

BIOTRANSFORMACIÓN DE α -PINENO EMPLEANDO *Aspergillus niger*

RESUMEN

El α -pineno es uno de los monoterpenos más abundantes encontrado en aceites de coníferas y presente en la gran mayoría de aceites esenciales. Los pinenos son de gran valor como precursores de aromas y fragancias cuyos derivados se producen por oxidación y en menor cantidad por extracción directa de plantas. En este estudio se evaluó la biotransformación del α -pineno empleando *Aspergillus niger* como biocatalizador, en diferentes medios de reacción. Fue posible la obtención de α -terpineol y p-mentano-1,8-diol como componentes principales, y componentes minoritarios, borneol y fenchol.

PALABRAS CLAVES: α -pineno, biotransformación, oxidación, *Aspergillus niger*, α -terpineol.

ABSTRACT

*α -pinene is one abundant monoterpene commonly found in different conifers oils and in most of the vegetal essential oils. Pinenes are highly important as precursors of aromas and fragrances, therefore their derivatives are obtained by oxidation and some for direct plant extraction. In this work, the biotransformation of α -pinene was studied using *Aspergillus niger* as biocatalyst in different culture media. The main conversion products obtained were α -terpineol and p-menthane-1,8-diol; on the other hand the minor products were the alcohols fenchol and borneol.*

KEYWORDS: α -pinene, biotransformation, oxidation, *Aspergillus niger*, α -terpineol

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de biotransformación han adquirido importancia creciente a nivel mundial debido a las posibilidades y ventajas que ofrecen en la obtención de productos de interés comercial [7,11]. La oxidación es una de las reacciones más aplicadas para la transformación de sustratos que carecen de oxígeno en su estructura, como es el caso de los monoterpenos. El α -pineno está presente en el aceite de pinos en cantidades superiores al 40%, y con pureza óptica entre 80 y 90%; el mejor R(+) α -pineno obtenido es aproximadamente de 91% mientras que el S(-) α -pineno es de 81% de pureza [2]. Después del limoneno, es el monoterpeneo más abundante y oponible para biotransformación debido a su economía y posibilidades de explotación química. De esta forma se convierte en un sustrato ideal para la elaboración de derivados con mayor valor en el mercado y con diversas aplicaciones, especialmente en el campo de la perfumería.

Debido a que los consumidores demandan productos naturales, la clasificación como "sintético" o "artificial" genera un impacto negativo en el valor de un producto, por ello, la tendencia creciente al uso de biocatalizadores, obteniendo derivados que se consideran "productos naturales". El precio de un producto natural puede ser increíblemente mayor a su análogo sintético y tener una

FABIÁN E. CASTELLANOS

Químico, M Sc.
Investigador Auxiliar
CENIVAM-CICTA
Universidad Industrial de Santander
maequi3@uis.edu.co

AIDÉ PEREA VILLAMIL

Química, M Sc,
Doctora en Química.
Investigadora Principal
CENIVAM-CICTA
Universidad Industrial de Santander
aperea@uis.edu.co

CLAUDIA ORTÍZ LÓPEZ

Microbióloga, M Sc.
Doctora en Ciencias.
Investigadora Principal
CENIVAM
Universidad Industrial de Santander
ortizc@uis.edu.co

gran demanda. Es el caso por ejemplo de la vainillina sintética obtenida a partir del guayacol cuyo valor es menor a USD 15/kg, mientras que el valor de la vainillina natural es superior a los USD 1200/kg [9]. Las biotransformaciones más efectivas de monoterpenos se han realizado con hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que sus características los hacen catalizadores difícilmente superables gracias a su resistencia ambiental y química, abundancia, y poder transformador de sustratos difíciles, con alta selectividad [3].

