

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Estudio cinético de la bioconversión de naringenina”

TESIS

Maestría en Biotecnología

PRESENTA

Luis Eduardo García Martínez

Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Codirector: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

12 de diciembre de 2016

México, D. F. a 12 de diciembre de 2016

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

Estudio cinético de la bioconversión de naringenina

Que presentó:

Luis Eduardo García Martínez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Codirector: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza
Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

Jurado:

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo _____

Secretario: Dr. Richard Steve Ruiz Martínez _____

Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero _____

Vocal: Dr. Daniel Torres Martínez _____

México, D. F. a 12 de diciembre de 2016

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad

Iztapalapa aprobó la tesis:

Estudio cinético de la bioconversión de naringenina

Que presentó:

Luis Eduardo García Martínez

Comité Tutorial:

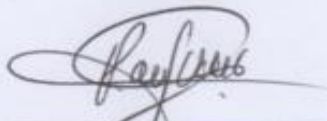
Director: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Codirector: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

Jurado:

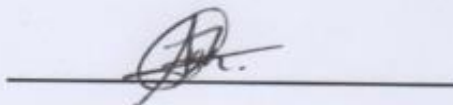
Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo



Secretario: Dr. Richard Steve Ruiz Martínez



Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero



Vocal: Dr. Daniel Torres Martínez



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 para la realización de este trabajo.

Índice

Índice de tablas.....	VI
Índice de Figuras	VII
Nomenclatura	VII
Abstract	1
Resumen	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Flavonoides	4
2.2 Naringenina.....	5
2.3 Hidroxilación de flavonoides.....	6
2.4 Enzimas monooxigenasas con capacidad de hidroxilación	6
2.4.1 Citocromo P450	6
2.4.2 Flavoproteínas	7
2.4.3 Peroxigenasas aromáticas.....	7
2.6 Selección de microorganismo.....	9
2.8 Hidroxilación de naringenina	11
2.9 Cinética	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVO	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.1 Selección de hongos filamentosos	16
6.2 Activación y crecimiento de los hongos filamentosos	16
6.3 Evaluación de la bioconversión de naringenina por hongos filamentosos.....	16
6.4 Cuantificación de flavonoides	17
6.5 Bioconversión.....	17
6.6 Identificación de compuestos por espectrometría de masas.....	18
6.7 Análisis estadístico.....	19
6.8 Modelo cinético	19
7. RESULTADOS	21
7.1 Selección de microorganismo.....	21
7.2 Identificación de compuestos	22
7.3 Cinéticas de bioconversión.....	25
7.3.1 Cinéticas de Bioconversión en lote	25

7.3.2 Cinética de bioconversión en lote alimentado.....	30
7.4 Cinética en la fase célula.....	31
8. CONCLUSIONES.....	37
9. PERSPECTIVAS.....	37
10. BIBLIOGRAFÍA.....	38
Anexo 1.....	42
Anexo 2.....	44
<i>Prueba estadística</i>	44
Anexo 3.....	46
Anexo 4.....	47

Índice de tablas

Tabla 2.1 Clases de citocromo P450.....	8
Tabla 2.2 Hongos reportados con capacidad de hidroxilación.....	11
Tabla 2.3 Enzimas con actividad de hidroxilación de flavonoides.....	12
Tabla 7.1 Selección de la cepa con potencial para realizar la bioconversión de naringenina.....	22
Tabla 7.2 Análisis de muestras en HPLC-MS-MS.....	23
Tabla 7.3 Tasas de consumo de naringenina y áreas para los productos en función de la concentración inicial de naringenina	29
Tabla 7.4 Parámetros cinéticos estimados utilizando una concentración inicial de naringenina de 130 mg/L de un sistema operado en lote	35
Tabla 7.6 Parámetros cinéticos estimados.....	46
Tabla A2.1 Resultados de la prueba ANOVA a las áreas de los productos.....	44
Tabla A2.2 Prueba de Tukey del producto P1.....	44
Tabla A2.3 Prueba de Tukey del producto P2.....	45
Tabla A3.1 Biblioteca de flavonoides.....	46

Índice de Figuras

Figura 2.1. Estructura general de los a) flavonoides, b) isoflavonoides y c) neoflavonoides.....	4
Figura 2.2. Subclases y estructura de flavonoides.....	5
Figura 2.3. Molécula de naringenina.....	5
Figura 2.4. Tipos de reacción catalizadas por Flavoproteínas monooxigenasas.....	7
Figura 2.5. Ruta de biotransformación propuesta por <i>A. niger</i>	10
Figura 2.6. Reacciones catalizadas por F3´h y F3´5´H en la ruta de síntesis de flavonoides.....	12
Figura 7.1. Perfil de elución de sustrato y productos a las 24 h de bioconversión con una concentración inicial de naringenina de 130 mg/L.....	22
Figura 7.2. Molécula de fletina	23
Figura 7.3. Molécula de eriodictiol	24
Figura 7.4. Molécula de cartamidina (A) e isocartamidina (B).....	24
Figura 7.5. Molécula de taxifolina.....	25
Figura 7.6. Perfil de la bioconversión de naringenina a 100 mg/L	26
Figura 7.7. Cinética con sustrato inicial de 130 mg/L en cultivo en lote	27
Figura 7.8. Cinética con 150 mg/L de concentración inicial de sustrato en cultivo en lote.....	28
Figura 7.9. Lote alimentado con concentraciones inferiores a 100 mg/L.....	31
Figura 7.10. Lote alimentado con concentraciones de naringenina superiores a 100 mg/L.....	31
Figura 7.11. Esquema de reacción de la bioconversión. N; naringenina, P1, P2, P3; productos de reacción.....	32
Figura 7.12 Datos experimentales con los ajustados en cinética en lote con 130 mg/L de naringenina	36
Figura A1.1. Perfil de elución de estándar de naringenina.....	42
Figura A1.2. Perfil de elución de estándar eriodictiol.....	42
Figura A1.3. Perfil de elución de estándar taxifolina.....	43

Nomenclatura

X- biomasa

L- Fase líquida

C- Fase célula

M- Sitios de acumulación de naringenina

S- enzima no activa $\text{mg}_E \cdot \text{mg}_X^{-1}$

E - SO^- - Enzima activa $\text{mg}_E \cdot \text{mg}_X^{-1}$

N- Naringenina en medio acuoso $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

P_{iM} - Producto i en fase célula célula $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

P_{iL} - Producto i en fase líquida $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

k_a - constante de adsorción de naringenina $\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

k_D - Constante de desorción de naringenina h^{-1}

N_{TM} - concentración total de sitios de acumulación de naringenina $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

N_{TE} - Concentración total de enzima $\text{mg}_E \cdot \text{mg}_X^{-1}$

θ_A - Fracción de sitios libres donde se acumula naringenina

θ_D - Fracción de sitios ocupados donde se acumula naringenina

K_n - constante de reacción $\text{L} \cdot \text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{mg}_E^{-1}$

Km- coeficiente de transferencia de masa h^{-1}

r_j - Tasa de reacción $\text{mg} \cdot \text{h}$

Abstract

The aim of this work was to evaluate the hydroxylation of naringenin on *Aspergillus brasiliensis* PP4. This fungus was selected by a screening of microorganisms with potential to carry out the aforementioned biotransformation. The hydroxylation of naringenin led to the production of three compounds, herein called P1, P2 and P3, which after a mass spectrometry analysis were identified as phloretin, and two hydroxylated compounds, respectively. P1 was obtained from the rupture of the naringenin pyrone ring, however it was not possible to identify the position of the hydroxyl groups in the hydroxylated compounds (P2 and P3).

Kinetics experiments were carried out evaluating the effect of initial naringenin concentration (100, 130 and 150 mg/L) and operating the bioreactor in batch and fed-batch mode. In the batch experiments using an initial concentration of naringenin of 100 mg/L, P1 and P2 were the only compounds observed. Besides, when the initial concentration of naringenin was larger than 100 mg/L, P1, P2 and P3 were all observed. An initial naringenin concentration of 130 mg/L led to produce a maximum concentration of P2 at 24 h of bioconversion, after this time its concentration decreased, suggesting that P2 is a possible intermediary producing P3. On the other hand, an initial naringenin concentration of 150 mg/L led to the largest production of P3. In the fed-batch experiments, carried out at naringenin concentrations larger than 100 mg/L, the bioconversion was lower than in the batch experiments; here P2 and P3 were the only compounds observed, obtaining one fifth of the amount of P2 produced in batch experiments.

Finally, a kinetic model was defined to describe the bioconversion of naringenin. Due to insufficient experimental information, the model and parameters were not statistically significant but predicted the observed trends during the formation of P1, P2 and P3 out of naringenin. These results provided basic information for future work aimed at developing a kinetic model.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la transformación del flavonoide naringenina con un biocatalizador, buscando la hidroxilación de este compuesto. Mediante una selección de microorganismos se eligió al hongo *Aspergillus brasiliensis PP4* con potencial de bioconversión de la naringenina, en donde se encontraron 3 posibles productos que fueron denominados como P1, P2, y P3.

Se buscó identificar los productos obtenidos durante la bioconversión mediante un análisis de espectrometría de masas, se logró identificar uno de los compuestos, la floretina, derivado de la ruptura del anillo pirona de la naringenina. Además, se identificaron dos compuestos cuya masa y características se cree corresponden derivados mono y di-hidroxilados de la naringenina, aunque sin conocer la posición de la adición de los grupos hidroxilo.

Por otra parte, se llevaron a cabo cinéticas de bioconversión en donde se varió la concentración de la naringenina (100, 130 y 150 mg/L) y el tipo de operación (lote y lote alimentado). En los experimentos en lote con 100 mg/L se observó la presencia sólo de los productos P1 y P2. Con 130 mg/L hubo presencia de los tres productos mostrando el producto P2 una máxima presencia a las 24 h para después bajar su concentración, lo que sugiere que es un posible intermediario. El producto P3 tuvo una mayor producción con 150 mg/L de sustrato. En las pruebas en lote alimentado, manteniendo concentraciones por encima de los 100 mg/L de naringenina la bioconversión se vio disminuida en la formación del producto P2 que fue de una quinta parte de comparado con lo obtenido en el sistema en lote, y la ausencia del producto P1.

Finalmente, con los resultados obtenidos y con base en la literatura se propuso un mecanismo de reacción y se definió un modelo matemático para describir la bioconversión. Debido a que no se contó la información suficiente se resolvió el modelo utilizando únicamente los datos de concentración de la naringenina consumida y buscando ajustar las tendencias de las áreas de los cromatogramas de la producción de los posibles compuestos hidroxilados, aportando información para en futuros trabajos generar un modelo completo.

1. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son componentes importantes en la dieta humana, ya que tienen una gran variedad de beneficios a la salud, su actividad biológica y farmacológica ha sido reportada, dentro de las que destacan: su actividad antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria, antibacterial, anticancerígena anticoagulante, antialérgica entre otras (Cao et al., 2015). Su estructura básica consiste en dos anillos benceno unidos por un anillo pirano o pirona (Kasai et al., 2009). Esta estructura permite múltiples patrones y sustituciones que dan lugar a diferentes subclases de flavonoides como lo son los isoflavonoides, flavonas, catequinas y antocianinas (Braun et al., 2012). Esta variedad de estructuras entre subgrupos hace que las propiedades bioquímicas y biológicas cambien considerablemente con alguna modificación en el tipo y la posición de grupos funcionales. Por ejemplo, el número y la posición de grupos hidroxilo en los anillos (Kasai et al., 2009). Esta relación de la estructura con la función ha incrementado el interés por la transformación de estas moléculas.

Se han desarrollado diferentes formas de obtenerlos y transformarlos, como el uso de microorganismos como biocatalizadores para adicionar o quitar algún grupo funcional que le dé a la molécula una actividad biológica diferente que aumente su valor agregado. Las biotransformaciones son una estrategia con gran potencial para producir flavonoides bioactivos de interés, por la capacidad de producir flavonoides que no existen en la naturaleza (Cao et al., 2015). Especialmente en reacciones de adición de grupos hidroxilo que aumentan significativamente el potencial antioxidante de estos compuestos (Hanasaki et al., 1994).

Las flavanonas como la naringenina, son los principales intermediarios en la biotransformación de flavonoides y gran parte de la investigación reciente se ha enfocado en su producción por células microbianas mejoradas (adaptadas o modificadas genéticamente), por lo que se ha tomado como molécula modelo para resolver los problemas y retos que restringen la producción industrial de estos compuestos (Wu et al., 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Flavonoides

Los flavonoides son fitoquímicos polifenólicos de bajo peso molecular, derivados del metabolismo secundario de plantas y tienen un rol importante en varios procesos biológicos. Tienen una gran variedad de propiedades que son benéficas para la salud humana. Los flavonoides son componentes de una gran variedad de plantas comestibles, frutas, vegetales y bebidas como té, café, cerveza y vino. Pueden ser clasificados en varios grupos: Flavonoles (quercentina, kaempferol), flavonas (luteolina, apigenina), Flavanonas (hesperetina, naringenina), flavonoides glicosilados (astragalina, rutina), etc. (Singh et al., 2014).

Estos son pigmentos naturales tienen una estructura del tipo C₆-C₃-C₆ (Figura 2.1). La posición de la unión del anillo B al anillo C (fracción benzopirano) es utilizada para clasificar este tipo de moléculas de tipo C-15 en tres grupos diferentes: los flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides.

