Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

EFECTO DE FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE EL ESTADO ENERGÉTICO CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE VAINILLINA EN *Amycolatopsis* SP. ATCC 39116 DURANTE CICLOS DE BIOTRANSFORMACIÓN

Por:

Josep Marco Virgo Cruz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

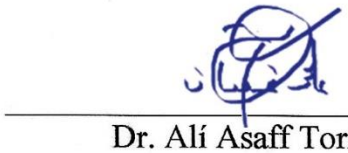
Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

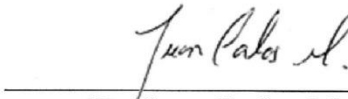
Hermosillo, Sonora Junio 2021

APROBACIÓN

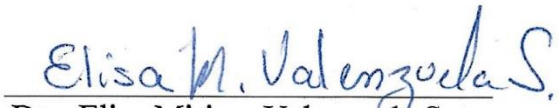
Los miembros del comité designados para la revisión de tesis de Josep Marco Virgo Cruz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



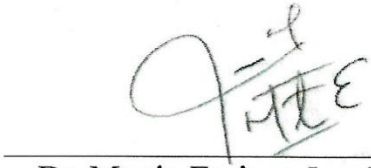
Dr. Alí Asaff Torres
Director de tesis



Dr. Juan Carlos Mateos
Co-director de tesis



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Integrante del comité de tesis



Dr. Martin Enrique Jara Marini
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efecto de Fuentes de Carbono y Nitrógeno sobre el Estado Energético Celular y la Producción de Vainilla en *Amycolatopsis* sp ATCC 39116 Durante Ciclos de Biotransformación" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Josep Marco Virgo Cruz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Maestría otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, AC.), por abrirme las puertas de tan prestigiosa institución y permitirme alcanzar una de mis metas académicas.

Al proyecto Nro 157003 CONACyT-PEI “Síntesis heterogénea de derivados del ácido ferúlico de alto valor agregado a partir del nejayote”, por el financiamiento para la realización de este trabajo.

A México por recibirme y darme un hogar.

A mi director de tesis el Dr. Ali Asaff Torres, le agradezco la confianza por recibirme en su equipo de trabajo, su paciencia durante el desarrollo de la tesis, las enseñanzas y los consejos para poder crecer académicamente y como persona.

A mi co-director el Dr. Juan Carlos Mateos por sus acertadas observaciones y consejos para la realización de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Elisa Valenzuela por inculcarme sus enseñanzas en el aula que me permitieron crecer académicamente, su guía y consejos durante la realización de mi trabajo y escrito de tesis le estoy muy agradecido.

Al Dr. Martin Jara por sus consejos y observaciones para la realización de mi trabajo de tesis.

A Amanda Languré, técnico del laboratorio por toda su asistencia y colaboración durante la realización de mi trabajo de tesis.

A Víctor Contreras por su apoyo en el laboratorio para la realización de mis experimentos.

A Estefany Chavarría, por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, sus consejos y su ayuda moral y práctica durante la escritura de mi trabajo.

A mis amigos, que vieron mi crecimiento y estuvieron conmigo apoyándome durante todo el transcurso de la Maestría Estefany, Carlos, Dalia, Male y Enis. Muchas gracias!

A mis compañeros y amigos de la Maestría con los que compartí muchos momentos de aprendizaje, estrés y alegría, Carlos, Leo, Michel, Jannel, Martin, Melisa, Omar, Jorge, Dani, y Gio.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a toda mi familia
que fueron mi soporte y guía durante toda mi vida:
A mi madre Betty Cruz, por su amor y apoyo incondicional
A mi padre Marco Virgo, por su apoyo y darme consejos para toda mi vida
A mis hermanas Gissela, Silvia y Roselin por su amor y apoyo incondicional.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
RESUMEN 10
ABSTRACT 11
1. INTRODUCCIÓN 12
2. ANTECEDENTES 14
2.1. La Vainilla y su Extracto 14
2.2. La Vainillina 15
2.3. Obtención de VAN por Procesos Biotecnológicos 16
2.4. *Amycolatopsis* Sp. como Agente de Biotransformación 18
2.5. Biotransformación del AF por *Amycolatopsis* Sp. 18
2.5.1. Desacetilación no Oxidativa del AF Dependiente de Coenzima A 19
2.5.2. Degradación de la VAN 20
2.5.3. *β*-Oxidación del Ácido ´Ferúlico 20
2.6. Regulación de las Rutas Catabólicas en *Amycolatopsis* Sp. ATCC 39116 21
2.6.1. Regulación Transcripcional 22
2.6.2. Regulación Enzimática 23
2.6.3. Influencia del Estado Energético Celular en la Regulación Metabólica. 26
2.7. Sistemas Celulares de Biotransformación 27
2.7.1. Estudios Previos sobre el Efecto de las Fuentes de Carbono y Nitrógeno en la Biotransformación del AF 27
3. HIPÓTESIS 30
4. OBJETIVOS 31
4.1. Objetivo General 31
4.2. Objetivos Específicos 31
5. MATERIALES Y MÉTODOS 32
5.1. Preparación del Inóculo 32
5.2. Obtención de Células Completas de *Amycolatopsis* Sp. ATCC 39116 por Cultivo Sumergido 32
5.3. Efecto de las Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Catabolismo del AF**.** 33
5.4. Producción de VAN en Ciclos Semicontinuos de Operación 33
5.5. Determinaciones Analíticas 34
5.5.1. Cuantificación de ATP Intracelular 34

CONTENIDO (continuación)

5.5.2. Determinación De Actividad Enzimática Del Extracto Intracelular 35
5.5.3. Determinación de Biomasa 36
5.5.4. Cuantificación de AF y Productos del Catabolismo 36
5.6. Parámetros Cinéticos de Biotransformación 36
5.7. Análisis Estadístico 37

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39
6.1. Efecto de Fuentes de Carbono y Nitrógeno sobre la Producción de VAN en Cultivo Sumergido 39
6.1.1. Efecto de las Fuentes de Carbono 39
6.1.2. Cinéticas de Biotransformación del AF con Fuentes de Carbono como Cosustratos 42
6.1.3. Efecto de Fuentes de Nitrógeno 46
6.1.4. Cinéticas de Biotransformación del AF Usando Fuentes de Nitrógeno 49
6.2. Efecto de Fuentes de Carbono y de Nitrógeno en la Formación de ATP 53
6.3. Actividad Enzimática de la Feruloil Coa Sintetasa y Vainillina Deshidrogenasa 56

