

EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE CITRONELOL UTILIZANDO COMO BIOCATALIZADOR *Aspergillus niger*

RESUMEN

Durante la realización de este trabajo se ha estudiado la biotransformación del alcohol terpénico citronelol utilizando *Aspergillus niger* cultivado en medio sólido. Si bien el crecimiento del hongo se favorece en el medio de cultivo MEA, la biotransformación tuvo lugar en PDA después de 4 días de reacción, observándose la hidroxilación en el carbono C7 del citronelol, obteniéndose hidroxicitronelol como único producto, con un rendimiento del 52.21%. Este compuesto, sintetizado químicamente, se utiliza en cosmética y en alimentos como aromatizante aprobado por la Comisión de las Comunidades Europeas y la Secretaría de Salud de México.

PALABRAS CLAVES: Citronelol, biotransformación, *Aspergillus niger* hidroxicitronelol, hidroxilación.

ABSTRACT

In this work, we studied the biotransformation of the terpene alcohol citronellol using solid culture media with Aspergillus niger. MEA culture favors growing of the fungi but biotransformation was improved using PDA after 4 days of reaction. Citronellol was hydroxylated in C7 carbon producing hydroxycitronellol as the only detected component with yield up to 60 %. The hydroxy-compound is chemically synthesized and it is applied in cosmetics and food as a flavor additive which is approved by the Commission of the European Communities and the Mexican Health Secretary.

KEYWORDS: Citronellol, biotransformation, *Aspergillus niger*, hydroxycitronellol, hydroxylation.

1. INTRODUCCIÓN

El citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol), se encuentra en concentraciones hasta del 80% en los aceites de rosa y geranio, y puede ser utilizado como precursor en transformaciones tanto químicas como bioquímicas, para obtener compuestos con mayor valor agregado [1]. Las transformaciones bioquímicas generalmente se realizan utilizando microorganismos, debido a que estos promueven la oxidación de componentes con alta estereoespecificidad y estereoselectividad, usualmente en condiciones de reacción muy suaves dando lugar a compuestos naturales en lugar de sintéticos [2].

Desde 1987, se ha estudiado la bioconversión en diferentes medios de cultivo, del citronelol por microorganismos como *Aspergillus niger* [1], *Botrytis cinerea* [3], *Cystoderma carcharias*[4] y *Penicillium sp.* [5], reportándose principalmente como productos de la transformación microbiana el 2,6-dimetil-2-octen-1,8-diol, el 2,6-dimetil-1,8-octanediol, el 6-metil-5-hepten-2-ona, el 3,7-dimetil-1,6,7-octanetriol, y los isómeros *Cis/Trans* del óxido de rosa.

El hidroxicitronelol (7-Hidroxi-3,7-dimetil octan-1-ol), se encontró en el aroma de los arándanos sólo hasta 1983, cuando se especificó el olor característico de estos frutos determinándose su concentración de umbral en 5mg/Kg en agua [6]. Su preparación química se encuentra

SINDY JOHANNA LOZANO VERJEL

Química
Universidad Industrial de Santander
dashaiel@hotmail.com

FABIÁN E. CASTELLANOS

Químico
Maestría en Química
Universidad industrial de Santander
fcastem@hotmail.com

AIDE PEREA VILLAMIL

Química, M. Sc, Doctora en Química
Profesora Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
aperea@uis.edu.co

patentada [7], haciendo llamativa su producción en el campo biotecnológico.

Por tal motivo, en este trabajo se evaluó la obtención de hidroxicitronelol por medio de la biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger*, en condiciones muy suaves de reacción.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Materiales Y Reactivos

Se utilizó una cepa del microorganismo puro liofilizado *Aspergillus niger* (DSM 821) obtenida de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). Los medios de cultivo fueron MEA (Extracto de Malta Agar) y PDA (Papa Dextrosa Agar) obtenidos de Oxoid. Como sustrato se empleó una mezcla racémica (S)-(-) y (R)-(+)-citronelol, reactivo para síntesis (Merck).

Los reactivos utilizados fueron grado analítico, mientras que los patrones empleados durante los análisis cromatográficos fueron grado GC.

2.2 Cultivo del microorganismo

El hongo fue cultivado y conservado por replicaciones periódicas en MEA y PDA cada 8-15 días. La inoculación se realizó en viales transparentes de 20mL llenados inclinadamente con 5mL del medio, en todos los

casos, se adicionaron 50 μ L de una suspensión de esporas de aproximadamente 10⁸ esporas mL⁻¹[8]. e inmediatamente, cada recipiente se cubrió con parafilm y se incubó en la estufa a 28°C durante 3 días.