Los flavonoides se dividen en ocho subclases con base en el grado de oxidación y saturación en el anillo C y la presencia de anillos adicionales (Figura 2.2). Estos son compuestos sintetizados en el interior de las membranas del retículo endoplásmico a través de diversos complejos enzimáticos, se derivan de la ruta metabólica fenilpropanoide empleando tres moléculas de malonil-CoA y una molécula de fenilpronoide CoA. Entre las principales enzimas encargadas de la síntesis de dichos compuestos se encuentran las isomerasas, hidroxilasas, óxido-reductasas, y algunas enzimas post-modificadoras como las glicosiltransferasas, metiltransferasas y aciltransferasas, las cuales actúan sobre la unidad núcleo de los flavonoides diversificando dichas moléculas en más de 8,000 compuestos (Veitch y Grayer, 2011; Iwashina, 2015).

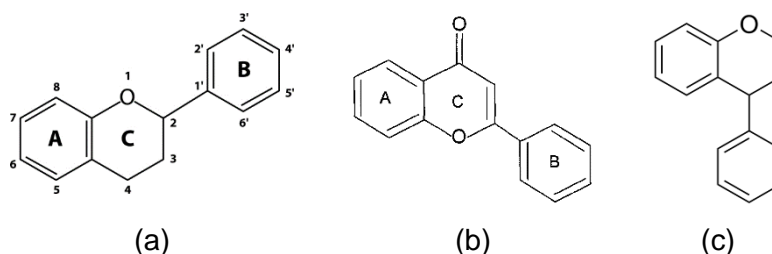


Figura 2.1. Estructura general de los a) flavonoides, b) isoflavonoides y c) neoflavonoides.

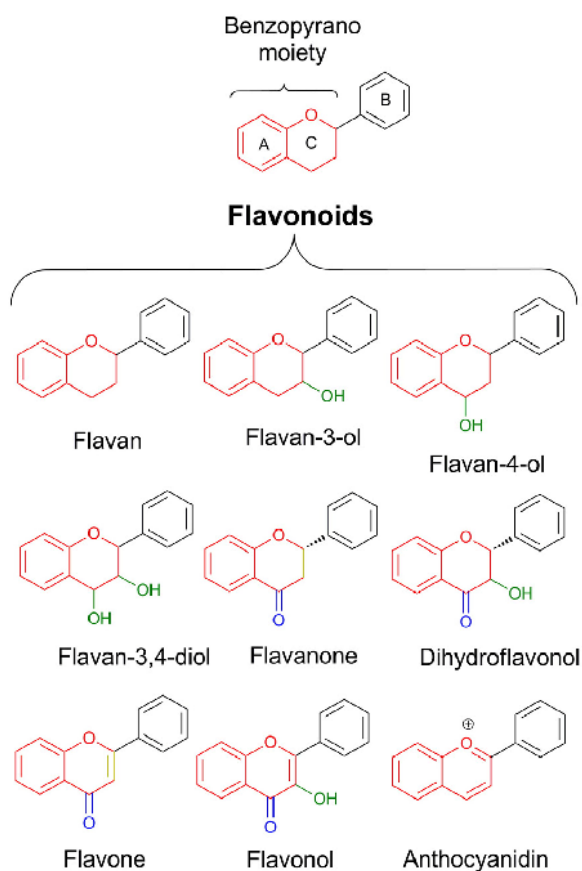


Figura 2.2. Subclases y estructura de flavonoides. *Tomado de Pandey et al. (2016).*

2.2 Naringenina

La naringenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) croman-4-ona) (Figura 2.3) es una flavanona que se encuentra en muchas de las frutas cítricas y tiene propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas. Es un compuesto hidrofóbico de bajo peso molecular (272.3 g/mol). La solubilidad de la naringenina en solución acuosa es $41.76 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$, lo que indica que es predominantemente hidrófobo (Tsai et al., 2015).

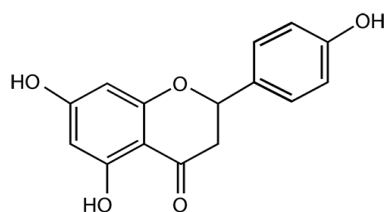


Figura 2.3. Molécula de naringenina

2.3 Hidroxilación de flavonoides

La adición de grupos hidroxilo a la estructura de los flavonoides, isoflavonoides y flavonas ha generado interés debido a que mejora la actividad antioxidante de estos compuestos, especialmente la orto-dihidroxilación (Pandey et al., 2011). La hidroxilación vía enzimática sigue un mecanismo de transferencia donde se introduce un grupo hidroxilo (-OH) en la molécula, principalmente por sustitución de un grupo funcional o átomos de hidrógeno (Pandey et al., 2011).

2.4 Enzimas monooxigenasas con capacidad de hidroxilación

Para llevar a cabo este tipo de reacciones en sistemas biológicos existen las monooxigenasas que son enzimas que catalizan la inserción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico. En la mayoría de los casos las monooxigenasas utilizan cofactores para transferir electrones al oxígeno molecular para su activación. Las monooxigenasas reportadas (Barková et al., 2011; Pandey et al., 2011a; van Berkelet al, 2006) que llevan a cabo este tipo de reacciones de hidroxilación son: Citocromo P450, flavoproteínas, perooxigenasas aromáticas, entre otras.

2.4.1 Citocromo P450

La mayoría de los sistemas de citocromo P450 (CYPs) están compuestos por una monooxigenasa y una o dos proteínas adicionales que constituyen una cadena de transferencia de electrones. Hasta cierto punto, la cadena de transporte natural de NAD(P)H, el grupo hemo que contiene el citocromo P450, puede ser reemplazado por algún homólogo o diferentes proteínas con funciones similares como la flavodoxina y la flavodoxin reductasa para apoyar a la actividad catalítica. (Braun et al., 2012). Por lo tanto, la actividad catalítica de la CYPs no está sólo determinada por la abundancia de ésta, sino también por la abundancia de los transportadores de electrones (Braun et al., 2012). En organismos eucariotas se encuentra asociado a las membranas intracelulares, especialmente en la mitocondria y el retículo endoplasmático. (Gallego Fernández et al., 2011).

El medio de reacción para la bioconversión donde están los sustratos para los microorganismos es de naturaleza hidrofílica y debido a que la naringenina es de menor polaridad, ésta tiende a presentar problemas de difusión y mezclado. La mayoría de los sustratos típicos de CYPs son hidrofóbicos y probablemente entran al sitio activo de la enzima vía las membranas biológicas. Por lo que un obstáculo en la bioconversión con este tipo de sustratos es su baja solubilidad en la fase acuosa, lo que limita el consumo celular,

y por lo tanto el proceso de bioconversión. Se ha reportado por Braun et al. (2012), que el sustrato en concentraciones por encima de la concentración de saturación, limita o inhibe la reacción, por lo que éste debe agregarse en concentraciones por debajo del límite de solubilidad. Para asegurar una suspensión homogénea, el sustrato a altas concentraciones debe disolverse en un solvente orgánico, como acetona (Kostrzewa-Susłow et al., 2006), o etanol (Zhang et al., 2013); antes de ser adicionado a la solución acuosa.

Existe una diversa variedad de clases de CYPs como se muestra en la Tabla 2.1, que varían en la cadena de transporte de electrones a la que pertenece y la ubicación de la enzima, y el tipo de célula donde se encuentra.

2.4.2 Flavoproteínas

Otro tipo de enzimas de la misma familia de las monooxigenasas son las Flavoproteínas, capaces de realizar varios tipos de reacciones dependientes de oxígeno como la hidroxilación (Figura 2.4).

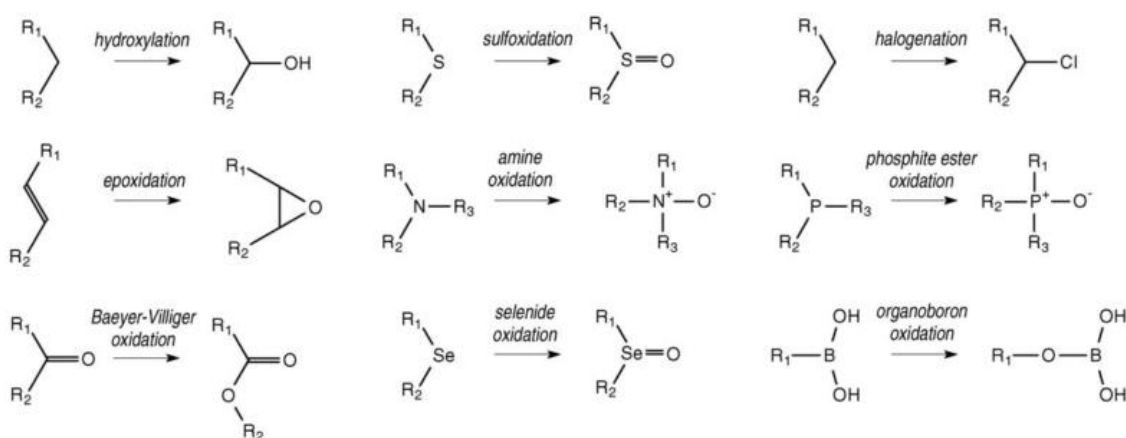


Figura 2.4. Tipos de reacción catalizadas por flavoproteína monooxigenasas (Tomado de van Berkel et al., 2006)

2.4.3 Peroxigenasas aromáticas

Las peroxigenasas aromáticas son enzimas fúngicas extracelulares que selectivamente oxidan una variedad de compuestos orgánicos. Barková et al. (2011) encontraron que la peroxigenasa del hongo *Agrocive aegerita* cataliza la oxidación dependiente de H_2O_2 de diversos flavonoides como flavononas y flavonas. En el caso de la naringenina estos autores identifican que hay una transformación, reportan que el peso

molecular del producto es 289 g/mol, se sabe por el aumento del peso molecular que hay una hidroxilación, aunque no se sabe en qué carbono se llevó a cabo.

Tabla 2.1 Clases de Citocromo P450, tomado de Hannemann et al. (2007)

Clase/fuente	Cadena de transporte de electrones	Localización/observaciones
<i>Clase I</i>		
Bacteriana	NAD(P)H→[FdR]→[Fdx] ^a →[P450]	Citosol, soluble
Mitocondrial	NAD(P)H→[FdR]→[Fdx]→[P450]	P450: dentro de membrana mitocondrial, FdR: asociado a membrana, FdX: matriz mitocondrial, soluble
<i>Clase II</i>		
Bacteriana	NADH→[CPR]→[P450]	Citosol, soluble
Microsomal A	NADPH→[CPR]→[P450]	Anclado a membrana, RE
Microsomal B	NADPH→[CPR]→[cytb5]→[P450]	Anclado a membrana, RE
Microsomal C	NADH→[CPR]→[cytb5]→[P450]	Anclado a membrana, RE
<i>Clase III</i>		
Bacteriana	NAD(P)H→[FdR]→[Fdx]→[P450]	Citosol, soluble
<i>Clase IV</i>		
Bacteriana	Piruvato, CoA→[OFOR]→[Fdx]→[P450]	Citosol, soluble
<i>Clase V</i>		
Bacteriana	NADH→[FdR]→[Fdx-P450]	Citosol, soluble
<i>Clase VI</i>		
Bacteriana	NAD(P)H→[FdR]→[Fdx-P450]	Citosol, soluble
<i>Clase VII</i>		
Bacteriana	NADH→[PFOR-P450]	Citosol, soluble
<i>Clase VIII</i>		
Bacteriana, fúngica	NADH→[CPR-P450]	Citosol, soluble
<i>Clase IX</i>		
Solo dependientes de NADH, fúngica	NADH→[P450]	Citosol, soluble
<i>Clase IX</i> Independientes en plantas, mamíferos	[P450]	Ligado a membrana, RE

2.5 Uso de células completas como biocatalizadores

El uso de microorganismos para la bioconversión de diferentes compuestos surge como una alternativa a los procesos químicos para la síntesis de éstos. Este tipo de procesos presenta ciertas ventajas relacionadas con las condiciones de proceso, como la presión y temperatura bajas, y por consiguiente una demanda energética menor, además de permitir procesos con alta especificidad, así como altos rendimientos de producto y menores costos de aislamiento y purificación, además de efluentes más limpios (Anwar et al., 2013)

El uso de células completas es una opción viable para reacciones catalizadas por enzimas dependientes de co-factores, como las que catalizan reacciones de óxido-reducción. Estas enzimas al ser casi exclusivamente funcionales con su cofactor natural que sirve como acarreador de equivalentes red-ox como el NAD(P)H o FADH₂, al llevarse a cabo dentro de la célula, ésta tiene la maquinaria para regenerar estos cofactores, que son moléculas relativamente inestables y extremadamente costosas para ser usadas en cantidades estequiométricas si se utilizara la enzima purificada (Carballeira et al., 2009).

2.6 Selección de microorganismo

La selección del tipo de microorganismos que realizan dicho proceso de bioconversión es el primer paso a efectuar en un proceso de bioconversión. El empleo de hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias capaces de convertir compuestos flavonoides a través de procesos de hidroxilación, oxidación, metilación, entre otras; debido a la maquinaria enzimática que poseen. En este sentido se ha reportado el uso de hongos filamentosos para la oxidación de moléculas orgánicas, incluyendo flavonoides, que tienen en su sistema enzimático enzimas como la familia de las monooxigenasas, entre las que se encuentran las flavoproteínas y el citocromo P450 (Torres Pazmiño et al., 2010).

Estos estudios de selección son ampliamente reportados, Palmerín-Carreño et al. (2015) probaron diferentes microorganismos (hongos y levaduras) en la oxidación de terpenos, encontrando en todos los microorganismos un grado de conversión, aunque con diferentes rendimientos, además de aportar otros resultados como la concentración de inhibición, y la bioconversión añadiendo una fase orgánica.

En la bioconversión de flavonoides se han llevado estudios de selección de microorganismos, Ye et al. (2007) aislaron microorganismos de una muestra de tierra, dejándolos en crecimiento en un medio nutritivo (papa dextrosa) y añadiendo puerarina (isoflavonide glicosilado) seleccionando a *Trichoderma harzianum* un hongo que llevó a cabo la bioconversión, con la adición de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del flavonoide.

