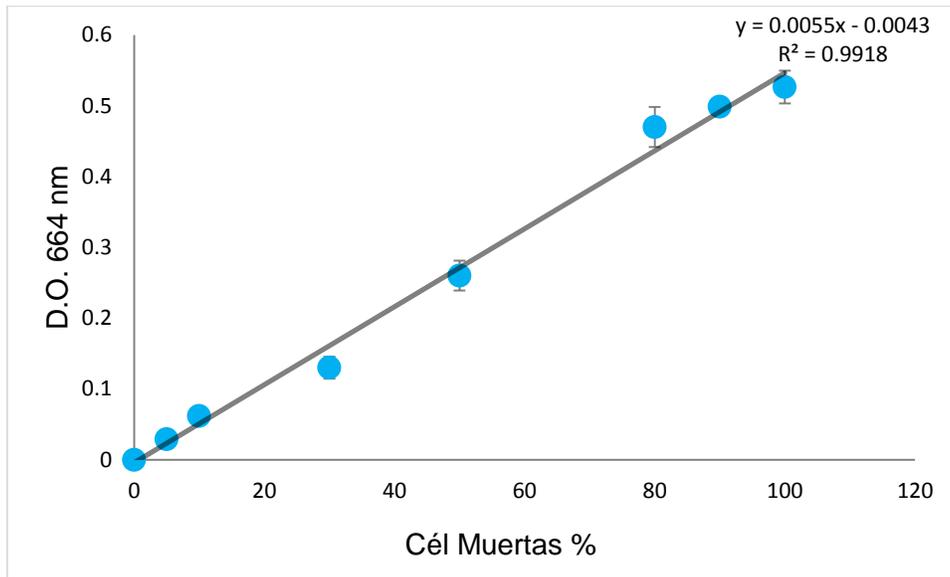


Figura AI.3. Curva estándar para estimar la viabilidad celular de *Y. lipolytica*.

ANEXO II. Curva para determinar la concentración del estándar naringenina.

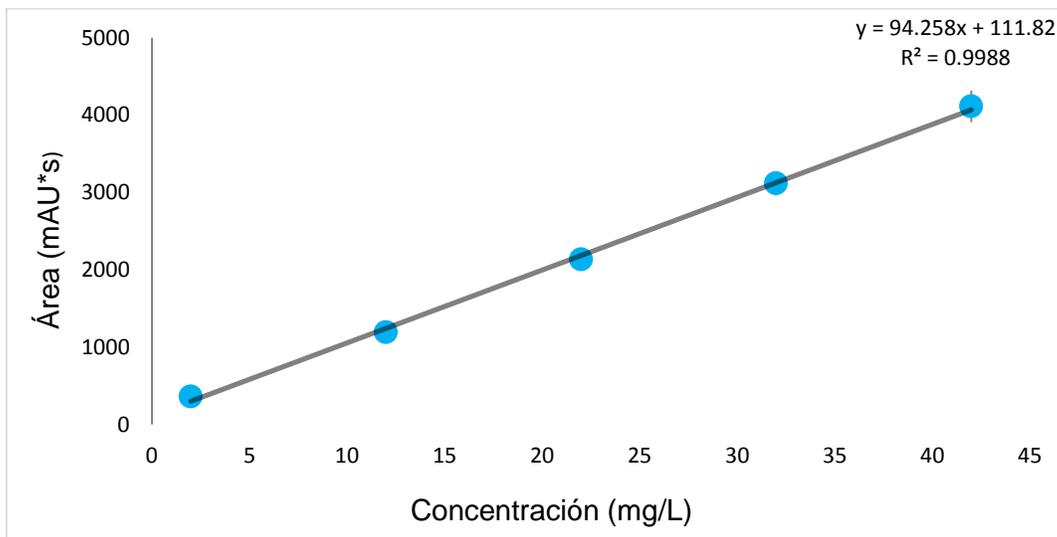


Figura AII.1: Curva patrón de la naringenina.

ANEXO III. Crecimiento de *Y. lipolytica* en medio mineral



Figura AIII.1 *Y. lipolytica*, 30°C, pH 5.5, medio mineral, 200 rpm, 1×10^6 células/mL, 30 g/L glucosa.

ANEXO IV. Equipos utilizados en el análisis de resultados.



Figura AIV.1. HPLC utilizados en los análisis de resultados