El compuesto de mayor interés derivado del pineno es el α -terpineol, con valor comercial de USD 9/kg (el α -pineno cuesta alrededor de USD 4 /kg) [10]. Sin embargo, el valor del α -terpineol natural podría ser varios órdenes mayor. El α -terpineol es el alcohol terpénico más importante, con un consumo superior a los 13000 kg/año, ubicándolo entre los 30 compuestos saborizantes con mayor demanda mundial. Ambos enantiómeros tienen cualidades sensoriales diferentes, el R-(+) α -terpineol tiene un aroma floral a lilas mientras que el S(-)-terpineol tiene un aroma a madera de coníferas. Se usa como perfume, repelente de insectos, como antifúngico y desinfectante, como agente odorante, y en la industria del beneficio mineral como agente para flotación de metales [8]. Recientemente algunos copolímeros funcionales también se obtienen usando α -

terpineol [14]. Una ventaja de la producción biocatalítica es la posibilidad de generar α -terpineol con alto exceso enantiomérico. Existen procesos exitosos que emplean enzimas como catalizadores, los cuales demuestran la importancia de las reacciones de biotransformación aplicadas a la industria. Algunos de ellos se han reportado en revisiones al respecto donde se obtienen interesantes conclusiones acerca de las aplicaciones de la biotransformación a gran escala [13].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Microorganismos, medios y reactivos

Para la biotransformación se empleó la cepa *Aspergillus niger* DSM 821 obtenida de DSMZ. Como sustrato α -pineno, reactivo para síntesis (>97%) marca MERCK. Como medios de cultivo se emplearon MEA (Oxoid), TSB (Oxoid CM129), TSA (Oxoid CM131), PDA (Oxoid), YMPG y PDB. Solventes como diclorometano, hexano y etanol fueron grado analítico ACS marca MERCK.

2.2 Análisis de muestras con GC/MS

Los análisis fueron hechos con un cromatógrafo de gases modelo HP5890A Series II equipado con un puerto de inyección *split /splitless* (relación de *split* 30:1), inyector automático HP 7683 Series. Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida HP-5 (60mx0, 25mmx0, 25 μ m) La programación de temperatura fue desde 50°C mantenidos por 5 min, con velocidad de calentamiento de 5°C /min hasta 250°C y mantenida por 20 min. Se empleó un detector selectivo de masas modelo HP 5972 con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV) y analizador de masas cuadrupolar operado en modo de barrido completo desde 40 hasta 400 Dalton (*m/z*). La identificación se realizó comparando los espectros de masas obtenidos empleando el sistema de datos HP *Enhanced Chemstation* G1701BA y las bases de datos NBS75K y WILEY 138.

2.3 Preparación de patrones y calibración

Se preparó una solución *stock* a partir de (1R)-(+)- α -pineno con una concentración de 84000 ppm. A partir del *stock* se prepararon cuatro soluciones patrón con concentraciones entre 160 y 1800 ppm y se emplearon para realizar la curva de calibración. Cada determinación se hizo por triplicado.

2.4 Extracción, secado y concentración de analitos

Una vez completada la transformación, a cada tubo de reacción se adicionaron 2 porciones de 3 mL de diclorometano cada una. Se agitó vigorosamente durante 15 minutos hasta rompimiento de las células, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. y se extrajo completamente la capa orgánica. Este procedimiento se repitió con la segunda porción de solvente y se mezclaron ambas porciones. El extracto obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro y luego concentrado con una corriente de nitrógeno gaseoso

hasta obtener 1 mL exacto del extracto. Este concentrado se analizó directamente por cromatografía de gases.

Preparación de medios y crecimiento del hongo

Para el crecimiento de *A. niger* se probaron dos medios sólidos, PDA y MEA. Se inoculó con aguja en cajas de Petri con 25 mL de cada medio. Luego de 15 días se observó el crecimiento y esporulación. Se realizó la estandarización del inóculo preparando una solución de esporas en un medio salino fisiológico con un agente surfactante y se ajustó hasta concentración de 10^7 esporas/mL. Se preparó la solución acuosa con NaCl (0,85 % p/v) y Tween 80 (0,1 % p/v), esterilizando a 15-20 psi y 121°C durante 15 minutos. Una vez fría la solución se tomaron 20 ml y se adicionaron al *A. niger* esporulado, se transfirieron las esporas a la solución y se guardó en tubo de ensayo. De esta solución se tomó una alícuota para dilución, se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 10^7 esporas / mL, la cual fue usada como inóculo en los ensayos. Para llevar a cabo la biorreacción se prepararon cuatro medios diferentes: PDA, PDB, YMPG y solución de esporas.