2.7 Bioconversión

En reacciones de hidroxilación se ha reportado ampliamente el uso de hongos como responsables de la adición de este grupo funcional a diversas moléculas, Breskvar y Hudnik-Plevnik (1978) reportan la hidroxilación de la progesterona utilizando el micelio del hongo *Rhizopus nigricans* como biocatalizador y establecen las condiciones en las que se lleva a cabo la bioconversión. Luan et al. (2015) mediante Ingeniería Genética, llevaron a cabo la hidroxilación de terpenos expresando el Citocromo P450 de la bacteria *Rhodococcus sp* en una *pseudomona*.

La bioconversión de flavonoides por hongos filamentosos fue descrita por Kasai et al. (2009), quienes trabajaron con *Phanerochaete chrysosporium* como biocatalizador para convertir naringenina en eriodictiol, hidroxilando el carbono 3' del sustrato, en este trabajo describen al citocromo P450 como la enzima responsable, enfocándose en la enzima y las propiedades que tiene ésta, así como en la identificación del producto.

Por otro lado, Kostrzewa-Susłow et al. (2006) reportan la actividad de *Penicillium chermesinum* y *Aspergillus niger* en la hidroxilación de diversas flavanonas, demostrando en ambos hongos la capacidad de realizar modificaciones en este tipo de flavonoides, y mostrando también la presencia de compuestos deshidrogenados y reducidos, derivados del sustrato. Con base en los productos obtenidos desarrollan una posible ruta que se lleva a cabo en la obtención de estos productos como se muestra en la Figura 2.5.

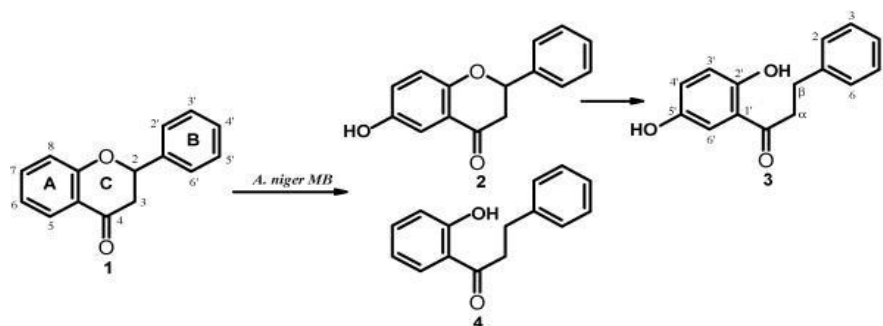


Figura 2.5. Ruta de biotransformación propuesta para *A. niger* (Kostrzewa-Susłow et al., 2008)

La identificación de la posible ruta de la bioconversión con sus intermediarios aporta información indispensable para la caracterización de ésta, ya que al contar con esta información y a través de técnicas de ingeniería metabólica o genética, se puede mejorar el proceso de bioconversión del producto o algún intermediario de interés, así llevando esta producción a un nivel industrial. Por otra parte las condiciones de operación en este tipo de

reacciones biológicas, son fundamentales para obtener los productos deseados y los máximos rendimientos de éste, Ye et al. (2009) establecieron condiciones de pH, temperatura y agitación para la hidroxilación de naringina, molécula glicosilada de naringenina; utilizando *Trichoderma harzianum*, reportando un pH óptimo de 5, así como una temperatura de 30 °C y una agitación de 160 rpm como las condiciones ideales. Además de obtener dos productos, uno mono y otro di-hidroxilado derivados de la naringenina. Este tipo de reacciones están ampliamente reportados como se muestra en la Tabla 2.2, existe una gran variedad de microorganismo, especialmente hongos que cuentan con la maquinaria enzimática para llevar a cabo este tipo de reacciones.

Tabla 2.2. Hongos con capacidad de hidroxilación de flavonoides (Tomado de Cao et al., 2015)

Microorganismo	Flavonoide	Posición
<i>Aspergillus niger</i> MB y <i>Penicillium chemesinum</i> 113	flavanona	6,4'
<i>Aspergillus niger</i> MB y <i>Penicillium chemesinum</i> 113	6-Hidroxiflavanona	4'
<i>Aspergillus ochraceus</i> 456	7-Hidroxiflavanona	5
<i>Aspergillus saitoi</i>	4-hidroxiderrecina	3
<i>Aspergillus alliaceus</i> U1315	Isoliquilriteina	3'
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 30899, <i>Cunninghamella elegans</i> CICC 40250 y <i>Penicillium raistrickii</i> ATCC 10490	Bavachinina	2 = 3
<i>Beauveria bassiana</i>	Silibina	8
<i>Cordyceps militaris</i>	Kurarinona	6 α 5 4 α = 5 α
<i>Cunninghamella elegans</i> NRRL 1392	Crisina	4'
<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 9628	Cannflavina A	6' = 7'
<i>Penicillium albidum</i> AM79	Xanthohumol	2'=3'
<i>Rhodotorula marina</i> AM 77	Xanthohumol	2,3
	4-Metoxichalcona	2,3
<i>Streptomyces griseus</i>	Quercetina	5', 8
	Fisetina	8
<i>Streptomyces avermitilis</i> y <i>Streptomyces coelicolor</i>	floretina	Orto
	Crisina	
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	Daidzeina	3'
	Genisteina	3'
<i>Trichoderma harzianum</i> NJ01	Puerarina	3'

2.8 Hidroxilación de naringenina

La naringenina ha sido reportada como sustrato en la búsqueda de compuestos hidroxilados, por ejemplo, Seitz et al. (2007) reportaron dos productos hidroxilados derivados de la naringenina (Figura 2.6), mediante la enzima citocromo P450, enzima

característica de las rutas de síntesis de flavonoides en plantas, la flavonoide 3´hidroxilasa (F3´H) y la flavonoide 3´,5´-hidroxilasa (F3´5´H).

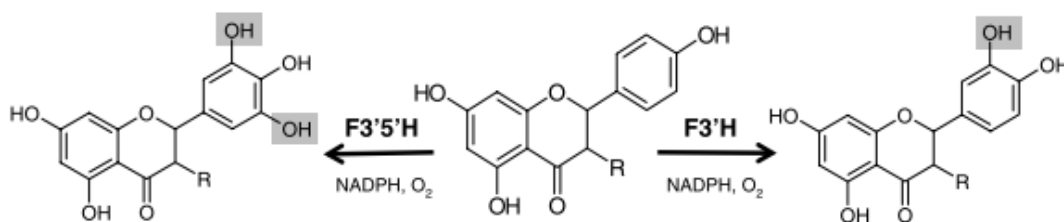


Figura 2.6. Reacciones catalizadas por F3´h y F3´5´H en la ruta de síntesis de flavonoides (Seitz et al., 2007).

Por otra parte, Kasai et al. (2009) clonando el gen de la enzima P450 del hongo *Phanerochaete chrysosporium* y expresándolo en la levadura *S. cerevisiae*, llevaron a cabo la biotransformación de la naringenina, específicamente la hidroxilación en el carbono 3´, obteniendo como producto eriodictiol. Además del citocromo existen reportes de otras enzimas que catalizan este tipo de reacción (Tabla 2.3), aunque la mayoría de estas enzimas se encuentran en plantas, ya que sintetizan a los flavonoides.

Tabla 2.3. Enzimas con actividad de hidroxilación de flavonoides reportadas

Sustrato	Enzima	Producto	Autor
Naringenina	Citocromo P450	Eriodictiol	(Kasai et al, 2009)
Naringenina	Fenolasa	Eriodictiol	(Roberts y Vaughan, 1971)
Kaempferol	Fenolasa	Quercetina	(Roberts y Vaughan, 1971)
DihidroxiKaempferol	Fenolasa	DihidroxiQuercetina	(Roberts y Vaughan, 1971)
Naringenina	Flavonoide 3´-hidroxilasa	Eriodictiol	(Seitz et al., 2007)
Naringenina	Flavonoide 3´5´-hidroxilasa	PentahidroxiFlavonona	(Seitz et al., 2007)

2.9 Cinética

Nielsen y Villadsen (1992) definen el modelo cinético en la descripción de un proceso microbiano como: “la correlación verbal y matemática entre velocidades y concentraciones de reactantes/productos, que permiten la predicción del grado de conversión de sustratos y el rendimiento de productos individuales en diferentes condiciones de operación”.

El conocimiento de la tasa de reacción en función de su selectividad como función de las condiciones del proceso y la concentración del sustrato, específicamente la cinética de la reacción en forma de una expresión matemática, nos dice como varía la tasa en función de las condiciones de operación como la temperatura y el pH, etc.

Sin certeza en la predicción de la tasa de reacción, el diseño de un reactor puede ser altamente especulativo, por lo que hay efectos que pueden no ser tomados en cuenta, ocasionando incertidumbre; por ejemplo, en la estimación de los costos de operación. Otro factor importante es que sin datos cinéticos confiables no es posible evaluar reacciones secundarias y los efectos dinámicos que pueden ocurrir en el reactor, así como el paso crítico en la operación. Este tipo de modelos ha sido utilizado en la descripción de reacción químicas de interés, además de también en reacciones biológicas.

Ya que es necesario obtener una expresión cinética significativa, es necesario que la expresión matemática capture procesos químicos y físicos en la superficie catalítica. Uno de los más simples métodos y enfoques utilizados es vía el modelo Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (LHHW) de expresión cinética (Andersen y Markham, 2006) que consiste en: adsorción de la molécula a ser transformada por la enzima, reacción y desorción del producto formado.

Melgarejo-Torres et al. (2014) mediante el desarrollo de un modelo matemático obtuvo las tasas de reacción individuales de una bioconversión de cetonas utilizando células completas como biocatalizadores, definió y propuso el mecanismo de reacción.

3. JUSTIFICACIÓN

Los flavonoides son compuestos de gran interés en diversas áreas de aplicación como la farmacéutica, alimentaria, cosméticos, entre otras. Esto debido a las propiedades funcionales que poseen como su capacidad antioxidante y su actividad en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo de las células. Esta funcionalidad ha sido correlacionada con el número y tipo de sustituyentes contenidos en sus moléculas, asociando principalmente mejor actividad a mayor número de grupos hidroxilo presentes en la estructura química.

Estos compuestos polihidroxilados normalmente son sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios; sin embargo, su distribución y rendimiento pueden resultar bastante heterogéneos debido a la alta dependencia de las condiciones ambientales. Por lo que una forma de contrarrestar estas desventajas resulta a través del establecimiento de un proceso de bioconversión mediante el uso de células enteras que permita, a partir de compuestos comerciales de bajo costo como la naringenina, producir compuestos con mayor grado de hidroxilación y por lo tanto de mayor valor agregado, como el eriodictiol y la taxifolina, de una forma controlada y con mayor homogeneidad

4. HIPÓTESIS

Es posible llevar cabo la bioconversión de naringenina mediante el aprovechamiento de la maquinaria enzimática de células completas de microorganismos en reposo (sin mitosis) para la obtención de compuestos con mayor grado de hidroxilación, y la propuesta de un modelo matemático permitirá describir el comportamiento cinético de la bioconversión.

5. OBJETIVO

5.1 General:

Identificar, definir y evaluar las condiciones de bioconversión de naringenina a productos hidroxilados utilizando células completas.

5.2 Específicos:

- Seleccionar el microorganismo que lleve a cabo la bioconversión del flavonoide naringenina.
- Determinar el efecto de la concentración y tipo de alimentación de sustrato sobre la bioconversión de la naringenina.
- Identificar productos derivados de la bioconversión de naringenina.
- Establecer el posible mecanismo de reacción de formación de compuestos hidroxilados.
- Desarrollar un modelo cinético basado en las observaciones de la bioconversión de la naringenina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de hongos filamentosos

De acuerdo con lo reportado por Cao et al. (2015), existen diferentes cepas de hongos que tienen la capacidad de realizar procesos de bioconversión de compuestos flavonoides, específicamente la adición de uno o varios grupos hidroxilo a éstas, dentro de éstos se encuentran microorganismos del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, entre otros como el género *Rhizopus* reportado por Karabin et al. (2014). Con base en esto se llevó a cabo la selección del hongo buscando actividad de bioconversión del sustrato naringenina como molécula modelo.

Los hongos filamentosos fueron tomados del cepario de la Planta Piloto 4 de Fermentación en Estado Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo las siguientes denominaciones: *Beauveria bassiana* Tac 1, *Aspergillus brasiliensis* PP4, *Penicillium sp.* y *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642.

6.2. Activación y crecimiento de los hongos filamentosos

Los hongos fueron activados en medio sólido de Papa Dextrosa (PDA) e incubados a 30 °C durante 7 días, hasta observar su esporulación. Transcurrido este tiempo, las esporas se recuperaron empleando una solución de Tween 80 (0.1 % v/v). El inóculo fresco de esporas para cada hongo filamentoso fue transferido a un medio líquido YPD de extracto de levadura (10 %), peptona (20 %) y dextrosa (20 %) en matraces Erlenmeyer bafleados de 125 mL con 50 mL de medio. Se añadió una suspensión de esporas hasta llegar a una concentración final de 10⁶ esporas/mL, se incubaron a 30 °C con agitación orbital de 160 rpm, dejando 3 días de crecimiento, basado en lo reportado por Kostrzewa-Susłow et al. (2006).

6.3 Evaluación de la bioconversión de naringenina por hongos filamentosos

Pasado el tiempo de crecimiento se agregó una solución estándar de naringenina (42 mg/L), como precursor para la bioconversión. Se tomaron alícuotas de 2 mL del medio a 0, 24, 72, 120 y 216 h de crecimiento siguiendo lo reportado por Kostrzewa-Susłow et al. (2008) y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente para después realizar una extracción líquido-líquido con acetato de etilo 1:1.

