

## BIOTRANSFORMACIÓN DEL LIMONENO PARA LA OBTENCIÓN DE TERPENOIDES POR LA ACCIÓN DE BACTERIAS: *Rhodococcus erythropolis* y *Xanthobacter sp*

### RESUMEN

Se llevó a cabo la biotransformación del limoneno empleando las bacterias *R. erythropolis* y *Xanthobacter sp.*, y un medio mineral de buffer fosfato de pH 7.0. Luego de crecidas las bacterias a 30 °C en medio YAG (Agar Levadura-Glucosa) durante 4 y 8 días, respectivamente, la solución fue empleada para los ensayos de biotransformación en donde se varió el tiempo de reacción y concentración de limoneno. En un tiempo de 72 horas y una concentración de 850 ppm de limoneno, *R. erythropolis* generó Linalol (0.147%), trans óxido de limoneno (0.104%) y carvona (0.071%).

**PALABRAS CLAVES:** Biotransformación, terpenoides, epóxidos de limoneno, *Rhodococcus erythropolis* y *Xanthobacter sp*

### ABSTRACT

*It was carried out the biotransformation of the limonene using bacteria R. erythropolis and Xanthobacter sp, and a mineral medium of phosphate buffer of pH 7.0. After swellings the bacterias to 30°C in the medium YAG (Yeast-Agar-Glucose) during 4 and 8 days, respectively, the solution was used for the biotransformation tests in where the time of reaction and concentration of substrate was varied. The time of 72h and concentration of 850ppm of limonene, R. erythropolis generated: Linalool (0.147%), trans oxide of limonene (0.104%) and carvona (0.071%).*

**KEYWORDS:** Biotransformation, terpenoids, limonene epóxides, *Rhodococcus erythropolis* and *Xanthobacter sp*

### GLORIA ASTRID PRIETO S.

Químico, Ms.C  
Estudiante Doctorado en Química  
Investigadora CICTA-CENIVAM  
Universidad Industrial de Santander  
Docqui3@uis.edu.co

### JANETH AIDE PEREA V.

Químico, Ph.D  
Profesora Planta  
Universidad Industrial de Santander  
aperea@uis.edu.co

### ELENA STASHENKO

Químico. Ph.D  
Profesora Planta  
Directora y Representante Legal de CENIVAM  
Universidad Industrial de Santander  
elena@tucan.uis.edu.co

## 1. INTRODUCCIÓN

Los terpenos son una gran clase de metabolitos secundarios de las plantas de los cuales, el limoneno está distribuido por lo menos en 300 especies, por lo que se convierte en un sustrato disponible a bajo costo para ser usado en los procesos de biotransformación (PB). Un gran número de sus derivados oxigenados conocidos como terpenoides son importantes como aromas y fragancias en la industria de alimentos y perfumes. Su obtención es posible mediante la oxidación del limoneno haciendo uso de células: bacteriales, hongos, levaduras, cianobacterias, microalgas, plantas y enzimas solubles o inmovilizadas [1]. El éxito de los PB usando microorganismos radica en la habilidad que tienen las células de las diferentes fuentes para seleccionar específicamente un sustrato y transformarlo en productos de interés, es decir su potencial enantioselectivo y enantioespecífico. Las bacterias del género *Rhodococcus*: *Rhodococcus erythropolis* DCL14, [2], [4] y [5], y *Rhodococcus opacus* [5], y del género *Xanthobacter*: *Xanthobacter* C20 [6], han sido las más utilizados hasta el momento. Dentro de los terpenoides generados se encuentran los alcoholes: cis y trans carveol, alcohol perílico,  $\alpha$ -terpineol, isopiperitenol, cetonas como la carvona y óxidos u epóxidos de limoneno.

## 2. CONTENIDO

### 2.1 Materiales

Se empleó como sustrato el dl-Limoneno del 99,9% de pureza de MERCK. Las bacterias *Rhodococcus erythropolis* y *Xanthobacter sp*, fueron adquiridas de la casa comercial DSMZ y los medios de cultivo de OXOID.

### 2.2 PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.2.1 Crecimiento Celular

Las bacterias *R. erythropolis* y *Xanthobacter sp*, fueron crecidas a 30°C sobre caja petri empleando como medio de cultivo Agar Levadura-Glucosa (YAG). Una vez crecidas, fueron diluidas en medio salino (0.85% NaCl y 0.1% TWEEN 80), se centrifugo, se retiro la solución sobrenadante y se obtuvo el pellet, el cual fue lavado con solución buffer fosfato 50mM. El pellet fue disuelto en 7 mL de buffer y se almacenó a 4 °C. Esta solución de células fue empleada para las pruebas de biotransformación.

#### 2.2.2 Ensayos de Biotransformación

El medio empleado para llevar a cabo la biotransformación fue el medio mineral (MM) reportado por Hartmans [6]. La reacción se llevo a cabo tomando 5

mL de MM en viales head space de 15 mL, luego se adicionó 0.3mL de solución de células y 10 µL de una solución de limoneno del 10%. Posteriormente se sellaron los viales con agrafes provistos de septum de silicona, para evitar la evaporación del limoneno. Se realizó seguimiento al PB con el tiempo, 24, 48, 72, 96 y 192 horas. La interrupción al proceso se llevo a cabo adicionando 3 mL de diclorometano que a su vez fue también el solvente extractor. Se centrifugo y la fase orgánica fue retirada. Se repitió el proceso de extracción una vez más. La fase orgánica se seco son Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró por corriente de nitrógeno hasta obtener un volumen final de 1.0 mL. Se tomó 1 µL de muestra para ser inyectado al cromatógrafo de gases con detector FID. Los productos formados fueron identificados por GC-MS. Establecido el tiempo favorable para el proceso, se procedió a realizar la variación de concentración de sustrato: 170, 340, 510 y 850ppm.