7. CONCLUSIONES 62

8. RECOMENDACIONES 63

9. REFERENCIAS 64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación química de la molécula de vainillina……..	16
2	Resumen esquemático del metabolismo del ácido ferúlico en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116…….	20
3	Ensayos de biotransformación de AF durante 24 h con células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, usando diferentes fuentes de carbono para la regeneración de cofactores enzimáticos……...…….	40
4	Cinéticas de biotransformación de AF en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de carbono para la regeneración de cofactores enzimáticos.……..……..	44
5	Ensayos de biotransformación de AF, durante 12 h con células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de nitrógeno para la regeneración de cofactores enzimáticos……...…….....	48
6	Cinéticas de biotransformación de AF en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de nitrógeno para la regeneración de cofactores enzimáticos.……...……..	51
7	Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la concentración de ATP…...……...	55
8	Efecto de la adición de fuentes de carbono y nitrógeno en la actividad enzimática de la feruloil-CoA sintetasa y vainillina deshidrogenasa……...……..	58
9	Ciclos continuos de biotransformación del AF en cultivo sumergido utilizando unas células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116……..…….	61

RESUMEN

Amycolatopsis sp. ATCC 39116 (anteriormente llamada *Streptomyces setonii*) es un actinomiceto que cataboliza el ácido ferúlico (AF) mediante des-acetilación no-oxidativa para la formación de vainillina (VAN), en una reacción dependiente de ATP. Estudios previos realizados por el grupo de trabajo, han demostrado que en cultivo sumergido la distribución del carbono está redirigida hacia la formación de productos secundarios (ácido vainillínico (AV) y guayacol (GY)), esto debido a una descompensación en el estado energético celular (concentración de ATP) y un desequilibrio redox. En ese sentido se propone que la adición de nutrientes exógenos podría restablecer este balance energético y consecuentemente mantener la producción de VAN en varios ciclos de biotransformación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno durante el catabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 sobre el estado energético celular y la producción de VAN en ciclos continuos de biotransformación. Para corroborar la hipótesis, se evaluó el efecto individual de glucosa, fructosa, xilosa y maltosa (fuentes de carbono) así como extracto de levadura, $NaNO_3$ y peptona de caseína (como fuente de nitrógeno), a una concentración de 2 g/L sobre la producción de VAN. Posteriormente, para determinar si la adición de dichos nutrientes tiene un efecto directo en la regeneración de cofactores y la formación de VAN, se midió la concentración de ATP y la actividad enzimática de la feruloil CoA sintetasa y vainillina deshidrogenasa. Finalmente se determinó el efecto de la adicción de nutrientes en dos ciclos de biotransformación empelando un sistema de células en reposo de *Amycolatopsis* sp ATCC 39116.

Palabras clave: *Amycolatopsis* sp., cultivo sumergido, biotransformación, vainillina, ácido ferúlico.

ABSTRACT

Amycolatopsis sp. ATCC 39116 (formerly called *Streptomyces setonii*) is an actinomycete that catabolizes ferulic acid (AF) by non-oxidative de-acetylation to form vanillin (VAN), in an ATP-dependent reaction. Previous studies carried out by the work team have shown that in submerged culture the distribution of carbon is redirected towards the formation of secondary products (vanillinic acid and guaiacol), this due to a low cellular energy state (ATP concentration). On the other hand, the addition of exogenous nutrients could restore this energy balance and consequently maintain the production of VAN in various biotransformation cycles. The objective of this work was to evaluate the effect of carbon and nitrogen sources during FA catabolism in *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 on the cellular energy state and the production of VAN in continuous cycles of biotransformation. To corroborate the hypothesis, the individual effect of carbon sources (glucose, fructose, xylose and maltose) and nitrogen (yeast extract, NaNO3 and casein peptone) was evaluated, at a concentration of 2 g / L on the production of VAN. Subsequently, to determine if the addition of these nutrients has a direct effect on the regeneration of this ATP and the formation of vanillin, the concentration of ATP and the enzymatic activity of feruoyl CoA synthetase and vanillin dehydrogenase were measured. Finally, the effect of nutrient addiction in two biotransformation cycles was determined using a resting cell system of *Amycolatopsis* sp ATCC 39116

Keywords: *Amycolatopsis* sp., Submerged culture, Biotransformation, Vanillin, Ferulic acid.

1. INTRODUCCIÓN

El saborizante de vainilla es uno de más utilizados a nivel mundial, empleado, tanto por la industria alimentaria (helados, galletas, bebidas y entre otros) (Fleige y col., 2013; Ma y Daugulis, 2014), como por las industrias farmacéutica y cosmética (Ciriminna y col., 2019). El saborizante de vainilla es obtenido de manera natural, como extracto etanólico de las vainas de la orquídea *Vainilla planifolia* que sometidas a un proceso de curado y secado previos, adquieren su sabor y aroma característicos (Walton y col., 2003).

El extracto resultante se comercializa como como saborizante natural de vainilla, cuyo componente mayoritario es un aldehído conocido comúnmente como vainillina (VAN) (Fache y col., 2016). Debido a la alta demanda del saborizante de vainilla, la industria ha desarrollado diferentes procesos para producir VAN a partir de otras fuentes (Kaur y Chakraborty, 2013). Tal es el caso de la VAN proveniente de ligninas originadas en la industria del papel (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011). Así también se produce VAN a partir de guayacol (GY) y ácido glioxílico, ambos provenientes de la industria del petróleo. La VAN obtenida a partir de estas materias primas, se denomina "vainillina de síntesis química", que se comercializa como "vainillina artificial" (Ciriminna y col., 2019).

En las últimas décadas, una de las megatendencias de mercado es el consumo de alimentos naturales por lo que las regulaciones de Europa y Estados Unidos se han venido tornando más rigurosas, restringiendo, en algunos segmentos, el uso de saborizantes artificiales. Sin embargo, dado que la producción de saborizante de vainillina natural no alcanza a cubrir la gran demanda de mercado, la producción biotecnológica de vainillina ha cobrado gran relevancia debido a que puede catalogarse como "vainillina natural" (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011). Dentro de las diferentes opciones biotecnológicas, la más común y aceptada por el mercado es el uso de sistemas de biotransformación en los que células viables en estado estacionario catabolizan un sustrato a partir de una serie de reacciones metabólicas (Waldmann y Drauz, 2002), dando como resultado la obtención de un producto deseado. Es así, que para la producción de VAN se pueden emplear como agentes de biotransformación diferentes microrganismos (hongos y bacterias) y como sustratos, moléculas provenientes de fuentes vegetales, tal el caso del ácido ferúlico (AF) (Contreras-Jácquez y col., 2020). Dentro de los diferentes agentes de biotransformación, el actinomiceto *Amycolatopsis*

sp. ATCC 39116 es uno de los más eficientes, debido al tipo de rutas catabólicas que posee y su tolerancia elevada a altas concentraciones de los sustratos y los productos de la biotransformación (Contreras-Jácquez y col., 2020).