Las muestras en el solvente fueron analizadas de acuerdo con las pruebas descritas anteriormente, la(s) cepa(s) que mostraron as por cromatografía de líquidos (HPLC),

buscando el consumo de sustrato a través de la disminución en la concentración de la naringenina, así como la aparición de uno o más compuestos. El criterio de selección fue identificar la formación de un compuesto cuyo tiempo de retención fuera cercano al de los estándares eriodictiol y taxifolina, moléculas reportadas como derivados hidroxilados de la naringenina con la adición de uno y dos grupos hidroxilo respectivamente, que se analizaron bajo las mismas condiciones (ver Anexo 3).

6.4 Cuantificación de flavonoides

El análisis de sustrato y producto(s), para la identificación y cuantificación de éstos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Siguiendo lo reportado por Xuet al. (2012) con las siguientes condiciones: Se utilizó un equipo Agilent 1100, con un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 290 nm, bomba cuaternaria y una columna de fase inversa C-18 (ZORBAX eclipse 5 µm, 250 mm x 4.6 mm). Como fase móvil se utilizó: a) acetonitrilo y b) ácido acético (0.1 %) con un flujo de 0.8 mL/min, llevando al siguiente gradiente: 0-10 min, 25-38 % (a): 10-17 min 38 % (a), con un volumen de inyección de 20 µL basado en lo reportado por Xu et al. (2012). Estas condiciones son de una cromatografía en fase reversa, que tiene como característica separar las moléculas con base en su polaridad. El perfil de elución va de lo polar a lo menos polar.

6.5 Bioconversión

Una vez establecido el hongo con actividad de bioconversión se llevaron a cabo experimentos variando la concentración de naringenina y el tipo de alimentación de ésta, para observar su efecto en la formación de los posibles productos de bioconversión:

Basado en lo reportado por Ye et al. (2007), se inocularon matraces con baffles de 125 mL con 50 mL de medio YPD agregando una suspensión de esporas hasta llegar a una concentración de 1×10^6 esporas/mL del hongo en el matraz; los matraces se incubaron a 150 rpm y 30 °C durante 36 h. Posteriormente se tomaron 25 mL del medio de crecimiento con biomasa (0.8 g/L) y se pasó a una solución buffer de fosfatos $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.15 M, pH 5) con el sustrato ya añadido.

La naringenina se solubilizó con etanol al 2 % con respecto al volumen del medio de bioconversión con el fin de mejorar la solubilidad del sustrato.

6.5.1 Cinéticas de Bioconversión

Se realizaron experimentos de bioconversión en matraces con baffles de 125 mL y 250 mL, con volúmenes de operación de 50 mL y 100 mL, respectivamente, en donde se

monitoreo el consumo de sustrato y la formación de productos, probando diferentes concentraciones de naringenina (50, 100, y 150 mg/L). Se llevaron bajo las condiciones iniciales de crecimiento antes mencionadas, y usando como medio de bioconversión la solución de buffer de fosfatos (0.15 M, pH 5). Las cinéticas se llevaron a cabo bajo dos sistemas de alimentación en lote y lote alimentado. Todas las condiciones se probaron por triplicado.

6.5.2 Lote

Una vez obtenida la biomasa en el medio de bioconversión (buffer de fosfatos) se adicionó una solución concentrada de naringenina de manera que la concentración final del medio estuviera entre 50-150 mg/L. La bioconversión tuvo una duración de 24 a 48 h y durante ese tiempo se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, dándole el tratamiento antes mencionado a las muestras para ser analizadas por HPLC.

6.5.3 Lote alimentado

Siguiendo el mismo procedimiento de crecimiento del hongo, lavado de la biomasa y medio de bioconversión utilizado en los experimentos en lote, para los experimentos en lote alimentado se mantuvo la concentración de naringenina cercana a la inicial adicionando solución de estándar de ésta a diferentes tiempos a lo largo de la bioconversión. Se tomaron muestras de antes y después de la alimentación para monitorear el perfil de concentración del sustrato y los productos.

6.6 Identificación de compuestos por espectrometría de masas

6.6.1 Preparación de las muestras

El análisis para la identificación de los compuestos derivados de la bioconversión de naringenina por el hongo *A. brasiliensis*, se realizó mediante espectrometría de masas. Se llevó a cabo un experimento de bioconversión de naringenina después, de 24 h se tomaron alícuotas, las cuales fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 min, recuperando el sobrenadante, posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (1:1), recuperando la fase orgánica, posteriormente fueron filtradas por medio de membranas de nylon de 0.45 µm. Un mililitro de muestra se llevó a sequedad en una consola Centrivap Labconco. El extracto seco se resuspendió en 100 µL de metanol grado HPLC filtrado. La suspensión fue centrifugada 10 min a 15,000 rpm, de la muestra resultante se tomaron 90 µL del sobrenadante en un inserto.

6.6.2 Espectrometría de masas

La identificación de los principales componentes en los extractos de la bioconversión de naringenina por *A. brasiliensis* PP4 fueron realizados en un sistema Acquity UPLC (Waters Corp. Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas tándem Xevo TQ-S triple cuadrupolo (Waters Corp.). El sistema está equipado con un colector de muestra (10 °C), bomba de sistema binario; se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C8 100 mm x 2.1 x 1.7 µm (Waters Corp.) operada a 30 °C. El perfil de elución usado incluyó dos disolventes, agua acidificada con ácido fórmico 7.5 mM (A) y acetonitrilo LC-MS (B): al inicio 95 % de A, 0.8-1.2 min 95 % de A, 1.9-2.4 min 90 % de A, 2.4-3.7 min 85 % de A, 3.7-4 min 85 % de A, 4-5.2 min 79 % de A, 5.2-5.7 min 79 % de A, 5.7-8 min 73 % de A, 8-9 min 50 % de A, 9-11.5 min 0 % de A, 11.5-12 min 95 % de A (Vazquez-Cabral et al., 2016). Los datos de MRM se registraron desde un tiempo de 0 a 12 min. La determinación se realizó en modo de ionización negativa para los ensayos de MS2. Las condiciones ESI se fijaron a voltaje de capilar 2.85 kV, temperatura de desolvatación 500 °C, temperatura de la fuente 150 °C, flujos de gas de desolvatación y de cono 794 L/h y 151 L/h, respectivamente, el gas de colisión a un flujo de 0.14 mL/min. Para controlar la estabilidad de la eficiencia de ionización del espectrómetro de masas, así como la mezcla de diferentes compuestos fenólicos, se empleó al flavonoide rutina para monitorear el tiempo de retención y los valores de m/z y para realizar la cuantificación de los flavonoides. El procedimiento de control y datos del espectrofotómetro UPLC y del tándem Xevo TQ-S de triple cuadrupolo de masas se realizó con el software MassLinx (Waters Corp.). Las muestras se compararon con la biblioteca de estándares con la que ya contaba el equipo.

6.7 Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, para el análisis estadístico se llevó a cabo un análisis ANOVA y una prueba Tukey, con una significancia de 0.05, con el programa PASW Statistics 18.

6.8 Modelo cinético

Para el desarrollo del modelo se propuso un esquema de reacción que se basó en nuestras observaciones. Este esquema se utilizó para proponer el mecanismo de reacción que se basó en la literatura de acuerdo a la enzima más reportada en este tipo de reacción y en los resultados obtenidos en este trabajo. Para la propuesta de este mecanismo de reacción se siguió el formalismo Langmuiriano que involucra una fase fluida y una sólida

(biocatalizador), en la que existe una adsorción reacción y desorción por parte del biocatalizador, y la cinética involucra las velocidades de adsorción y desorción del sustrato y producto formado (Mane et al., 2007).

La propuesta del modelo del sistema de reacción consideró la cinética de la reacción que se basó en la solución completa que es función de las tasas de reacción individuales, y en este modelo se consideró un transporte de masa del sustrato y productos de reacción a través de la interfase y membrana celular. El modelo resultante es un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que se resolvió por el método de Runge Kutta Fehlber.

La estimación de los parámetros se llevó a cabo con el método de mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenber (Stewart et al., 1992), donde el intervalo de confianza fue de 95%. El modelo ajustó sólo las concentraciones del sustrato en el experimento de lote con concentración inicial de 130 mg/L; en el caso de los productos sólo se buscó que el modelo predijera la tendencia experimental de éstos.

7. RESULTADOS

Los resultados están divididos de la siguiente manera: primero se mostrarán lo más relevantes con respecto a la selección del microorganismo con potencial para llevar a cabo la bioconversión de naringenina. Después se mostrarán las cinéticas de bioconversión con diferentes concentraciones iniciales de naringenina y con dos tipos de alimentación de ésta (en lote y lote alimentado). Posteriormente se presentarán los resultados obtenidos con respecto a la identificación de los posibles productos hidroxilados, Finalmente se presenta tanto la propuesta de mecanismo de reacción para la bioconversión como el modelo cinético.

7.1 Selección de microorganismo

Para seleccionar la cepa con el potencial para realizar la bioconversión de naringenina se evaluó la actividad de cuatro microorganismos: *Beauveria bassiana* Tac 1, *Aspergillus brasiliensis* PP4, *Penicillium sp*, y *Aspergillus brasiliensis* ATCC. Se utilizó como primer criterio de selección la aparición de algún compuesto de mayor polaridad en los análisis de HPLC, que se relacionarán con la obtención de posibles productos con mayor número de grupos hidroxilados.

Al cabo de 9 días de bioconversión, algunos de los hongos probados mostraron la capacidad de producir compuestos con mayor polaridad al presentar tiempos de retención menores al presentado por la naringenina ($t_r = 15$ min), como se muestra en la Tabla 7.1. Así mismo, se observa que la concentración de naringenina al cabo de este tiempo se vio disminuida para *A. brasiliensis* PP4 en un 40%, dando origen a la presencia de 3 productos derivados de la naringenina (Figura 7.1).

En el caso de los dos compuestos con los tiempos de retención de 8.4 y 10.5 min obtenidos fueron similares a los estándares de flavonoides mono y di-hidroxilados derivados de la naringenina, eriodictiol y taxifolina (Anexo 1).

Aspergillus brasiliensis PP4 mostró una posible actividad de bioconversión, por lo que se seleccionó como biocatalizador para la evaluación de la bioconversión de naringenina. En este trabajo los productos de interés se definen como P1, P2 y P3, esta nomenclatura fue con base en el orden en el que aparecen estos productos con respecto al sustrato (Figura 7.1).

Para conocer el nombre y género del hongo que mostró actividad de bioconversión se llevó a cabo la identificación por secuenciación de ARN ribosomal, en donde se identificó como *Aspergillus brasiliensis* con un 82.8 % de coincidencia en identidad.

Tabla 7.1. Selección de la cepa con potencial para realizar la bioconversión de naringenina

<i>Microorganismo</i>	<i>Sustrato consumido</i> (%)	<i>Presencia de productos</i> (t_r min)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC9642	100	x
<i>Beauveria bassiana</i> Tac 1	100	x
<i>Aspergillus brasiliensis</i> PP4	60	8.4, 10.5, 13.8
<i>Penicillium</i> sp.	92	x

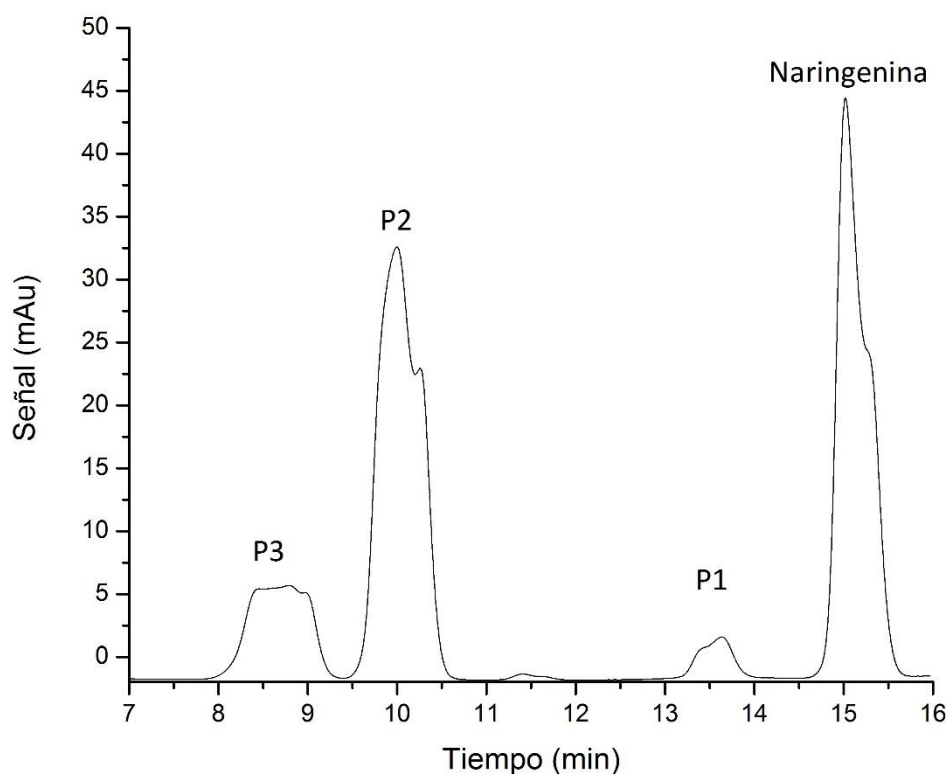


Figura 7.1. Perfil de elución de sustrato y productos a las de bioconversión.

7.2 Identificación de compuestos

Una vez que se establecieron las condiciones de operación bajo las cuales se lleva a cabo la bioconversión de la naringenina en derivados hidroxilados se realizó el análisis por espectrometría de masas (UPLC-MS) para la identificación de los mismos. Los resultados

obtenidos se muestran en la Tabla 7.2, donde se presentan la masa (m/z), el tiempo de retención (t_r), el área y los patrones de fragmentación característicos de los compuestos encontrados (MS²).