2.5 Ensayos de biotransformación

En 30 experimentos, se evaluaron los medios de reacción PDA, PDB, YMPG y la solución de esporas. Se sirvieron 5 ml de cada medio en tubos de 20 ml. La solución de esporas se empleó tal y como fue preparada. Los medios YMPG, PDA y PDB fueron inoculados con 100 μ l de solución de esporas, se taparon con algodón y se sometieron a agitación orbital constante (300 rpm) en temperatura ambiente. A diferentes intervalos de tiempo (1-8 días) se agregaron a cada tubo 10 μ l de solución de α -pineno al 40% en etanol absoluto, sellando inmediatamente el frasco y manteniendo agitación constante durante el tiempo requerido. Una vez finalizadas las reacciones (72h) se efectuó la extracción de productos. Adicionalmente se realizaron blancos donde se adicionó α -pineno en solución, sin presencia de *A. niger*, bajo condiciones idénticas y, una vez transcurridas 72 h, se realizó la extracción.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Crecimiento del hongo

Aspergillus niger presentó mayor biomasa y mejor esporulación en medio MEA, por tanto, este medio fue seleccionado para el crecimiento. A partir del hongo esporulado en MEA se preparó la suspensión usada como inóculo. En la Figura 1 se observa la diferencia de crecimiento entre los medios PDA y MEA.

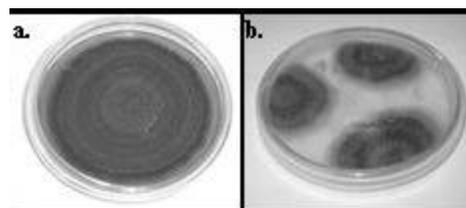


Figura 1. Crecimiento de *A. niger* en medios: a) MEA y b) PDA

3.2 Ensayos de biotransformación

Cada uno de los productos fue analizado por *GC/MS*, determinando la presencia de compuestos oxigenados y concluyendo la existencia de biotransformación. La formación de compuestos oxigenados se inició a partir del segundo día y progresivamente aumentó hasta el octavo día. La máxima cantidad de estos compuestos se observó entre el cuarto y octavo día. El perfil cromatográfico del producto se indica en la Figura 2.

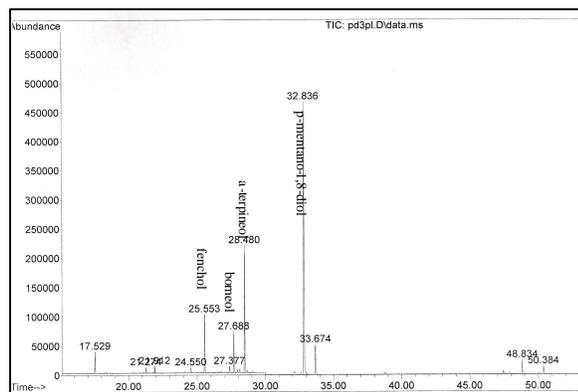


Figura 2. Perfil cromatográfico del producto obtenido

Empleando el medio líquido YMPG se detectó la presencia de 2-feniletanol (11,6%), alcohol comúnmente usado en perfumería con aroma agradable y notas fuertes de rosa y jazmín. La producción de 2-feniletanol se ha reportado con algunas especies de levaduras del género *Kluyveromyces* que pueden catalizar grandes cantidades de dicho compuesto en un medio líquido. Sin embargo la producción del 2-feniletanol se deduce que es debida a la degradación por el microorganismo de la fenilalanina presente en el medio de reacción [5]. El 2-feniletanol solo se encuentra en las reacciones con medio líquido YMPG, que contiene aminoácidos y debe formarse a partir de algún componente en el medio.