Sin embargo, aún existen desafíos para mejorar la obtención de VAN mediante un sistema de biotransformación, tales como: el mantenimiento del estado energético celular durante el proceso y la regeneración de cofactores y coenzimas necesarias para las reacciones enzimáticas involucradas en la bioconversión (Schmid y col., 2001). Se ha reportado que la producción de VAN, utilizando como sistema de biotransformación células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en cultivo líquido disminuye la concentración de ATP intracelular, lo que induce a las células a buscar el restablecimiento del equilibrio redox por medio de rutas anapleróticas como la *β*-oxidación que no están asociadas a la síntesis de VAN (Contreras-Jácquez y col., 2020). En consecuencia, este trabajo propone el uso de nutrientes como fuentes de carbono y nitrógeno para la regeneración de cofactores y coenzimas, y de esta manera reestablecer el gasto energético que se requiere para la biotransformación del AF en VAN e incrementar la producción de está utilizando células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

2. ANTECEDENTES

2.1. La Vainilla y su Extracto

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una orquídea originaria de México que fue cultivada por los Aztecas (Walton y col., 2003). Alrededor del año 1520, el famoso conquistador Hernán Cortez había probado una bebida de chocolate saborizada con vainilla (Walton y col., 2003) siendo él quien llevo ambos productos a Europa, los cuales se volvieron populares rápidamente (Fache y col., 2016). En la actualidad su cultivo se ha extendido a las islas Caribeñas, Madagascar, Tahití, Indonesia, entre otros países (Chambers y col., 2019) y se comercializa, como vainas curadas de vainilla o como su extracto.

El cultivo de la planta requiere de climas cálidos y húmedos, debido a que es sensible a bajas temperaturas, además de baja exposición al sol (Chambers y col., 2019). Cuando la planta está en etapa de floración, los insectos y aves realizan la polinización de las flores. Sin embargo, la polinización natural es baja, menor al 1%, por lo que, usualmente se recurre a técnicas de polinización manual (Chambers y col., 2019; Walton y col., 2003);. aspecto que resulta altamente laborioso y costoso, (Bomgardner, 2016). Después de la polinización (entre 7 a 9 meses) se realiza la cosecha de las vainas verdes de vainilla, cuando las puntas tienen un color amarillento (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011). La semana siguiente a la cosecha se realiza el curado de las vainas que, tiene por objeto, detener el proceso vegetativo natural y acelerar los procesos que llevan a la formación de los constituyentes aromáticos del sabor (Murillo, 1995). Usualmente el proceso consiste en sumergir las vainas en agua a 65°C durante 2 a 3 minutos y posteriormente dejarlas reposar por un periodo de 24-48 horas (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011). Finalmente, inicia el secado de las vainas de vainilla 1 a 2 semanas al sol y de 2 a 3 meses en la sombra, en esta etapa las vainas adquieren un color oscuro característico (Walton y col., 2003). Una vez terminado el curado, se estima que las vainas de vainilla tienen un contenido extraíble de entre 1-2% de VAN. El extracto de vainilla comercial posee un contenido mínimo reglamentario de VAN del 2% y se obtiene principalmente a partir de vainas curadas de las orquídeas de *Vainilla Planifolia* y *Vainilla Fragans* (Banerjee y Chattopadhyay, 2019) mediante la extracción de los compuestos solubles en

un solvente, comúnmente etanol (Bernd, 2014). Los datos muestran que a pesar de los esfuerzos y el avance de las técnicas de cultivo de plantas de vainilla, el rendimiento productivo es muy bajo. Una estimación realizada por Ciriminna y col. (2019), menciona que se requieren 40.000 flores polinizadas para obtener 500 kg de vainas que es equivalente a 1-10 kg de VAN.

Se ha reportado que, en el año 2019, la producción de vainas curadas de vainilla a nivel mundial fue de 8,094 toneladas (t), siendo los países con mayor producción los siguientes: Madagascar (3.102 t), seguido de Indonesia (2.259 t), China (918 t) y México (495 t) (FAOSTAT, 2018). Sin embargo, esta producción no alcanzaría a abastecer ni el 1% del total de la demanda mundial del mercado, estimada en 37,286 toneladas anuales de VAN (Bomgardner, 2016).

2.2. La Vainillina

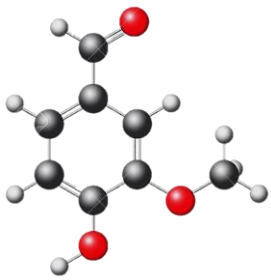


Figura 1. Representación química de la molécula de vainillina

La vainillina (VAN) (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido; Fig. 1) es un polvo blanco, con cristales de morfología ortorrómbica obtenidos en sistemas bifásicos y multifásicos (Singh, 2002), tiene un peso molecular de 152.15 g/mol y puntos de fusión y ebullición de 80-83°C y 285°C, respectivamente (Banerjee y Chattopadhyay, 2019). Este compuesto tiene un sabor intenso, cremosidad tenaz, aroma característico (Kaur y Chakraborty, 2013) y es la molécula mayoritaria del extracto de la orquídea de *Vainilla planifolia*, el saborizante más utilizado en todo el mundo (Gallage y Møller, 2015)

2.2.1. Obtención de VAN por Síntesis Química

La VAN también puede ser obtenida por síntesis química a partir de intermediarios de la industria del petróleo y de las ligninas procedentes de la industria del papel. En el primer caso, el proceso más utilizado es el denominado "Riedel" que consiste en la condensación del GY con ácido glioxílico en un paso de reacción altamente regio-selectiva en la posición *para* que da como producto ácido vainillil-mandélico. Este es finalmente transformado en VAN en un paso de descarboxilación oxidativa mediada por Cu^{2+}, utilizando un sistema de regulación de hidrógeno/oxígeno en un medio alcalino a temperaturas entre 80 a 130 °C (Fache y col., 2016). Por su parte, el proceso de obtención a partir de ligninas consiste en tratar una solución acuosa de lignina con oxidantes a pH alcalino (utilizando hidróxido de sodio), altas temperaturas y presiones para despolimerizar la lignina y obtener VAN. Dada la complejidad y heterogeneidad de las ligninas, no existe un mecanismo de reacción claramente definido (Fache y col., 2016).

Estos procesos, aunque tienen altos rendimientos y son baratos, son considerados contaminantes (Havkin-Frenkel y Belanger, 2011) y la VAN obtenida puede contener trazas de compuestos intermediarios o catalizadores que son con considerados como riesgosos para la salud del hombre (Banerjee y Chattopadhyay, 2019). Adicionalmente, se ha reportado adulteraciones de VAN de síntesis química con cumarina, un compuesto aromático que si bien intensifica el aroma a VAN (Hazleton y col., 1956), produce hepatotoxicidad en animales (Shen y col., 2014). Por lo anterior, la VAN sintética ha sido regulada para su aplicación en alimentos en algunos países de Europa y en Estados Unidos (Banerjee y Chattopadhyay, 2019).

2.3. Obtención de VAN por Procesos Biotecnológicos

La VAN biotecnológica se puede obtener mediante procesos de biotransformación mediados por diferentes tipos de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias (Banerjee y Chattopadhyay, 2019).