De las muestras analizadas se identificaron cuatro compuestos principales con masas (m/z) características de subproductos hidroxilados de la naringenina. La comparación de los patrones de fragmentación de estos compuestos con los reportados en la biblioteca del equipo, permitieron identificar a la di-hidrochalcona floretina (Anexo 3) que corresponde a la estructura de la naringenina hidrogenada en uno de los oxígenos del anillo pirano, y cuya estructura se muestra en la Figura 7.2 con un peso molecular de 271 g/mol.

Tabla 7.2. Análisis de muestras en HPLC-MS-MS

(M-H) (m/z)	Rt (min)	Área x10 ⁵ (mA/s)	MS ² iones (m/z)
303	7.65	2.50	271, 285, 269, 155, 215,
287	7.98	48.0	285, 241, 231, 207, 185, 142
287	8.37	62.0	
273	9.28	35.0	151, 177, 117, 121, 107,
271	9.34	60.0	268, 211, 164, 151, 133

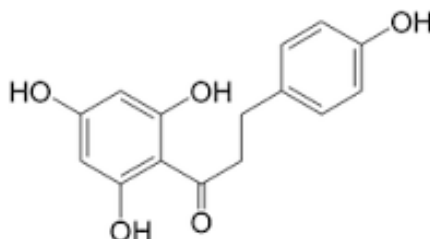


Figura 7.2. Molécula de floretina

Para los compuestos de masa 287, los patrones de fragmentación corresponden a un compuesto hidroxilado, que coincide con la masa del eriodictiol (Figura 7.3); sin embargo, debido a diferencias entre los tiempos de retención de este compuesto con el estándar de eriodictiol (8.75 min) no es posible afirmar que uno de los compuestos observados corresponde a esta molécula.

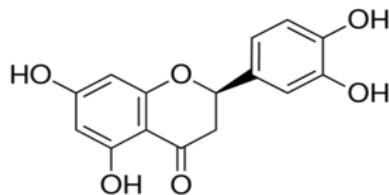


Figura 7.3. Molécula de eriodictiol

Debido que las condiciones bajo las cuales se realizaron los análisis de espectrometría de masas y aquellos de HPLC para el seguimiento de las cinéticas de reacción son similares, y dados los tiempos de retención obtenidos en cada una de ellas, se puede establecer que el compuesto identificado como la floretina, por sus características de elución, se considera que puede corresponder al producto P1 definido en las cinéticas de bioconversión.

Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos con el trabajo reportado por Madej et al. (2014), Donde se llevó a cabo la bioconversión de la naringenina a cartamidina e isocartamidina (Figura 7.4), a través de una hidroxilación en el carbono 6 y 8 respectivamente, usando *Rhodotula marina* como biocatalizador, donde la caracterización y cuantificación de estos se realizaron bajo las mismas condiciones de análisis cromatográfico, los tiempos de retención de la cartamidina y la isocartamidina fueron de 10.0 y 11.5 min respectivamente. Debido que los tiempos de retención del compuesto P2 y de la cartamidina son muy cercanos, se sugiere que P2 presente características similares en términos de su hidroxilación, ya que al comparar los patrones de fragmentación de la cartamidina reportada por Zhang et al. (2015) con los de los productos obtenidos en este trabajo, se observa que no existe una correspondencia directa.

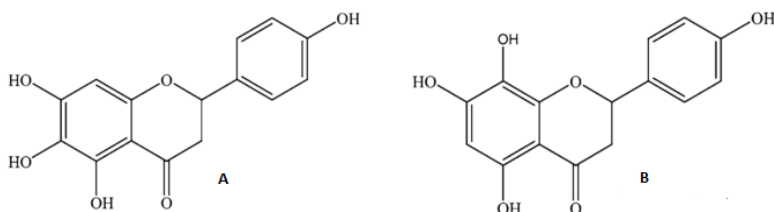


Figura 7.4. Molécula de cartamidina (A) e isocartamidina (B).

Por otra parte, también se encontró la presencia de un compuesto con masa de 304 g/mol, y aunque su patrón de fragmentación no se encontró en la biblioteca del equipo, esta masa aparenta corresponder al de un compuesto di-hidroxilado de la naringenina. Este compuesto se comparó con el flavonoide taxifolina (Figura 7.5), el cual a pesar de no coincidir en el análisis de HPLC (Anexo 1), presentó un tiempo de retención cercano al del

compuesto P3, indicando polaridades semejantes, por lo que se podría relacionar este compuesto encontrado por el análisis de espectrometría de masas con el compuesto P3 identificado durante las cinéticas.

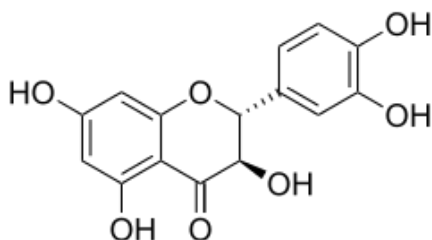


Figura 7.5. Molécula de taxifolina.

7.3 Cinéticas de bioconversión

7.3.1 Cinéticas de Bioconversión en lote

Con la finalidad de observar el efecto de la concentración inicial de sustrato en la bioconversión, se realizaron pruebas con el hongo *Aspergillus brasiliensis* PP4 variando la concentración inicial de naringenina a 100, 130, y 150 mg/L, respectivamente. A continuación, se muestran los resultados más relevantes.

El uso de una solución buffer de fosfatos como medio de bioconversión (Ye et al., 2007), permitió eliminar posibles interferencias del medio de cultivo, además de minimizar el crecimiento del hongo, lo que redujo el tiempo de reacción de 9 días a 1 día, obteniendo en ambos experimentos mismos niveles de conversión y producción de compuestos de interés. En la Figura 7.6 se muestra la cinética con sustrato inicial de 100 mg/L. En esta bioconversión se observa la formación de los productos P1 y P2, que aparecen a las 9 y 23 h, respectivamente. Desde un punto de vista cualitativo, se identifica que la producción de P2 es mayor que la de P1, alrededor de 10 veces más, teniendo una diferencia de más de 12 h entre la aparición de estos compuestos. La naringenina comienza a consumirse desde el inicio de la bioconversión, pero al término de la cinética ésta sólo se consumió en un 55 %, aproximadamente.

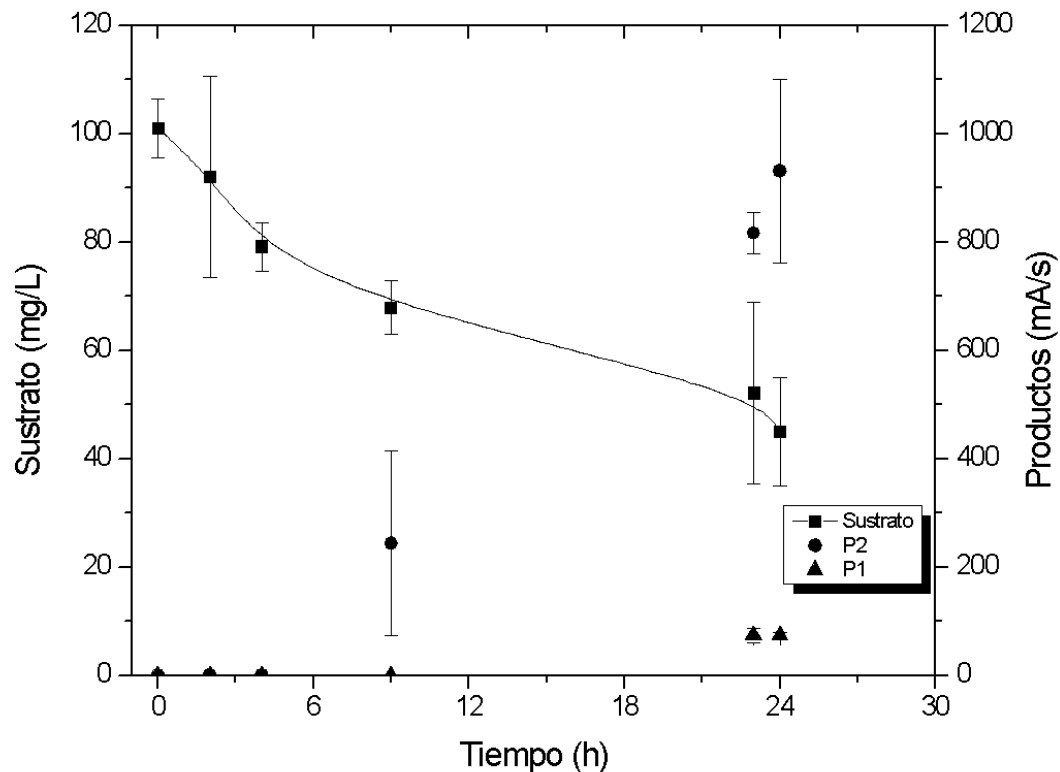


Figura 7.6. Perfil de la bioconversión de naringenina a 100 mg/L

Para las siguientes cinéticas el tiempo de reacción fue mayor, 48 h, con el objetivo de tener un mayor seguimiento a la bioconversión e incrementar la conversión y producción de los compuestos de interés. En la Figura 7.7 se presenta la cinética de bioconversión de naringenina al aumentar su concentración inicial a 130 mg/L. Se observa que el consumo de sustrato fue alrededor del 90 %, el P2 aparece a las 12 horas y muestra un área máxima a las 24 h para después disminuir, esperando ser un producto clave en la aparición del producto P3. Este comportamiento ha sido reportada por Wu et al. (2015b) en la bioconversión de esteroides por el hongo *Colletotrichum lini* ST-1, al usar canrenona como sustrato y obtener un compuesto hidroxilado, siendo este compuesto un intermediario para la obtención de otro producto di-hidroxilado derivado el a canrenona. En otro trabajo, estos mismos autores (Wu et al., 2015a) utilizan el mismo hongo para la hidroxilación de otro esteroide, el sulfato de dehidroepiandrosterona DHEA, obteniendo de igual manera productos mono y hidroxilados. El comportamiento en la cinética es similar al observado en este trabajo, ya que al disminuir la concentración de uno de los productos la de otro

incrementa en una proporción similar. Por lo que en este trabajo asumimos que la presencia y aparente consumo del producto P2 (derivado mono-hidroxilado de la naringenina), llevó a la producción del producto P3, correspondiente a un producto di-hidroxilado

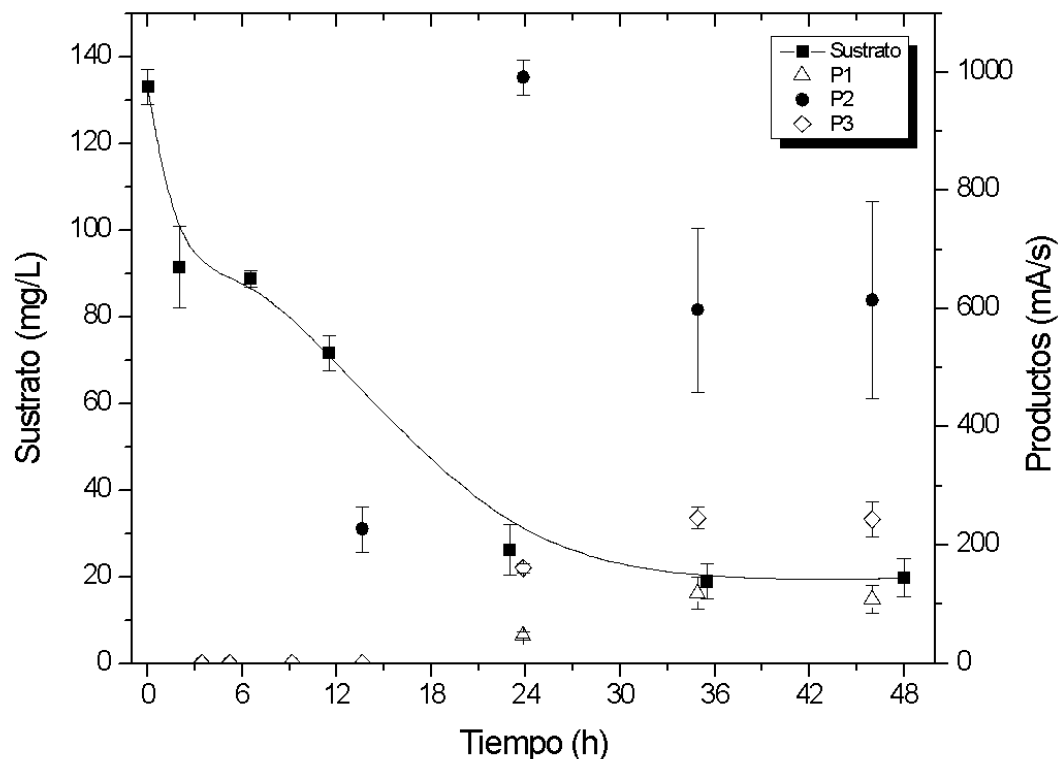


Figura 7.7. Cinética con sustrato inicial de 130 mg/L en cultivo en lote.

En el experimento donde se utiliza una concentración inicial de naringenina de 150 mg/L (Figura 7.8), el consumo de naringenina alcanzó un estado pseudo estacionario a las 12 h de reacción, teniendo alrededor de 100 mg/L de naringenina en el medio. A diferencia de las otras cinéticas, el área máxima del producto P2 se alcanzó a las 36 h, 12 h después de su aparición en las otras cinéticas, pero teniendo el mismo comportamiento con respecto a la disminución de su área. De la misma forma que en las otras cinéticas, la producción de P1 es baja con respecto a los otros dos productos, especialmente con respecto a P2.