En medio PDA se formaron varios metabolitos: a-terpineol (28,0 %), borneol (5,9 %), fenchol (8,15 %) y p-mentano-1,8-diol (46,5 %). Mientras que en medio PDB únicamente se formó a-terpineol (55,1%). Todos los componentes pueden considerarse como derivados del a-pineno.

El a-terpineol es un alcohol monoterpeno encontrado en forma natural en aceites de pino, cajuput y azahar. Posee olor a flores lilas y es un ingrediente empleado en perfumes y cosméticos, especialmente en productos de limpieza debido a su bajo costo y a su alta estabilidad. El a-terpineol tiene un valor de USD 9/kg, mientras que el (R)-(+)-limoneno y el a-pineno cuestan alrededor de USD 4 /kg [10]. El a-terpineol ha sido reportado como producto de la oxidación del limoneno empleando diferentes géneros de hongos, incluido *Aspergillus* [4], *Penicillium* y *Fusarium* [1, 12], con rendimientos mayores al 90% y tiempos de reacción de 8 horas. Sin embargo, los reportes de biotransformación de a-pineno son

muy escasos y se han empleado únicamente bacterias como *Pseudomonas* [15] y hongos del género *Botrytis* [6], obteniendo derivados hidroxilados del pineno en ambos casos, pero únicamente con *Pseudomonas* la formación de a-terpineol.

El fenchol y borneol son alcoholes terpénicos bicíclicos aplicados en perfumería debido a sus características fragantes. Su presencia se puede explicar si tenemos en cuenta que la biosíntesis de la gran mayoría de monoterpenos cíclicos procede a través de la formación del catión a-terpenilo (1), el cual por adición intramolecular al doble enlace conduce a la formación del catión pinilo (2) y a su vez, una transposición de tipo Wagner-Meerwein, puede generar el catión fenchilo o bornilo (3) (Figura 3). Siendo así, los terpenos bicíclicos son propensos a transposiciones de este tipo cuando se someten a condiciones de reacción que lo favorecen. El fenchol y el borneol se han reportado como compuestos presentes en las bioconversiones de limoneno y a-pineno. En este caso es posible que dentro del mecanismo de la hidroxilación los carbocationes sean parte fundamental como intermediarios.

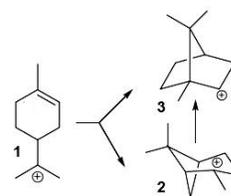


Figura 3. Estructuras del catión a-terpenilo y su transposición

El p-mentano-1,8-diol es un derivado del a-terpineol y se conoce comúnmente como terpino o hidrato de terpino. Tiene propiedades farmacológicas y se usa en algunas presentaciones como componente en medicamentos para la bronquitis y la tos, ya que actúa como expectorante. Dentro de la revisión de la literatura hecha, no se ha encontrado ningún reporte acerca de la bioproducción de este compuesto a partir del limoneno o a-pineno. Su costo aproximado es de USD 86/kg con pureza del 98 %. Se encuentra naturalmente formando parte de los componentes del Eucalipto. Como él, diferentes hidroximoles y otros compuestos hidroxilados se han logrado obtener a partir de monoterpenoides empleando *A. niger*.

El espectro de masas del p-mentano-1,8-diol (Figura 4) es idéntico al espectro del p-mentano-3,8-diol y se caracteriza por la ausencia del ión molecular y por la presencia de fragmentos como 157 [M-Me]⁺, 154[M-H₂O]⁺, 139 [M-H₂O -Me]⁺, 81 [M-OH -hidroxiisopropil -Me]⁺ (como pico base).