Usualmente, los sistemas de biotransformación contienen células en reposo, las cuales se obtienen cultivándolas en condiciones apropiadas. Cuando las células se encuentran en estado estacionario, se separan del medio mediante centrifugación o filtración y se lavan con una solución salina. Posteriormente, las células se resuspenden en el tampón de biotransformación (Shuler y Kargi, 1992). La concentración celular se puede variar y en comparación con experimentos que usan células en crecimiento, se puede aplicar una mayor concentración celular (Waldmann y Drauz, 2002). Asimismo, estas células activas con un adecuado sistema de regeneración de cofactores podrían ser usadas como un catalizador biológico en varios ciclos de biotransformación. Una ventaja en los procesos de biotransformación es que las células viables tienen un metabolismo activo que permite la bioconversión de sustratos y que adicionalmente podría ser aprovechado en conjunto con sus procesos catabólicos centrales para regenerar cofactores enzimáticos.

Algunos hongos como, *Sporotrichum thermophile, Picnoporous cinnabarinus, Phanerochaete chrysosporium y Aspergillus niger* logran biotransformar materias primas como el isoeugenol y el AF en VAN (Karode y col., 2013; Motedayen y col., 2013; Tan y col., 2015; Tilay y col., 2010). No obstante, no se han logrado obtener concentraciones mayores a 5 g/L. Así también, se han realizado investigaciones con levaduras, tal es el caso de *Candida galli* que en un estudio permitió obtener 0.58 g/L de VAN utilizando como sustrato AF (Achterholt y col., 2000).

Pseudomonas fluorecens BF-13 y *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 destacan entre todas las bacterias usadas para la biotransformación de AF, logrando concentraciones de VAN de 0.2 g/L y 12 g/L respectivamente (Civolani y col., 2000; Fleige y col., 2016). Por otro lado, se ha estudiado que la ingeniería metabólica y la modificación genética de bacterias permite obtener recombinantes que incrementan los rendimientos de obtención de VAN, tal es el caso de *Pseudomonas fluorecens* BF-13 1p4(pBB1) con la cual se obtuvo 1.28 g/L de VAN (Graf y Altenbuchner, 2014). Por otro lado, a la cepa recombinante *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (F84) la adición de copias de los genes *fcs* y *ech* al promotor constitutivo *permE*, con el objetivo de incrementar la sobre expresión de las enzimas feruloil-CoA sintetasa y enoil-CoA hidratasa/aldolasa, y la deleción del gen *vdh* que codifica para la enzima vainillina deshidrogenasa permitió alcanzar hasta 20g/L de VAN en un sistema de lote alimentado con AF (Fleige y col., 2013). A pesar de ello, el uso de organismos genéticamente modificados para la producción de VAN, aún se encuentra objetado, especialmente en Europa (Asaff Torres y col., 2009).

2.4. *Amycolatopsis* Sp. como Agente de Biotransformación

La cepa *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (antes *Streptomyces setonii* ATCC 39116) es un actinomiceto capaz de tolerar altas concentraciones de AF, VAN y otros subproductos de la biotransformación. Diferentes estudios muestran que esta cepa es capaz de producir entre 6.4 a 13.9 g/l de VAN, con un rendimiento molar del 75%. Por su parte, la cepa *Amycolatopsis* sp. HR167, ha demostrado que puede producir VAN a una concentración de 11.5 g / L, llegando a un rendimiento molar del 77.8% (Garcia-Fuentes y col., 2015).

Amycolatopsis sp pertenece a la familia de las actinobacterias, caracterizadas por tener morfología filamentosa, con el desarrollo de hifas y micelio aéreo a partir del cual forman esporas. Estos microorganismos se caracterizan por ser saprófitos; es decir, en la naturaleza obtienen su energía a partir de materia orgánica inerte (Wink y col., 2017). *Amycolatopsis* sp. es una bacteria gram positiva que reside generalmente en el suelo y es capaz de despolimerizar la lignina. Dentro de esta familia, *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 se caracteriza, por su alta eficiencia en catabolizar AF por la vía de la desacetilación no oxidativa y la *β*-oxidación, rutas que producen VAN y ácido vainillínico (AV) respectivamente. (Contreras-Jácquez y col., 2020). No obstante, no se han encontrado en la literatura sistemas para la regeneración de cofactores necesarios para la biotransformación del AF.

2.5. Biotransformación del AF por *Amycolatopsis* Sp.

Se han descrito dos rutas (Figura 2) que pueden catabolizar la biotransformación del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. En la primera se produce VAN por una ruta no oxidativa dependiente de Coenzima A (CoA) conocida como desacetilación no oxidativa (Achterholt y col., 2000). La segunda es una ruta oxidativa (*β*-oxidación) que produce AV sin la formación de VAN (Meyer y col., 2018).

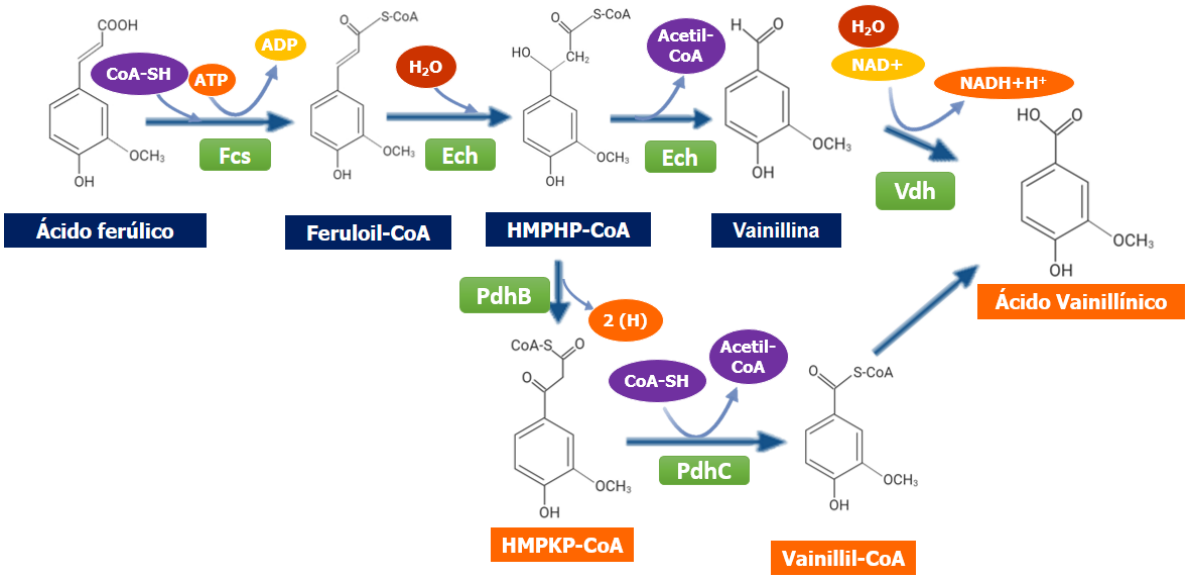


Figura 2. Resumen esquemático del metabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.
La vía de oxidación *β* del AF avanza a través de 4-hidroxi-3-metoxifenil-β-cetopropionil-CoA y vanillyl-CoA, mientras que la vía no oxidativa avanza a través de la VAN. Fcs = feruloil-CoA sintetasa, Ech = enoil-CoA hidratasa / aldolasa, Ech2 = enoil-CoA hidratasa putativa, PdhB = HMPHP-CoA deshidrogenasa, PHDC = HMPKP-CoA deshidratasa, Vdh = vainillina deshidrogenasa. (Meyer y col., 2018)