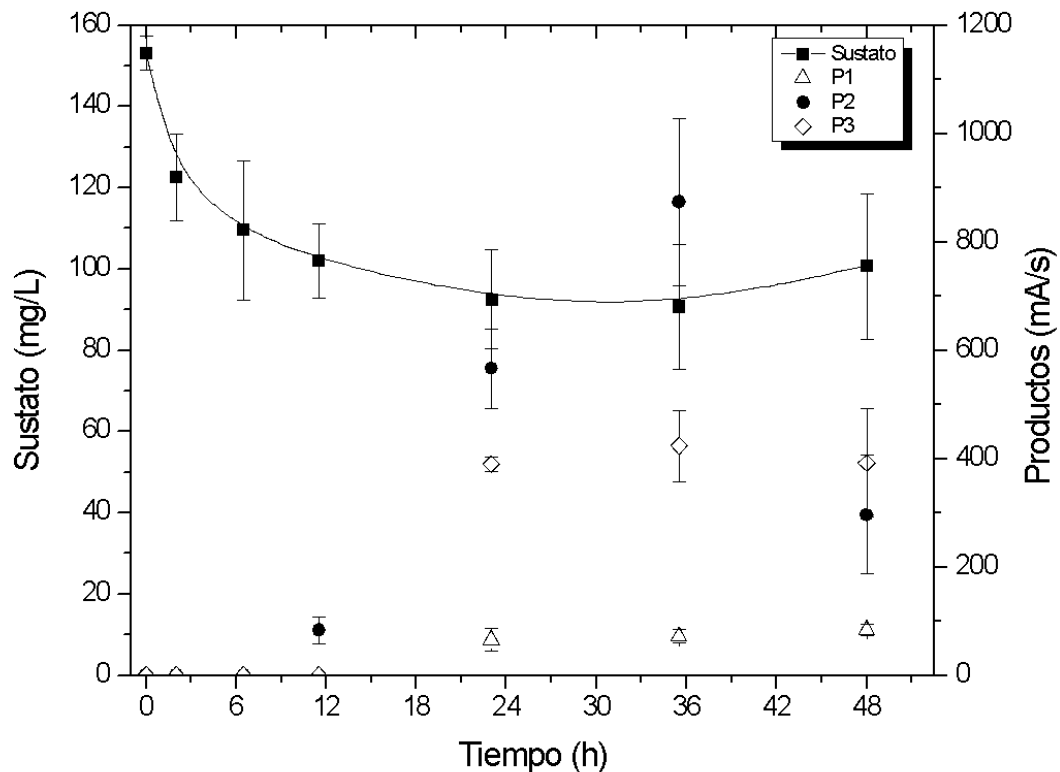


Figura 7.8. Cinética con 150 mg/L de concentración inicial de sustrato en cultivo en lote

Se observa un incremento en la tasa de reacción para los experimentos utilizando 100 mg/L y 130 mg/L de naringenina inicial; sin embargo, al aumentar la concentración a los 150 mg/L hubo una disminución en la tasa de reacción, este efecto relacionado con el bajo consumo del naringenina por el hongo sugiere una posible inhibición por sustrato, como se ha reportado para otros microorganismos; en lo reportado en la literatura (Dulce M Palmerín-Carreño et al., 2016) para la oxidación de (+)-valenceno (terpeno) se encuentra una concentración de inhibición del sustrato de 1.5 g/L, donde su cinética muestra una tendencia similar a la de la naringenina consumiendo sólo una parte del sustrato.

Sin importar la concentración inicial de naringenina, se observó su disminución al cabo de las primeras 2 h, observando que la velocidad de consumo dependió de la concentración inicial, como se muestra en la Tabla 7.3. No obstante los productos de reacción aparecieron horas después de haber sido iniciada la bioconversión, se comenzó a identificar la presencia de productos después de las 9 horas de reacción; Fiorani et al. (2010) describen la acumulación de flavonoides, específicamente la quercetina, en la mitocondria de células

humanas, esta acumulación se da en grandes concentraciones, debido en parte a las propiedades antioxidantes de este tipo de compuestos, que previene daños en este organelo. Tomando como base este estudio, el consumo de naringenina reflejado en las cinéticas puede estar relacionado con su acumulación dentro del hongo, lo que se puede relacionar con la mitocondria, utilizando un parte de este compuesto para reaccionar y excretar el producto al medio.

Tabla 7.3 Tasas de consumo de naringenina y áreas para los productos en función de la concentración inicial de naringenina

$C_{0 \text{ naringenina}}$ (mg/L)	Tasa de consumo (mg/L h*)	P1 (mA/s)	P2 (mA/s)	P3 (mA/s)
100	4.47	73.0 ± 5.0	931.0 ± 169.0	ND
130	18.42	119.0 ± 27.0	991.0 ± 29.0	254.0 ± 20.0
150	13.42	81.3 ± 8.0	874.0 ± 153.0	390.0 ± 66.0

* Tasa determinada hasta las 2 h de reacción.
ND. No hubo presencia de producto.

Por otro lado, el efecto que tuvo la concentración inicial de naringenina sobre la producción de P1, P2 y P3, muestra que para los productos P1 y P2 no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) para sus rendimientos en función del área de cada pico (Ver Anexo 2); por lo que la obtención de ambos compuestos resulta ser independiente de la concentración inicial de naringenina utilizada. Sin embargo, para el producto P3 sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) y una dependencia directa con la concentración de naringenina empleada, es decir, al aumentar la concentración de sustrato se incrementó la presencia de este compuesto, incluso para la concentración de 150 mg/ML, donde se encontró un bajo consumo de naringenina. Esto puede llevar a la hipótesis que si bien esta concentración causa una reducción en la velocidad de consumo de naringenina debida a una posible inhibición por sustrato, posiblemente la formación preferente de P3 sea atribuido a que bajo esta condición el producto P2 se comporte como un compuesto intermediario con mayor oportunidad de interactuar con el(los) sitio(s) catalítico(s) de la(s) enzimas de *A. brasiliensis* PP4 y con ello observar un comportamiento de competencia cinética.

7.3.2 Cinética de bioconversión en lote alimentado.

De los experimentos en con diferentes concentraciones iniciales de naringenina, en donde se observó un efecto en el consumo de este al aumentar la concentración, se estableció realizar un estudio sobre el comportamiento de la bioconversión de naringenina cuando se emplea una configuración de tipo lote alimentado, donde se llevaron a cabo evaluaciones cinéticas en las que se alimentó constantemente el sustrato con el objetivo de cuantificar su efecto sobre la formación de los productos de reacción.

Las pruebas de lote alimentado se realizaron con una concentración inicial de naringenina de 70 mg/L (Figura 7.9), bajo esta condición el producto P2 se encontró al cabo de 9 h con un área aproximada de 1050 mA/s, similar a la encontrada con 130 mg/mL. En la Figura 7.5 se muestran los resultados obtenidos en el experimento a una concentración inicial de 70 mg/L, como se observa en esta figura el compuesto P2 es el único que se produce, apareciendo a las 9 horas con una abundancia entre 1000 y 1100 mA/s, área similar a la máxima obtenida en los experimentos en lote. Durante esta prueba se observó que la concentración de P2 no presentó reducción significativa que pudiera llevar a la formación de P3, lo que sugiere que al mantener la concentración de naringenina por arriba de los 50 mg/L promueve que la bioconversión sea dirigida sólo al producto P2, indicando que *A. brasiliensis* PP4 tomó como sustrato únicamente a la naringenina y no al compuesto P2. Por lo que se destaca que, bajo estas condiciones de operación, es posible dirigir la producción preferencial de P2 con niveles semejantes a los obtenidos en las pruebas por lotes.

En la Figura 7.10 se muestran los resultados obtenidos en el experimento a una concentración de naringenina inicial de 130 mg/L, se observa que al mantener la concentración de naringenina por encima de los 100 mg/L se produjeron los compuestos P2 y P3. La producción de P2 fue inhibida notablemente alcanzando áreas máximas de 300 mA/s, que comparado con lo obtenido en los experimentos en lote y el anterior de lote alimentado, la formación de éste fue casi 4 veces menor (ver Figura 7.5), mostrando que hay una inhibición por sustrato en la formación del producto P2 a esta concentración. Por otra parte, la presencia del compuesto P3 se vio favorecida bajo esta concentración de naringenina lo que concuerda con el experimento en lote con 150 mg de sustrato donde aumento la formación de este compuesto. Al presentarse inhibición por sustrato los sitios de a enzima pudieron ser ocupados por P2 para la formación de P3.

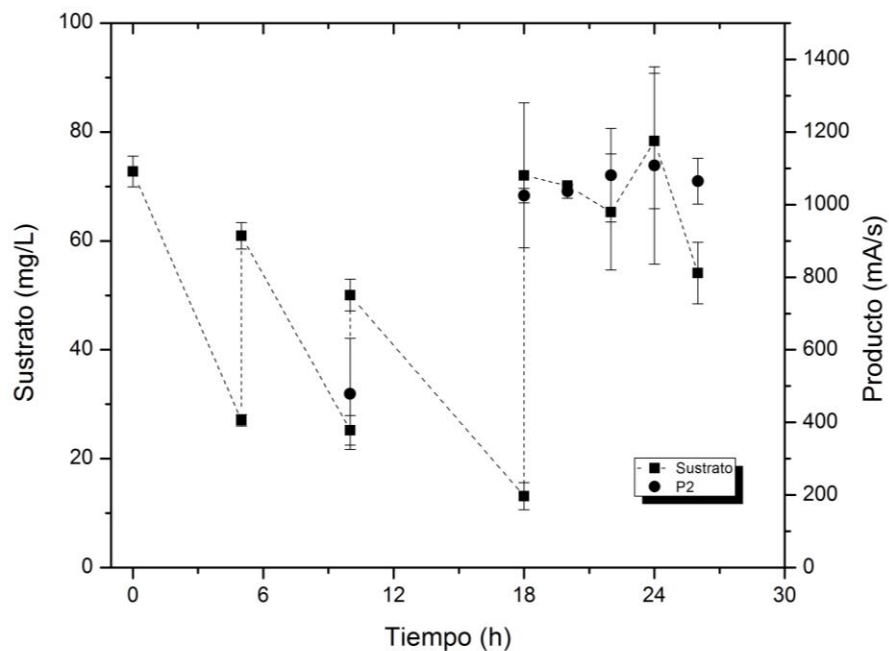


Figura 7.9. Lote alimentado con concentraciones inferiores a 100 mg/L

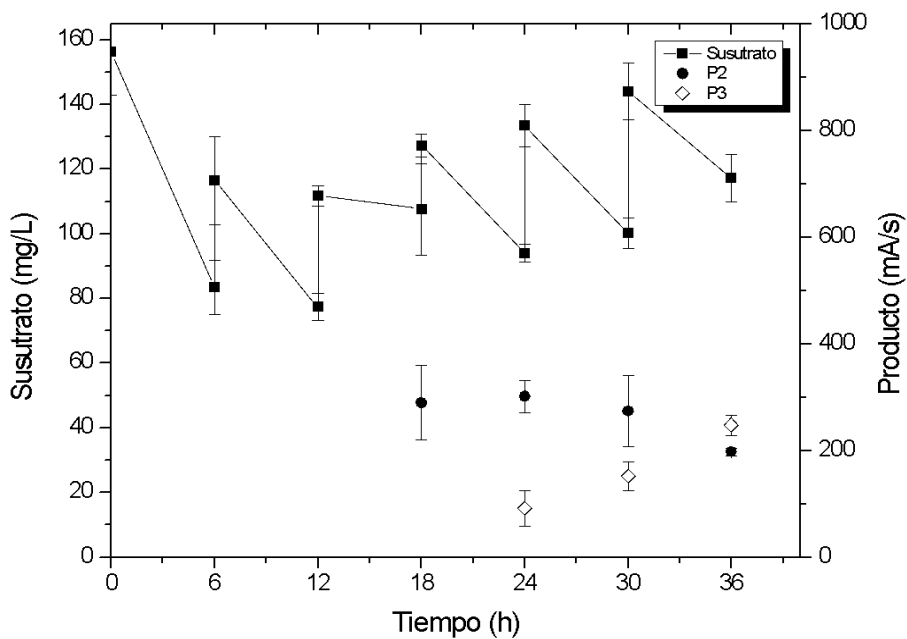


Figura 7.10. Lote alimentado con concentraciones de naringenina superiores a 100 mg/L

7.4 Cinética en la fase célula

Para desarrollar el modelo cinético que describa la tasa de bioconversión de la naringenina a compuestos con mayor grado de hidroxilación, se propone el esquema de

reacción de la Figura 7.11. Este esquema de reacción se basó esencialmente en nuestras observaciones, donde se propone que P1 y P2 se producen directamente y en forma paralela de la naringenina. El compuesto P2 es un derivado hidroxilado de la naringenina, y es un intermediario para la formación del producto P3 que es a su vez un derivado dihidroxilado. En el análisis de los productos se identificó que P1 contiene las características físico químicas de la floretina, no obstante, se tiene incertidumbre en la identificación de P2 y P3, que son compuestos con diferente grado de hidroxilación. Para fines de representación y debido a la incertidumbre que se tiene en la identificación de las posiciones donde estos compuestos fueron hidroxilados, para el esquema se propone que P2 y P3 pudiesen ser trans-eriodictiol y trans-taxifolina, respectivamente.