## 2.3 Resultados y Discusión

### 2.3.1 Crecimiento Celular

Las colonias de *R. erythropolis* fueron de color rosado, ligeramente viscosas sobre YAG, mientras *Xanthobacter sp.*, sus colonias fueron de color amarillo y aún más viscosas. A 30°C las bacterias crecieron a los 4 y 8 días, respectivamente.

### 2.3.2 Biotransformación

Los resultados mostraron que luego de 72 horas de incubación en el medio, ocurre la biotransformación con *R. erythropolis* mientras con *Xanthobacter sp.*, proceso de biotransformación ocurre más lento, a las 192 horas no se observó formación de productos, bajo la misma concentración 170 ppm de limoneno. En la **Figura 1**, se observa el comportamiento.

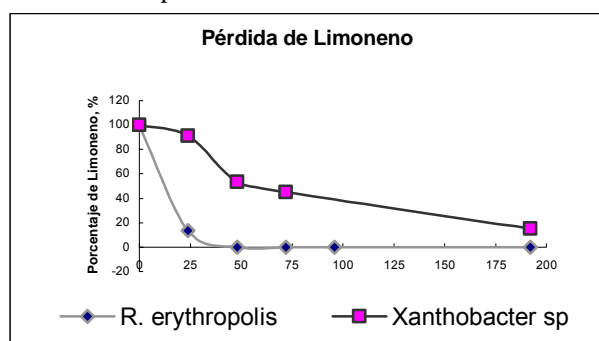


Figura 1. Seguimiento al tiempo del Proceso de Biotransformación del limoneno por acción de bacterias

El producto generado por la acción de *R. erythropolis* fue de linalool en una cantidad relativa del 30.36% a 48horas mientras que a 72h fue de 58.67%. Al incrementar la concentración de sustrato 5 veces (850ppm) conduce a la formación de otros productos como son linalool, óxido trans 1,2 limoneno y carvona. En la Figura 2, se ilustra el cromatograma respectivo.

## 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

*R. erythropolis* transforma el limoneno en un tiempo de 72 horas en MM de pH 7.0, a una concentración de limoneno de 850 ppm generando como productos un alcohol, el linalool, un epóxido, óxido trans 1,2 limoneno y una cetona, la carvona.

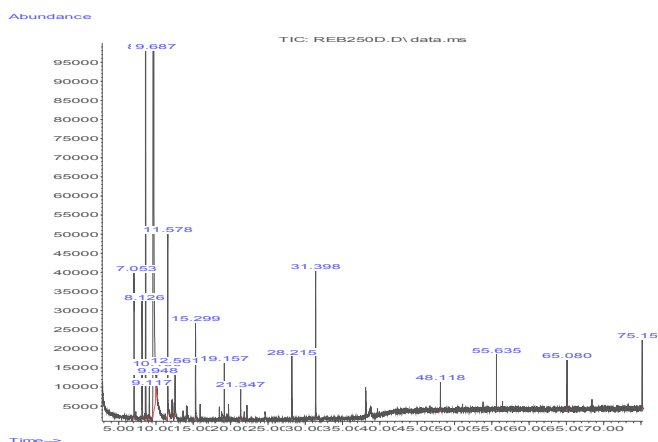


Figura 2. Cromatograma del Proceso de Biotransformación del Limoneno por acción de *R. erythropolis* a 850ppm de limoneno, a 72horas de reacción. (Linalool t<sub>R</sub>, 11.578min, trans limoneno óxido t<sub>R</sub>, 12.561 min y carvona t<sub>R</sub>, 15.301 min)

Como el grado de conversión es bajo, se recomienda buscar nuevas condiciones para llevar a cabo el proceso y mejorar los rendimientos del mismo.

## 4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] De Carvalho, Carla and Da Fonseca, Manuela. 2006. Review: Biotransformation of Terpenes. *Biotechnology Advances*. 24, 134-142.
- [2] De Carvalho, Carla, Fonseca, Manuela. 2002. Influence reactor configuration on the production of carvone from carveol by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, 377-387.
- [3] van der Werf, Mariet, Swartz, Henk and Bont, Jan A.M. 1999. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied Environment Microbiology*. 65 (5), 2092-2102
- [4] De Carvalho, Carla and Da Fonseca, Manuela. 2003. Towards the bio-production of trans carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 3925-3931
- [5] van der Werf, Mariet, Keijzer, Paula, Sdhaf, Peter. 2000. *Xanthobacter sp.* C20 contains a novel bioconversión pathway for limonene. *Journal of biotechnology*. 84, 133-143
- [6] Hartmans, S., van der Werf, Mariet, Wolkerling, F., and de Bont, J.A. 1989. Metabolism of styrene oxid and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2850-2855.