2.5.1. Desacetilación no Oxidativa del AF Dependiente de Coenzima A

Gallage y Møller (2015) estudiaron la ruta de la desacetilación oxidativa, la cual inicia con la formación de feruloil-CoA, reacción que es catalizada por la enzima 4 hidroxicinamato-CoA ligasa denominada comúnmente llamada feruloil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.34), que es codificada por el gen *fcs*. Esta enzima utiliza una molécula de ATP y requiere Mg^{2+} y CoA para llevar a cabo la catálisis. Posteriormente se produce la hidratación de la feruloil-CoA, catalizada por la 4-hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa o enoil-CoA hidratasa/aldolasa (ECH) (E.C. 4.1.2.61) codificada por el gen *ech*. En consecuencia, la 4-hidroxi-3-metoxifenil-*β*-hidroxipropionil-CoA es formada como un intermediario transiente y subsecuentemente es convertido en VAN y acetil-CoA por un mecanismo de retro-aldolación (Meyer y col., 2018).

2.5.2. Degradación de la VAN

La habilidad que poseen células *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 para tolerar concentraciones elevadas de VAN aún no se ha dilucidado, no obstante, puede deberse a las rutas catabólicas que posee este actinomiceto para degradar la VAN en AV que a su vez puede ser degradado en otros productos como el GY y el ácido protocatecoico (Fleige y col., 2016). Finalmente, ambos pueden ser incorporados a la ruta de los *β* ceto adipatos por la ruptura de la estructura cíclica y ser incorporados como succinato y acetil CoA en ciclo de Krebs para la supervivencia de la célula al igual que en otros organismos similares como *Corynebacterium glutamicum* (Okai y col., 2017).
Amycolatopsis sp. ATCC 39116 expresa una enzima responsable de la degradación de VAN a AV como mecanismo de desintoxicación de la célula, denominada vainillina deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.67), codificada por el gen *vdh* (Fleige y col., 2013). Esta enzima, cataliza la reacción de degradación en un paso de hidratación, dependiente de NAD^+, que es utilizado como coenzima en la reacción. Sin embargo, en el estudio realizado por Fleige y col. (2013), la deleción del gen *vdh* no impidió la producción de AV, llevando a concluir que la ruta de la desacetilación no oxidativa no es la única ruta que cataboliza el AF. Esto concuerda con estudios en otros organismos, como *Pseudomonas putida*, donde se observó un efecto similar al realizar la deleción del gen *vdh* durante los intentos de generar una mutante para incrementar la producción de VAN, sugiriendo también los autores, la existencia de una ruta metabólica alterna que permite la producción de AV, sin la VAN como intermediario (Graf y Altenbuchner, 2014). Esta hipótesis fue corroborada más adelante por Meyer y col. (2019) que, en su estudio de proteómica, identificaron los genes y las enzimas involucradas en la *β*-oxidación.

2.5.3. *β*-Oxidación del Ácido ´Ferúlico

La *β*-oxidación es un mecanismo que poseen los organismos eucariotas y procariotas para degradar los ácidos grasos, pudiendo degradar también moléculas activas de acetilo, que pueden ser incorporadas en el ciclo del ácido cítrico (Berg y col., 2002). Se ha descrito que una gran variedad

de hongos degradadores de la lignina, poseen la *β*-oxidación con ligeras modificaciones, tal es el caso de *Aspergilius niger* CGMC 0774 que puede transformar el AF en AV, a través de esta ruta (Zheng y col., 2007). Otros estudios mencionan que bacterias gran positivas también poseen esta ruta, tales como *Corynebacterium glutamicum* (Kasai y col., 2012). Esta bacteria puede utilizar una variedad de compuestos fenólicos como fuente de carbono y metabolizarlos por la ruta de los fenil-propanoides, en la cual, está incluida la *β*-oxidación de compuestos fenólicos como el AF (Fleige y col., 2016; Kallscheuer y col., 2016).

En células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, la *β*-oxidación es una vía, dependiente de CoA, que tiene la finalidad de metabolizar el AF en vainillínico, previa formación del intermediario Feruloil-CoA, en tres pasos de reacción. Una hidratación donde se forma el intermediario 4-hidroxi-3-metoxihidroxipropionil-CoA, posteriormente una deshidrogenación donde se transforma a 4-hidroxi-3-metoxifenil-*β*-cetopropionil-CoA y finalmente una deshidratación donde se transforma en vainillil-CoA. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas putativas enoil-CoA hidratasa (WP_20415680.1), HMPHP-CoA deshidrogenasa (WP_020417149.1) y HMPKP-CoA deshidratasa (WP_20416159.1) respectivamente. Finalmente, la vainillil-CoA se transforma en AV en una reacción espontánea como se muestra en la figura 2 (Meyer y col., 2018). En esta serie de reacciones se ha identificado que se libera una molécula de acetil-CoA en la reacción de deshidratación y un tio-éster de CoA en la reacción espontánea que forma el AV.

Meyer y col. (2018) encontraron que la *β*-oxidación en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 es una vía metabólica activa al igual que la desacetilación no oxidativa del AF en cultivos sumergidos. Por otro lado, (Asaff Torres y col., 2009) en la patente mexicana MX 2008 012689 A, describen un sistema de cultivo en superficie de células inmovilizadas, donde obtuvieron altos rendimientos molares de VAN (>70%) y cantidades muy bajas de AV (<2%) Estos resultados sugieren que, en cultivos en superficie, el catabolismo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 es modulado para mantener activa mayoritariamente la ruta de la desacetilación no oxidativa.

2.6. Regulación de las Rutas Catabólicas en *Amycolatopsis* Sp. ATCC 39116

Para comprender mejor la regulación del catabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116,

en los siguientes apartados se detalla la regulación transcripcional, enzimática y la influencia del estado energético celular en la regulación metabólica.

2.6.1. Regulación Transcripcional

En actinomicetos los genes que codifican para muchos de los metabolitos secundarios, están organizados en clústeres y operones que son regulados por diferentes factores de transcripción en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y metabólicas de la célula (Hwang y col., 2014). La inducción de genes que codifican para enzimas que son capaces de degradar componentes lignocelulósicos, como los ácidos hidroxicinámicos, está dada en respuesta a condiciones de estrés (Kirby, 2005). En cultivo sumergido de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, la biotransformación del AF y de otros ácidos hidroxicinámicos induce la expresión de enzimas relacionadas con la *β*-oxidación (Achterholt y col., 2000; Contreras-Jácquez y col., 2020; Kallscheuer y col., 2016). Por esta razón, es importante evaluar los posibles mecanismos de regulación de las células para la transcripción de los RNA mensajeros que codifican para las enzimas involucradas en la producción de VAN.