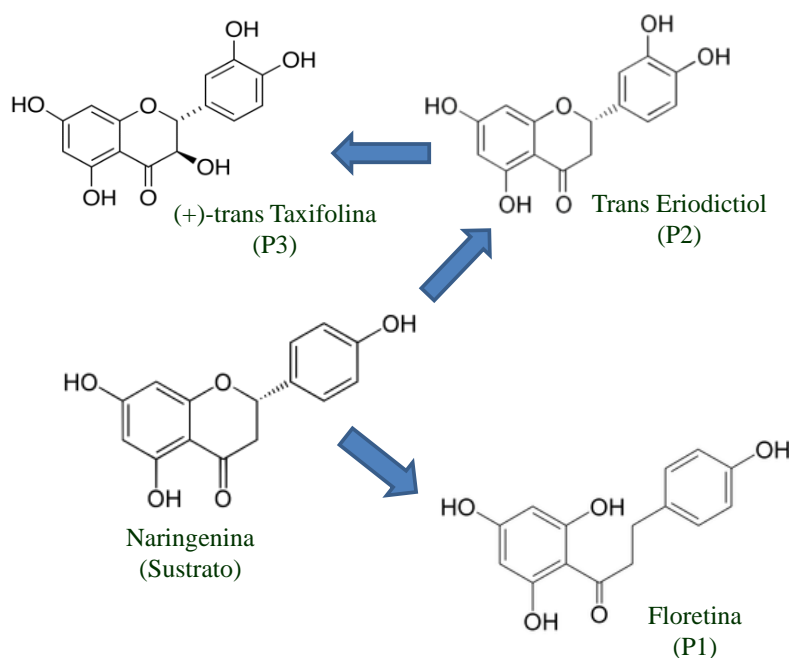
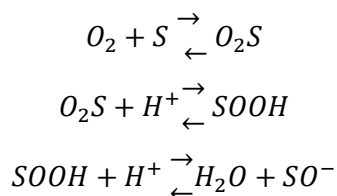


Figura 7.11. Esquema de reacción de la bioconversión. N; naringenina, P1, P2, P3; productos de reacción.

Para definir el mecanismo de reacción que sigue el esquema de la bioconversión mostrado en la Figura 7.11, se analizaron las observaciones obtenidas en los diferentes experimentos cinéticos, y se realizó una revisión de la literatura. En el mecanismo de reacción que se propone en este trabajo se considera que se tiene una enzima en su forma “activa” (SO), la cual de acuerdo a la literatura se obtiene al adsorberse el oxígeno (O_2) en una enzima específica (S), que aparentemente es citocromo P450 por su capacidad de catalizar la hidroxilación de diferentes compuestos como los alcanos, terpenos y específicamente flavonoides (De Visser, 2012; Hannemann et al., 2007; Pandey et al.,

2011b; Roh, 2013). La obtención del sitio activo (E o SO^-) responsable de llevar a cabo la bioconversión de naringenina está dado por los siguientes pasos:

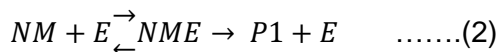


En estos pasos de reacción se considera que el oxígeno y el NADH, cofactor necesario como fuente de protones (H^+), están en exceso en la célula, y por lo tanto no limitan la reacción. Aunado a lo anterior, en los siguientes pasos del mecanismo propuesto se considera que: la tasa de formación del complejo enzima oxígeno (E , SO^-) es rápida en comparación con los pasos de reacción subsecuentes; existe una acumulación de naringenina dentro de la célula; no hay resistencias a la transferencia de masa intracelular; y el hongo no utiliza la naringenina como fuente de carbono.

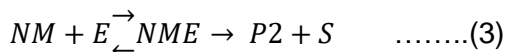
A nivel de la célula hay sitios M donde se puede acumular la naringenina (N), formando un complejo NM :



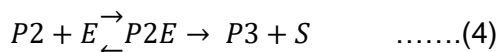
la enzima en su forma activa (E) puede reaccionar con la naringenina acumulada dentro de la célula (NM), formando así a la floretina ($P1$):



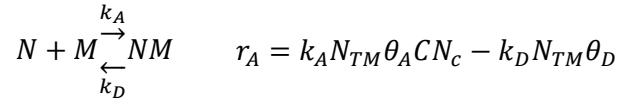
De forma paralela la naringenina acumulada en la célula (NM) puede interaccionar con la enzima activa (E) para producir el compuesto hidroxilado $P2$,



Una vez formado $P2$, éste reacciona con la enzima activa (E) de la célula para formar al compuesto di-hidroxilado $P3$:



De manera simplificada, el mecanismo arriba mencionado y las tasas de reacción dentro de la célula desde una perspectiva macroscópica están dados por:



Donde θ_A es la fracción de sitios libres donde se acumula la naringenina dentro de la célula, θ_D es la fracción de sitios M ocupados por la naringenina y θ_E es la fracción de sitios ocupados por la enzima activa E. Las tasas de aparición y desaparición de estas fracciones están dadas por las siguientes ecuaciones:

$$N_{TM} \frac{d\theta_A}{dt} = -r_A + r_1 + r_2$$

$$N_{TM} \frac{d\theta_D}{dt} = r_A - r_1 - r_2$$

El modelo cinético descrito en la sección anterior se acopla al modelo del biorreactor que considera dos fases, la fase líquida y la fase célula, y que se presenta a continuación:

Fase Líquida

$$\frac{dCN_L}{dt} = -k_M(CN_L - CN_c)$$

$$\frac{dCP1_L}{dt} = -k_M(CP1_L - CP1_c)$$

$$\frac{dCP2_L}{dt} = -k_M(CP2_L - CP2_c)$$

$$\frac{dCP3_L}{dt} = -k_M(CP3_L - CP3_c)$$

Fase célula:

$$\frac{dCN_c}{dt} = k_M(CN_L - CN_c) - r_1 - r_2 - r_A$$

$$\frac{dCP1_c}{dt} = k_M(CP1_L - CP1_c) + r_1$$

$$\frac{dCP2_c}{dt} = k_M(CP2_L - CP2_c) + r_2 - r_3$$

$$\frac{dCP3_c}{dt} = k_M(CP3_L - CP3_c) + r_3$$

donde C_{iL} y C_{iC} son las concentraciones del compuesto i en la fase líquida y en la fase célula, respectivamente, t es el tiempo de reacción y k_M es una constante de permeabilidad que considera las resistencias al transporte de masa debida a la membrana celular presente en el hongo estudiado.

El modelo del reactor acoplado al modelo cinético se resolvió con el método de Runge-Kutta donde las constantes cinéticas para ajustar las observaciones correspondientes se estimaron con el método de Levenberg-Marquardt. Para el ajuste sólo se utilizó la cinética observada en la operación de reactor en forma de lote con una concentración inicial de naringenina de 130 mg/L, donde la concentración de naringenina fue la única variable observada. Debido a la poca cantidad de datos experimentales la estimación de los parámetros cinéticos no fue significativa pero el ajuste del consumo de sustrato, sí lo fue. El modelo permitió describir algunas de las tendencias de la formación de los productos. En la Tabla 7.4 se muestran las constantes calculadas, en el caso de la K_3 ésta no se estimó adecuadamente, y por ende no se pudieron describir algunas observaciones. En la Figura 7.12 se presenta el ajuste del modelo, donde se observa que la variable de respuesta, concentración de sustrato, se describió adecuadamente. No obstante, la tendencia en la formación de algunos de los productos no fue como se esperaba. Más estudios experimentales son necesarios para tener un modelo cinético confiable.

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos estimados utilizando una concentración inicial de naringenina de 130 mg/L de un sistema operado en lote

Parámetros Cinéticos	Valor Estimado
k_A	0.5 L mg ⁻¹ h ⁻¹
k_D	0.5 h ⁻¹
k_1	1 L g mg ⁻¹ mg _E ⁻¹
k_2	10 L g mg ⁻¹ mg _E ⁻¹
K_3	100 L g mg ⁻¹ mg _E ⁻¹
k_M	0.2 h ⁻¹

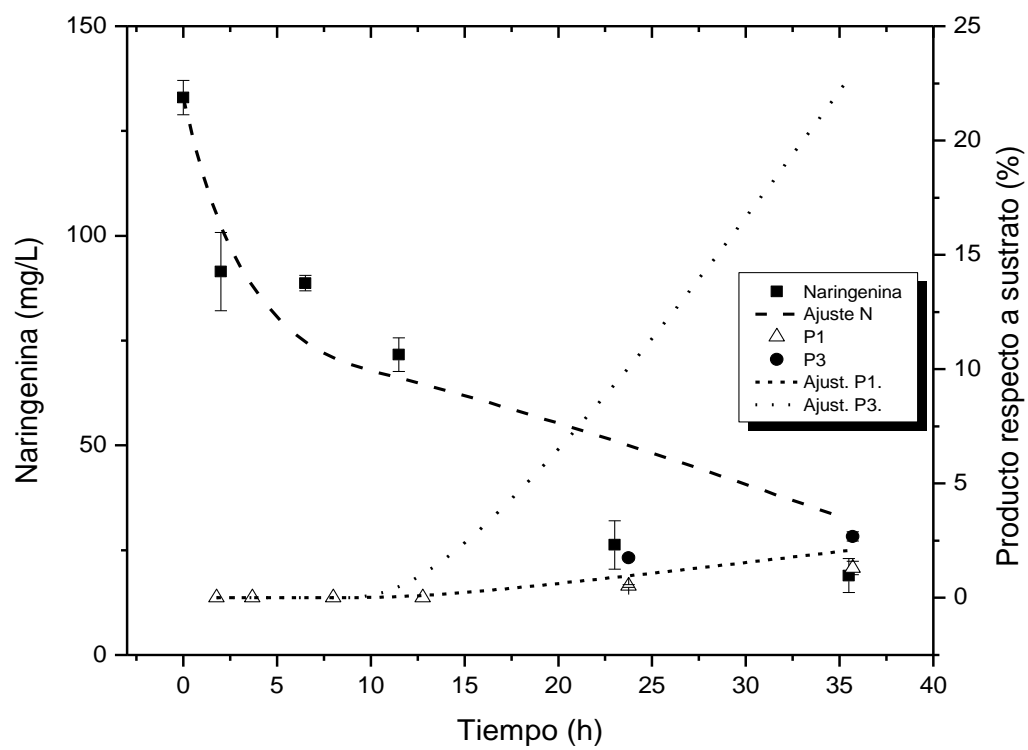


Figura 7.12. Datos experimentales con los ajustados en cinética en lote con 130 mg/L de naringenina.

8. CONCLUSIONES

Se seleccionó al hongo *Aspergillus brasiliensis* que mostró capacidad de actuar como biocatalizador del flavonoide naringenina, con actividad de hidroxilación de ésta. Encontrando tres posibles productos.

Los experimentos en lote y lote alimentado mostraron un posible efecto de inhibición por sustrato en la bioconversión, aunque no se definieron las concentraciones inhibitorias.

Se identificó uno de los productos de la bioconversión, la floretina (P1). No se logró identificar la composición exacta de los demás productos P2 y P3, pero se estableció que son posibles derivados de la naringenina con la adición de uno a dos grupos hidroxilo, sin definirse la posición del grupo funcional adherido en los anillos del flavonoide.

Con base en la literatura se estableció un posible mecanismo de reacción de hidroxilación de la naringenina por *Aspergillus brasiliensis* PP4, haciendo responsable a la enzima Citocromo P450 de esta reacción, y atribuyendo una acumulación del sustrato en el citoplasma.

Se desarrolló un modelo cinético de la bioconversión a nivel macro, que describió sólo las tendencias del consumo de sustrato y la formación de los productos, aportando información para generar un modelo completo en futuros trabajos.

9. PERSPECTIVAS

- Identificar a la enzima responsable de la bioconversión.
- Identificar la composición de los productos faltantes.
- Definir concentraciones de inhibición para sustrato y productos.
- Llevar a cabo la bioconversión en reactor y definir condiciones de operación.
- Establecer el efecto de la concentración de oxígeno.
- Definir el efecto de la resistencia a la transferencia de masas del sustrato y los productos.
- Desarrollar un modelo completo que describa la cinética de la bioconversión.
- Medir la acumulación de sustrato (naringenina y productos en el interior de las células).

▪ 10. BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2006). *Chemistry, Biochemistry and Applications*.
- Anwar, P., Bendini, A., Gulfranz, M., Qureshi, R., Valli, E., Di Lecce, G., ... Toschi, T. G. (2013). Characterization of olive oils obtained from wild olive trees (*Olea ferruginea* Royle) in Pakistan. *Food Research International*, 54(2), 1965–1971.
- Barková, K., Kinne, M., Ullrich, R., Hennig, L., Fuchs, A., & Hofrichter, M. (2011). Regioselective hydroxylation of diverse flavonoids by an aromatic peroxygenase. *Tetrahedron*, 67(26), 4874–4878.
- Braun, A., Geier, M., Buehler, B., Schmid, A., Mauersberger, S., & Glieder, A. (2012). Steroid biotransformations in biphasic systems with *Yarrowia lipolytica* expressing human liver cytochrome P450 genes. *Microbial Cell Factories*.
- Breskvar, K., & Hudnik-Plevnik, T. (1978). Inducibility of progesterone hydroxylating enzymes in *Rhizopus nigricans*. *Journal of Steroid Biochemistry*, 9(2), 131–134. doi:10.1016/0022-4731(78)90073-0
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A. R., & Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(1), 214–223.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>
- Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R., & Sinisterra, J. V. (2009). Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology Advances*.
- De Visser, S. P. (2012). *Predictive studies of oxygen atom transfer reactions by Compound I of cytochrome P450. Aliphatic and aromatic hydroxylation, epoxidation, and sulfoxidation. Advances in Inorganic Chemistry* (1st ed., Vol. 64). Elsevier Inc.
- Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., Azzolini, C., Candiracci, M., Piatti, E., & Cantoni, O. (2010). Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(5), 397–404.
- Gallego Fernández, A., de Sande García, M. A., Marín Fernández, A. M., Blanco Ramos, S., & González Galán, M. J. (2011). *Aspectos fundamentales del citocromo P450. Fundación Tejerina*.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845–850.

- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., & Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 330–44.
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1063–1090.
- Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., ... Sakaki, T. (2009). Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(1), 103–108.
- Kostrzewa-Susłow, E., Dmochowska-Gładysz, J., Białońska, A., & Ciunik, Z. (2008). Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52–53, 34–39.
- Kostrzewa-Susłow, E., Dmochowska-Gładysz, J., Białońska, A., Ciunik, Z., & Rymowicz, W. (2006). Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1–4), 18–23.
- Luan, Z. J., Yin, Y. C., Li, A. T., Yu, H. L., & Xu, J. H. (2015). Monoterpene hydroxylation with an artificial self-sufficient P450 utilizing a P450<inf>SMO</inf> reductase domain for the electron transfer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, 78–82.
- Madej, A., Popłoński, J., & Huszcza, E. (2014). Improved Oxidation of Naringenin to Carthamidin and Isocarthamidin by *Rhodotorula marina*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(1), 67–73.
- Mane, V. S., Deo Mall, I., & Chandra Srivastava, V. (2007). Kinetic and equilibrium isotherm studies for the adsorptive removal of Brilliant Green dye from aqueous solution by rice husk ash. *Journal of Environmental Management*, 84(4), 390–400.
- Melgarejo-Torres, R., Castillo-Araiza, O., López-Ordaz, P., Torres-Martínez, D., Gutiérrez-Rojas, M., Lye, G. J., & Huerta-Ochoa, S. (2014). Kinetic mathematical model for ketone bioconversion using *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Chemical Engineering Journal*, 240,
- Nielsen, J., & Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47(17–18), 4225–4270.
- Palmerín-Carreño, D. M., Castillo-Araiza, C. O., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde Calvo, J. R., Trejo-Aguilar, G. M., Dutta, A., & Huerta-Ochoa, S. (2016). Whole cell bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by *Yarrowia lipolytica* using a three phase partitioning bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(4), 1164–1172.

- Palmerín-Carreño, D. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde Calvo, J. R., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2015). Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 788–793.
- Pandey, B. P., Lee, N., Choi, K. Y., Jung, E., Jeong, D. H., & Kim, B. G. (2011a). Screening of bacterial cytochrome P450s responsible for regiospecific hydroxylation of (iso)flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(4–5), 386–392.
- Pandey, B. P., Lee, N., Choi, K. Y., Jung, E., Jeong, D. hye, & Kim, B. G. (2011b). Screening of bacterial cytochrome P450s responsible for regiospecific hydroxylation of (iso)flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(4–5), 386–392.
- Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G., & Sohng, J. K. (2016). Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnology Advances*.
- Roberts, R. J., & Vaughan, P. F. T. (1971). Hydroxylation of kaempferol, dihydrokaempferol and naringenin by a phenolase preparation from spinach beet. *Phytochemistry*, *10*(1969), 2649–2652.
- Roh, C. (2013). Biotransformation for multiple regio-selective hydroxylation of isoflavonoid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(4), 403–408.
- 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.
- Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *84*, 206–239.
- Stewart, W. E., Caracotsios, M., & Sørensen, J. P. (1992). Parameter estimation from multiresponse data. *AIChE Journal*, *38*(5), 641–650.
- Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., Glieder, a., & Fraaije, M. W. (2010). Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, *146*(1–2), 9–24.
- Tsai, M.-J., Huang, Y.-B., Fang, J.-W., Fu, Y.-S., & Wu, P.-C. (2015). Preparation and evaluation of submicron-carriers for naringenin topical application. *International Journal of Pharmaceutics*, *481*(1–2), 84–90.
- van Berkel, W. J. H., Kamerbeek, N. M., & Fraaije, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, *124*(4), 670–689.
- Vazquez-Cabral, D., Valdez-Fragoso, A., Rocha-Guzman, N. E., Moreno-Jimenez, M. R.,

- Gonzalez-Laredo, R. F., Morales-Martinez, P. S., ... Gallegos-Infante, J. A. (2016). Effect of pulsed electric field (PEF)-treated kombucha analogues from *Quercus obtusata* infusions on bioactives and microorganisms. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *34*, 171–179.
- Veitch, N.C., Grayer, R.J., 2011. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* *28*, 1626–1695
- Wu, J., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2014). Systems metabolic engineering of microorganisms to achieve large-scale production of flavonoid scaffolds. *Journal of Biotechnology*, *188*, 72–80.
- Wu, Y., Li, H., Zhang, X.-M., Gong, J.-S., Rao, Z.-M., Shi, J.-S., ... Xu, Z.-H. (2015). Efficient hydroxylation of functionalized steroids by *Colletotrichum lini* ST-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *120*, 111–118.
- Wu, Y., Li, H., Zhang, X. M., Gong, J. S., Li, H., Rao, Z. M., ... Xu, Z. H. (2015). Improvement of NADPH-dependent P450-mediated biotransformation of 7 α ,15 α -diOH-DHEA from DHEA by a dual cosubstrate-coupled system. *Steroids*, *101*, 15–20.
- Xu, J., Yang, L., Zhao, S. J., Wang, Z. T., & Hu, Z. B. (2012). An efficient way from naringenin to carthamidine and isocarthamidine by *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1803–1806.
- Ye, H., Xu, H., Yu, C., Dai, Y., Liu, G., Xu, W., & Yuan, S. (2009). Hydroxylation of naringin by *Trichoderma harzianum* to dramatically improve its antioxidative activity. *Enzyme and Microbial Technology*, *45*(4), 282–287.
- Ye, H., Yuan, S., & Cong, X. (2007). Biotransformation of puerarin into 3'-hydroxypuerarin by *Trichoderma harzianum* NJ01, *40*, 594–597.
- Zhang, P., Lin, R., Yang, G., Zhang, J., Zhou, L., & Liu, T. (2013). Solubility of Naringenin in Ethanol and Water Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *58*(9), 2402–2404.
- Zhang, Z., He, L., Lu, L., Liu, Y., Dong, G., Miao, J., & Luo, P. (2015). Characterization and quantification of the chemical compositions of *Scutellariae Barbatae herba* and differentiation from its substitute by combining UHPLC-PDA-QTOF-MS/MS with UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *109*, 62–66.

ANEXOS

Anexo 1

Estándares de flavonoides en HPLC bajo las condiciones en las que se midieron las muestras en las cinéticas.

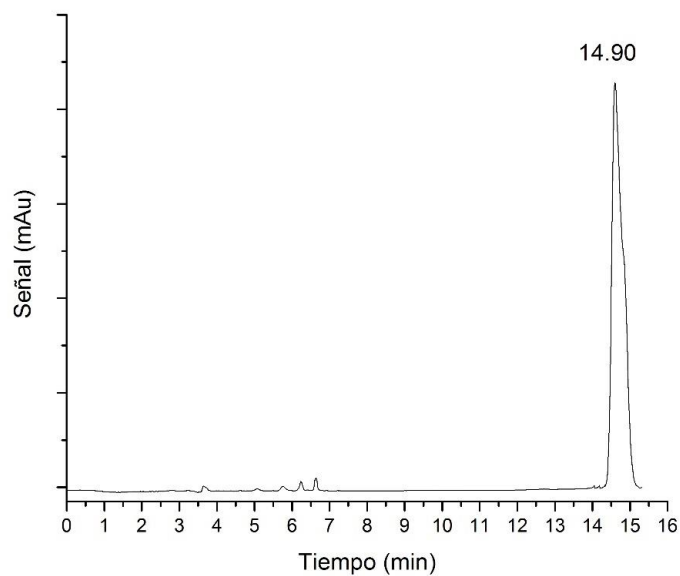


Figura A1.1. Perfil de elución de estándar de naringenina.

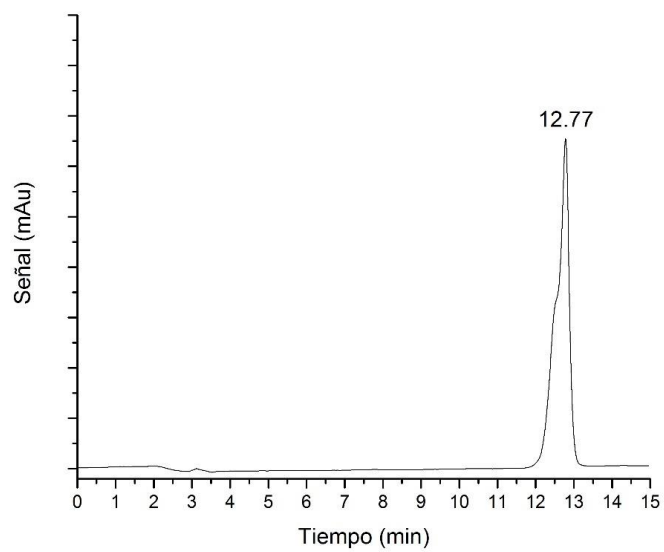


Figura A1.2. Perfil de elución de estándar eriodictiol.

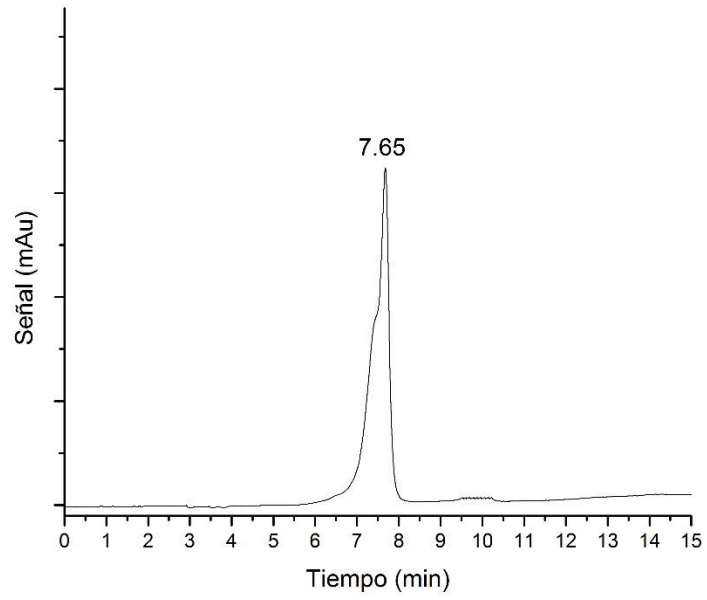


Figura A1.3. Perfil de elución de estándar taxifolina

Anexo 2

Prueba estadística

Análisis estadístico de las máximas áreas producidas de los productos en las cinéticas en lote.

Tabla A2.1 Resultados de la prueba ANOVA a las áreas de los productos.

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
P1	Between Groups	3194.833	2	1597.417	4.970	.065
	Within Groups	1607.167	5	321.433		
	Total	4802.000	7			
P2	Between Groups	20536.875	2	10268.438	0.660	0.557
	Within Groups	77812.000	5	15562.400		
	Total	98348.875	7			
P3	Between Groups	27472.667	1	27472.667	11.540	0.027
	Within Groups	9522.667	4	2380.667		
	Total	36995.333	5			

Tabla A2.2. Prueba de Tukey de producto P1.

Conc	N	Subset for alpha = 0.05
		1
100 mg/L	2	73.5000
150 mg/L	3	81.3333
130 mg/L	3	119.0000
Sig.		0.075

Tabla A2.3. Prueba de Tukey del producto P2.

Conc	N	Subset for alpha = 0.05
		1
150 mg/L	3	874.0000
100 mg/L	2	931.0000
130 mg/L	3	991.0000
Sig.		0.574

Anexo 3

Estándares analizados por UPLC-MS²

La Tabla A3.1 muestra los datos de la biblioteca de flavonoides con los que contaba el equipo UPLC-MS² en el que se analizaron las muestras, se detalla la masa con un electrón menos, el tiempo de retención y el patrón de fragmentación característico de cada compuesto.

Tabla A3.1. Biblioteca de flavonoides.

Compuesto	(M-H) m/z	Tr (min)	MS² iones m/z
Naringenina	271	9.34	177, 151, 119, 227, 116
Apigenina	269	9.24	211, 164, 151, 133, 117
Eriodictiol	287	8.75	151, 135, 119, 175
Floretina	273	9.36	273, 167, 124, 113
Floridzina	471	7.9	435, 273, 167, 123, 113
Quercetina	301	8.73	151, 179, 185, 255, 271
Acacetrina	283	10.19	268, 211, 164, 151, 133
Taxifolina	303		

Anexo 4

Comparación de secuencia de ADN ribosomal en base de datos NCBI BLAST:

Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

EM_FUN:KX098315 KX098315.1 **Aspergillus brasiliensis** isolate S1_BA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
Length=563

Score = 153 bits (190), Expect = 9e-33
Identities = 140/169 (83%), Gaps = 4/169 (2%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 77 TGTGACNAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCC
136
      |||
Sbjct 489 TGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCC
430

Query 137 GTCCCCCGGAGAGAGGGAAACGGCGGCCCAACTCCCCGGCGGGGTTTGAGGGGGCAAT
196
      |||
Sbjct 429 GTCCCCCGGAGAGAGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTT-GAGGGCAGCAAT
371

Query 197 GATTGTTTCGAGAgggggggACCCCCGGAAGTCCACGGGCCTGCACTGT 245
      |||
Sbjct 370 GAC-GCTCGGACAGGCATGC-CCCCCGGAATACCAGGGGGC-GCAATGT 325
```

Score = 100 bits (124), Expect = 5e-17
Identities = 111/141 (79%), Gaps = 9/141 (6%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 10 ATCATTACCGANATGCAGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCT
69
      |||
Sbjct 25 ATCATTACCGA-GTGC-GGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCT
82

Query 70 GTTGATTTGTGACNAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTT
129
      |||
Sbjct 83 GTTGCTTCG-G-CGG-GCCCGC--CGCTTGTCGGCCGC-CGGGGGGCGCCTCTGCCCCC
136

Query 130 CGGGCCCGTCCCC-CCGGAGA 149
      |||
Sbjct 137 CGGGCCCGTGCCCGCCGGAGA 157
```