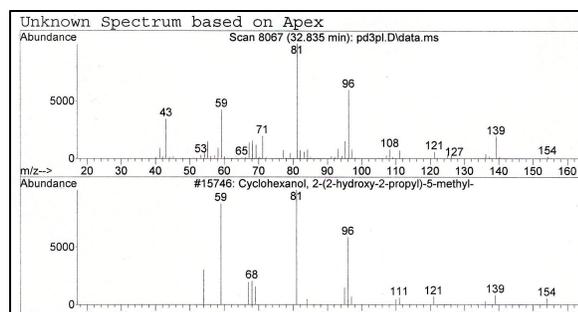


Figura 4. Espectro de masas del p-mentano-1,8-diol obtenido

En ninguno de los casos las soluciones de esporas de *A. niger* condujeron a biotransformación y aunque tales soluciones se han empleado con éxito en otros trabajos, no fue posible obtener conversión. El uso de tapones de celulosa permitió la rápida evaporación del α -pineno y probablemente de sus productos, haciendo imposible su detección. Por esta razón no es recomendable su uso y todas las biorreacciones deben permanecer con sellos herméticos durante su transcurso. Los ensayos blanco indicaron que los medios por si solos no contienen o no se degradan en componentes volátiles que interfieran en la identificación de productos.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Fue posible lograr la bioconversión de α -pineno hasta alcoholes y dioles, empleando PDA y PDB, cuyos principales productos hidroxilados fueron: α -terpineol, p-mentano-1,8-diol, fenol y borneol. Todos los compuestos obtenidos poseen aplicaciones interesantes en la industria de fragancias y farmacéutica. Con medio líquido YMPG no se obtuvieron productos derivados del α -pineno, aunque sí, un producto de oxidación (2- feniletanol) del medio de reacción. Por otra parte a solución de esporas empleada como medio, no permitió la biotransformación (oxidación) del α -pineno. Se aprecia claramente como el medio de reacción y la fase en que se encuentre incide fuertemente en la transformación fúngica, variando la cantidad y tipo de los productos obtenidos.

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] ADAMS, A., DEMYTTENAERE, J.C.R., DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of culture conditions. *Food Chemistry*. 2003, 80: 525-534

[2] AGER, D.J. Handbook of Chiral Chemicals. New York: Marcel Dekker Incorporated. 1999. p 83

[3] DE CARVALHO, C.C.C.R., DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*. 2006, 24: 134-142.

[4] DEMYTTENAERE, J.C.R., BELLEGHEM, K.V., DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and

(S)-(-)-limonene by fungi and use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*. 2001, 57:199-208

[5] FABRE, C., BLANC, P., GOMA, G. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Prog*. 1998, 14(2):270-274.

[6] FAROOQ, A., TAHARA, S., CHOUDHARY, M.I. Biotransformation of (-)- α -pinene by *Botrytis cinerea*. *Z. Naturforsch.* 2002, 57(3-4): 303-306

[7] GAVRILESCU, M., CHISTI, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 2005, 23: 471-499

[8] MAROSTICA, M.R., PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*. 2007, 101: 345-350

[9] SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*. 2005, 23(4): 193-198.

[10] *Spectrum Chemicals and Laboratory Products* Catálogo de productos en: <http://www.spectrumchemical.com>

[11] STRAATHOF, A.J., PANKE, S., SCHMID. The production of chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, 13: 548-556

[12] TAN, Q., DAY, D.F., CADWALLADER, K.R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*. 1998, 33(1): 29-31

[13] THOMAS, S.M., DI COSIMO, R., NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology*. 2002, 20(6): 238-242

[14] YADAV, S., SRIVASTAVA, A.K. Synthesis of functional and alternating copolymer of α -terpineol with butylmethacrylate. *Polymer Plastics Technology and Engineering*. 2004, 43(4): 1229-1243

[15] YOO, S.K., DAY, D.F., CADWALLADER, K.R. Bioconversion of α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. *Process Biochemistry*. 2001, 36: 925-932