En *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 el codón de iniciación del gen *fcs* está traslapado con el codón de iniciación de *ech*, esto indica que el control de la transcripción de estos genes está dado por el mismo promotor (Fleige y col., 2013). Se ha visto un comportamiento similar en otros organismos como *Pseudomonas* sp. y *Rhodiococcus* sp., donde al igual que en *Amycolatopsis* sp., los genes involucrados en la síntesis de VAN son *fcs* y *ech* (Plaggenborg y col., 2006). Algunos reportes en otros organismos, como *Pseudomonas fluorecens* y *Corinebacterium glutamicum*, se describe que *fcs* y *ech* son genes inducibles por feruloil-CoA, un intermediario del catabolismo del AF (Barghini y col., 1998; Chen y col., 2017). Asimismo, estos genes están regulados por proteínas del tipo de reguladores de resistencia a antibióticos múltiples (MarR por sus siglas en inglés). Así también, la regulación transcripcional sobre la ruta de la *β*-oxidación en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 podría estar asociada a la familia de reguladores transcripcionales MarR. Si bien no se ha determinado que esta familia regule la ruta de la *β*-oxidación, en otros microorganismos como *Pseudomonas fluorecens*, el AF y otros ácidos hidroxicinámicos están involucrados en la regulación de esta ruta (Calisti y col., 2008).

No se conoce el mecanismo de regulación que ejercen los ácidos hidroxicinámicos en reguladores del tipo MarR en la *β*-oxidación. Sin embargo, Grove, (2013) describen que los grupos peróxido producidos por las especies reactivas de oxígeno, podrían interaccionar con proteínas MarR y provocar cambios en la estructura que reduzcan la afinidad de este regulador para reprimir la síntesis de enzimas involucradas en la *β*-oxidación. Esto concuerda con lo descrito por (Contreras-Jácquez y col., 2020), quienes encontraron efectos diferenciales de inducción de los ácidos hidroxicinámicos en cultivo de superficie y cultivo sumergido. Este efecto es atribuido a que los ácidos hidroxicinámicos, conjuntamente a moléculas formadas por estrés oxidativo podrían estar interaccionando con reguladores tipo MarR, permitiendo que la transcripción de enzimas involucradas en la *β*-oxidación. Este hecho podría explicar los altos rendimientos de VAN obtenidos por (Asaff Torres y col., 2009), durante varios ciclos de biotransformación, mediante el uso de un sistema de superficie, con *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 inmovilizada en una matriz de poliuretano.

2.6.2. Regulación Enzimática

La regulación enzimática puede estar influenciada por los factores extrínsecos a la célula como el pH, la temperatura y la aireación y las características intrínsecas de las enzimas del catabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. como: la disponibilidad de sustrato, concentración de enzima, concentración de cofactores y coenzimas, así como por la regulación por retroalimentación y los posibles inhibidores o activadores.

Uno de los factores de regulación de las enzimas involucradas con el catabolismo del AF puede estar asociado al transporte de compuestos aromáticos dentro y fuera de las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. Se ha estudiado que el transporte de ácidos aromáticos en actinomicetos ocurre por transporte pasivo cuando la concentración es alta (Nichols y Harwood, 1997). Sin embargo, en algunos actinomicetos el transporte de estos ácidos esta mediado también por transporte activo. Algunos ejemplos de transporte activo en organismos como *Pseudomonas putida* y *Corynebacterium glutamicum* en los cuales, el transporte mayoritariamente está mediado por transportadores de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS por sus siglas en inglés).

Dentro de estos, la sub familia de transportadores simporte de ácidos aromáticos H^+ (AAHS por sus siglas en inglés), es la responsable del transporte activo de este tipo de moléculas dentro y fuera de la célula (Hwang y col., 2014). En ese sentido Ma y Daugulis (2014) mostraron que la concentración de sustrato en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 no tiene una relación directa en la producción de VAN, lo cual sugiere que alguna de las enzimas podría estar regulada por el exceso del sustrato o de algún producto de degradación posterior.

El pH es uno de los factores más importantes en la actividad enzimática que puede favorecer o reducir la actividad catalítica de las enzimas. En *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo del AF se han caracterizado parcialmente, tal es el caso de la vainillina deshidrogenasa a partir de una recombinante, encontrando que el pH=8 es el óptimo de esta enzima (Fleige y col., 2013). Asimismo, se estudió el efecto del pH sobre la actividad de la feruloil-CoA sintetasa de *Amycolatopsis* HR167 y se encontró que el pH con la mayor eficiencia catalítica es de 7, decreciendo a medida que incrementa el pH (Achterholt y col., 2000). Esto sugiere que el pH alcalino de 8 podría favorecer la degradación de la VAN; a pesar de ello, se conoce que las células poseen múltiples mecanismos de regulación del pH para mantener un estado de homeostasis y así favorecer el catabolismo de los compuestos que son más tóxicos para la célula (Krulwich y col., 2011).

La aireación también es un factor importante, *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en condiciones de aerobiosis durante el catabolismo de ácidos hidroxicinámicos, incluido el del AF, mantiene un elevado estado energético celular en comparación con procesos con menor disponibilidad de oxígeno como los cultivos sumergidos (Contreras-Jácquez y col., 2020). La molécula energética principal en los sistemas biológicos es el adenosin-5-trifosfato (ATP), esta posee enlaces de alto nivel energético, que son esenciales para los procesos biológicos. Asimismo, sirve de cofactor enzimático para la actividad catalítica de la feruloil CoA sintetasa, enzima que propicia la primera reacción del catabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

Se conoce muy poco acerca de las características intrínsecas de las enzimas dentro de estas rutas metabólicas, pero dentro del catabolismo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, la Feruloil CoA sintetasa es clave, porque cataliza la transformación del AF en feruloil-CoA. Es importante mencionar que se ha reportado que la feruloil CoA es el inductor de los genes *fcs* y *ech* en otros organismos, como *Rhodococcus* sp. (Plaggenborg y col., 2003). Este hecho concuerda con lo encontrado por (Meyer y col., 2018), quienes destacan un incremento en la cantidad de enzimas

feruloil CoA sintetasa de células de *Amycolatopsis* en estado estacionario alimentadas con AF. La reacción enzimática de la ferúloil CoA sintetasa es dependiente de ATP y coenzima A, siendo esta la enzima con mayor requerimiento energético (Achterholt y col., 2000).

La regulación de muchas de estas enzimas está mediada por la disponibilidad y regeneración de coenzimas y cofactores enzimáticos (Schmid y col., 2001). Por un lado, la feruloil-CoA sintetasa es una enzima que utiliza ATP y Mg^{2+} como cofactores y además es dependiente de un tio-éster de coenzima A. El ATP es un compuesto altamente energético que puede ser generado por muchas de las vías metabólicas, siendo las principales la glucólisis y la cadena de transporte de electrones (Akram, 2014; Mallinson y col., 2018). Por su parte, el Mg^{2+} es un cofactor esencial que podría estar involucrado en la modificación electrostática de la feruloil-CoA sintetasa que cambia la afinidad del sitio activo para la catálisis (Cavarelli y col., 1994). Asimismo, la coenzima A participa en una reacción de bioconversión de AF en feruloil-CoA, catalizada por la enzima feruloil-CoA sintetasa.