2.3 Biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger*.

A cada sistema se le adicionó una solución del sustrato en EtOH absoluto, después de 3 días de inoculado el medio, se cubrió con tapa y septum y se sellaron. A partir de este momento se monitoreó la conversión, extrayendo con 2 x 3mL de diclorometano (DCM) después de 0, 2, 8 y 15 días de reacción. Los productos generados se analizaron, identificaron y cuantificaron por GC-MS.

2.4 Resultados y discusión

El análisis GC-MS de los extractos de cultivo superficial de *A. niger* en presencia de citronelol permiten señalar que el medio de cultivo y de biotransformación, afecta directamente el proceso y/o recuperación del sustrato. En el medio MEA por ejemplo, no hay formación de ningún compuesto pese al buen crecimiento del hongo. En este caso la recuperación del citronelol al cabo de 8 días, fue sólo del 0.16% (Tabla 1), lo cual permite suponer que el sustrato se evapora durante la reacción, como lo plantean Demyttenaere y colaboradores, 2004; donde la pérdida por evaporación supera el 60% del citronelol en medio YMPG.

| SUSTRATO Y METABOLITOS | 2 días | | 8 días | |
|------------------------|--------|-------|--------|-------|
| | MEA | PDA | MEA | PDA |
| Citronelol | 52.23 | 81.4 | 0.16 | 7.86 |
| Oxido Rosa | 0 | 0.14 | 0 | 0.14 |
| Hidroxicitronelol | 0 | 16.57 | 0 | 91.69 |
| Linalol | 0 | 0.07 | 0 | 0 |
| a-Terpineol | 0 | 0.13 | 0 | 0 |
| DMOED ^a | 0 | 0.07 | 0 | 0.12 |
| DMOAD ^b | 0 | 0 | 0 | 0.19 |

Tabla 1. Cantidad total de citronelol remanente (%) y productos de bioconversión (%) obtenidos durante la extracción con DCM. ^a2,6-dimetil-7 octen-2,6-diol; ^b3,7-dimetil-1,7-octadienol

En PDA, la recuperación del sustrato, en el mismo tiempo es mayor, 7.86%, pero en este medio se observa biotransformación, formándose como producto principal el hidroxicitronelol, producto de la hidroxilación en el C-7 del citronelol (Figura 1.), con un porcentaje de obtención del 91.69%.

La obtención de este producto como resultado de la biotransformación es significativamente importante, debido a que en las investigaciones realizadas sobre la biotransformación de citronelol [2,5,7,8], en ningún caso se reporta el Hidroxicitronelol, como producto del bioproceso.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La biotransformación de citronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821, empleando como medio de cultivo PDA, permite la obtención de hidroxicitronelol, con mínima contribución de metabolitos y condiciones suaves de reacción, obteniéndose porcentajes de conversión del 16.57% después de 2 días, hasta 91.69% después de 8 días. La biotransformación y recuperación de citronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821, empleando como medio de cultivo MEA, no se lleva a cabo, manifestando la influencia del medio en el proceso.

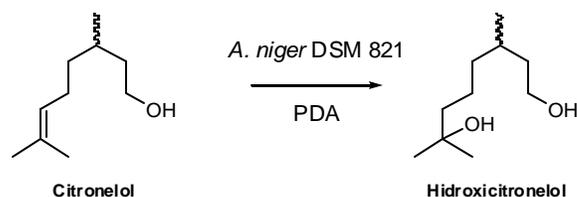


Figura 1. Esquema de la bioconversión de citronelol a hidroxicitronelol utilizando *Aspergillus niger* DSM 821 en medio PDA.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] DEMYTTENAERE, J.C.R., VANOVERSCHELDE, J. and DE KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A*, 2004; Vol. 1027(1-2): P.137-146.
- [2] DEMYTTENAERE, J.C.R. and DE KIMPE, N. Biotransformation of Terpenes by Fungi Study of the Pathways Involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001; Vol. 11: p. 265–270.
- [3] BRUNERIE, P., *et al.* Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987; Vol. 27 (1): P.6-10.
- [4] ONKEN, J. and BERGER, R.G. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999; Vol. 51: P.158-163.
- [5] MARÓSTICA, M.R. and PASTORE, G.M. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2006; Vol. 26 (3): P.690-696.
- [6] HIRVI, T. and HONKANEN, E. The Aroma of Blueberries. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 1983; Vol. 34: P.992-998.
- [7] PREPARATION OF Hydroxycitronellol. United States Patent 4482765.
- [8] DEMYTTENAERE, J.C.R. and WILLEMEN, H.M. Biotransformation of Linalool to Furanoid and Pyranoid Linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, 1998; Vol. 47 (6): P.1029-1036.