El tio-éster de Coenzima A (SH-CoA) participa como un sustrato, que por acción enzimática se une con el AF desplazando una molécula de hidroxilo para formar una molécula de feruloil-CoA (Zenk y col., 1980). Los tio-ésteres de coenzima A son sintetizados a partir del precursor pantotenato (vitamina B5) el cual proviene, en algunos actinomicetos como *Corinebacteium glutamicum*, de aminoácidos como el aspartato y la valina (Leonardi y Jackowski, 2007). Otro de los compuestos que está involucrado, tanto en la oxidación de la VAN, como en la *β*-oxidación, es el nicotin diaminafosfato NAD^+, que es sintetizado en bacterias a partir del ácido aspártico y la dihidroxiacetona fosfato (Magni y col., 1999). Gracias a su potencial oxidante y mediante las enzimas deshidrogenasas, como la vainillina deshidrogenasa y la acil CoA deshidrogenasa, permite la oxidación de la VAN y de la 4-hidroxi-3-metoxi-fenilhidroxipropionil-CoA, reduciéndose a NADH (Meyer y col., 2018). Este compuesto a su vez es considerado poder reductor para la producción de ATP, lo cual muestra que interviene en procesos de producción de energía y por ende en el estado energético celular.

2.6.3. Influencia del Estado Energético Celular en la Regulación Metabólica.

El estado energético de las actinobacterias depende en gran medida del estadio de crecimiento que a su vez es función de la disponibilidad de nutrientes y la relación carbono/nitrógeno en el medio (Baltz y col., 2010). El metabolismo de crecimiento es característico por tener una relación carbono/nitrógeno entre 15:1 a 20:1 (Dutta, 2008). En esta etapa, las células se encargan del crecimiento, división y mantenimiento celular (Shuler y Kargi, 1992), construyendo macromoléculas que son intermediarias en las reacciones que generan energía como el ATP, coenzimas y vitaminas como la coenzima A (CoA) y NAD^+, que coadyuvan a las enzimas para llevar a cabo la formación de metabolitos secundarios (Rodrigues Alves, 1997).

En un proceso de biotransformación, la producción de dichas moléculas es muy importante, porque las enzimas que llevan a cabo la bioconversión del sustrato utilizan estas moléculas como cofactores y coenzimas. En ese sentido, se ha descrito que el catabolismo del AF en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, utiliza como cofactores de las enzimas feruloil-CoA sintetasa y enoil CoA hidratasa/aldolasa al ATP y la Coenzima A, además de NAD^+/NADH en enzimas deshidrogenasas como la vainillina deshidrogenasa y la Acil CoA deshidrogenasa involucrada en la β-oxidación (Meyer y col., 2018).

Una limitante de los procesos de biotransformación de ácidos hidroxicinámicos por células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en cultivos sumergidos es el mantenimiento del estado energético celular. En el estudio de Contreras-Jácquez y col. (2020) se menciona que existen diferencias en el estado energético celular inicial y final (0 y 24 h, respectivamente) de acuerdo con el sistema de biotransformación utilizado. Mientras que en sistema de superficie el estado energético permanece más o menos constante, en un sistema sumergido existe una disminución del 68% del ATP intracelular, probablemente debido una baja disponibilidad de oxígeno. Una particularidad de los cultivos sumergidos es la baja tasa de transferencia de oxígeno debido a la limitada solubilidad de los gases en líquidos (Felix y col., 2010). De acuerdo con Davies y Demain (1999), la baja disponibilidad de oxígeno causa efectos negativos en los flujos energéticos de microorganismos aerobios, disminuyendo la eficiencia de los procesos metabólicos centrales, como la glucólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y el transporte de electrones, impactando directamente en la síntesis de ATP.

2.7. Sistemas Celulares de Biotransformación

2.7.1. Estudios Previos sobre el Efecto ee las Fuentes de Carbono y Nitrógeno en la Biotransformación del AF

Ma y Daugulis (2014), utilizando un sistema de células viables en cultivo sumergido, con alimentación de sustrato en el estado estacionario, evaluaron el efecto de los niveles de extracto de levadura y glucosa durante la fase de crecimiento y su relación en la biotransformación de AF. Encontraron que a una concentración de 10 g/L de glucosa mejora la tasa de crecimiento de las células, además incrementa el rendimiento molar de obtención de VAN. De igual manera, observaron un efecto similar con la adición de fuentes de nitrógeno, como el extracto de levadura, encontrando que a una concentración inicial de 8 g/L, se obtuvo una mayor concentración de VAN. Por otro lado, en la patente americana de Zheng y col. (2019) se describe el efecto de diferentes azúcares (glucosa, xilosa, maltosa, fructosa y almidón soluble) en el crecimiento de las células de *Amycolatopsis* sp. zhp06, para posteriormente ser aplicadas en un sistema de biotransformación de AF en VAN utilizando células en reposo. Los autores encontraron un mayor rendimiento molar (58.2%) cuando se utilizó fructosa como fuente de carbono en el medio de crecimiento; alcanzando 5.48 g/L de VAN a partir de 12 g/L de AF. Por otro lado, en la misma patente al aplicar glucosa al medio de crecimiento, en tres ciclos continuos de biotransformación obtuvieron concentraciones de VAN de 3.51, 3.82, 7.97 g/L, respectivamente a partir de 16 g/L de AF que corresponden al 28, 30 y 64 % de los rendimientos molares obtenidos.

Así también, se ha descrito que la regeneración de cofactores en células metabólicamente activas, como los sistemas de células en reposo, es generalmente menos cara y más sencilla. (Schmid y col., 2001). Dentro de ese contexto algunos autores sugieren que el adicionar de pequeñas cantidades de glucosa u otras fuentes de energía ayuda a mantener el potencial electroquímico a través, de la membrana celular y la viabilidad de las células en reposo. Asimismo, si el paso de biotransformación requiere la regeneración de coenzimas, el agregar co-metabolitos, como glucosa o glicerol, en cantidades suficientes puede resultar favorable al proceso de biotransformación (Schrewe y col., 2013).

Si bien se ha estudiado el efecto de fuentes de carbono en el medio de crecimiento de células de *Amycolatopsis* sp. que posteriormente se utilizaron en un proceso de biotransformación de AF en VAN, no se ha examinado cual podría ser el efecto de adicionar fuentes de carbono o nitrógeno como co-sustratos junto con el AF al inicio de la biotransformación. Aunque diversos autores recomiendan agregar glucosa para mejorar la biotransformación del AF en cultivo sumergido (Fleige y col., 2016; Ma y Daugulis, 2014; Waldmann y Drauz, 2002), aún no se tiene un estudio que evalué el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de coenzimas o cofactores y su efecto sobre la biotransformación. Tampoco se ha evaluado si la regeneración de cofactores y coenzimas en estos sistemas podrían influir en los rendimientos molares de obtención de VAN durante ciclos continuos de biotransformación y si las células se mantienen metabólicamente activas. Todos estos aspectos son los que fueron abordados en el presente trabajo de tesis.

2.8. Consideraciones de Mercado

El mercado mundial de vainilla y la vainillina (VAN), en el 2018 alcanzó las 8,196 y 37,286 t respectivamente, impulsado principalmente por las industrias alimentaria farmacéutica y cosmética. Se estima que para el 2024, la demanda de vainilla y VAN aumente, a 9,433 y 59,458 t respectivamente (FAOSTAT, 2018; Group, 2020). Debido a las megatendencias de mercado, cada vez más, las grandes compañías de alimentos se han visto en la necesidad de sustituir en sus productos la VAN de síntesis química por extractos de vainilla. Sin embargo, una de las limitantes para este propósito es la diferencia de costos (Ciriminna y col., 2019) ya que, mientras el precio de las vainas de vainilla es aproximadamente de 540 $uS/Kg (con un contenido aproximado del 2% de VAN), el de la VAN de síntesis química oscila alrededor de los 10 $uS/Kg (Jeff, 2018).

En ese contexto, la VAN obtenida por vía biotecnológica aparece como una opción muy interesante puesto que es considerada “idéntica a la natural” cuando el sustrato proviene de fuentes naturales y renovables (Fleige y col., 2013) y su costo oscila entre los 550-650 $uS/Kg, que aunque mucho más cara que la VAN sintética, resulta sustancialmente más barata que la que pudiera obtenerse de las vainas de vainilla o sus extractos.

La VAN biotecnológica, por su naturaleza, puede ser rotulada como “vainilla natural” de acuerdo con algunas normas internacionales de etiquetado (Bomgardner, 2016). Por ejemplo, de acuerdo con las normas de la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) que definen sabor natural o saborizante natural como: “El aceite esencial, oleorresina, esencia o extracto, hidrolizado de proteínas, destilado o cualquier producto de tostado, calentamiento o enzimólisis, que contiene los constituyentes saborizantes derivados de una especia, fruta o jugo de fruta, verdura o jugo de vegetales, levadura comestible, hierba, corteza, brote, raíz, hoja o material vegetal similar, carne, mariscos, aves, huevos, productos lácteos o productos de fermentación de los mismos, cuya función significativa en los alimentos es aromatizante más que nutricional” (Bomgardner, 2016).

Asimismo, la regulación Europea ha denominado “natural” a los sabores y fragancias “obtenidas por procesos físicos, enzimáticos o microbiológicos apropiados a partir de material de origen vegetal, animal o microbiológico en estado natural” (European Parliament, 2008). En ese sentido, la VAN biotecnológica ha ganado gran relevancia dentro de las últimas décadas (Gallage y Møller, 2015), por lo cual, el estudio planteado en el presente trabajo de tesis sobre el uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como co-sustratos del AF durante su biotranformación en VAN, buscando incrementar los rendimientos de producción, así como el uso de las células en varios ciclos de biotransformación, cobra particular importancia.

3. HIPÓTESIS

El manejo de fuentes de carbono y nitrógeno durante el catabolismo del ácido ferúlico en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, promueve la regeneración de cofactores requeridos por las enzimas implicadas en su bioconversión a vainillina, permitiendo incrementar el rendimiento y la producción de vainillina durante varios ciclos de biotransformación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de fuentes de carbono y nitrógeno, durante el catabolismo del ácido ferúlico en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, sobre la regeneración de cofactores requeridos por las enzimas implicadas en la biotransformación del ácido ferúlico en vainillina, los rendimientos del proceso y el uso de las células en reposo durante varios ciclos de biotransformación.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de fuentes de carbono y nitrógeno como co-sustratos del ácido ferúlico, sobre la producción de vainillina VAN en cultivo sumergido de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.
- Examinar las diferencias en la actividad enzimática (Feruloil-CoA sintetasa y vainillina deshidrogenasa) por efecto de la adición de fuentes de carbono y nitrógeno.
- Determinar el estado energético celular (ATP) del catabolismo del ácido ferúlico en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en cultivo sumergido.
- Evaluar la producción de vainillina en dos ciclos de biotransformación bajo la adición de nutrientes que incrementan el estado energético de *Amycolatopsis* ATCC 39116.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación del Inóculo

La cepa de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 fue sembrada en placas de agar ISP2 (4 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta y 20 g/L de agar bacteriológico) y se incubaron a 37 ºC por 72 h. Posteriormente, un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 180 mL de un medio mínimo enriquecido con sales (10 g/L glucosa, 4 g/L de extracto de levadura, 4 g/L de Na_2HPO_4, 1 g/L de KH_2PO_4 L, 0.2 g/L de $MgSO_4$. $7H_2O$, 0.2 g/L de NaCl y 0.05 g/L de $CaCl_2$) fue inoculado con cuatro asadas llenas de biomasa de colonias aisladas. El matraz fue incubado en un agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova 44) a 37 ºC y 180 rpm durante 24 h.

5.2. Obtención de Células Completas de *Amycolatopsis* Sp. ATCC 39116 por Cultivo Sumergido

Matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 30 mL del medio mínimo enriquecido con sales (10 g/L glucosa, 4 g/L de extracto de levadura, 4 g/L de Na_2HPO_4, 1 g/L de KH_2PO_4 L, 0.2 g/L de $MgSO_4$*$7H_2O$, 0.2 g/L de NaCl y 0.05 g/L de $CaCl_2$) fueron inoculados con 3 mL del inóculo y fueron incubados en un agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova 44) a 37 ºC por un periodo de 40 h a 180 rpm. Los 30 mL del cultivo sumergido de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 fueron transferidos a tubos Falcón de 50 y centrifugados a 10,000 rpm a 4 ºC durante 20 min (Centrifuga Allegra 64R). Las células separadas fueron lavadas 2 veces con buffer de fosfatos (10 mM) y fueron centrifugadas bajo las condiciones previamente descritas.

5.3. Efecto de las Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Catabolismo del AF.

Las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 (4.03 mg) fueron resuspendidas en 30 mL de buffer de fosfatos 100 mM (pH 8) conteniendo 25.75 mM de AF y 2 g/L de cuatro fuentes de carbono (glucosa, maltosa, fructosa o xilosa) o cuatro fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona de caseína, nitrato de sodio o urea). Como control, las células se resuspendieron únicamente en 30 mL de una solución de 25.75 mM de AF en un buffer de fosfatos 100 mM (pH 8). Después, las suspensiones de células fueron nuevamente colocadas en los matraces Erlenmeyer de 125 mL e incubadas a 37 ºC, 180 rpm durante 24 h.

Posteriormente, se seleccionaron únicamente los tratamientos adicionados con glucosa, maltosa, extracto de levadura o peptona de caseína para un análisis exhaustivo del comportamiento cinético del catabolismo del AF de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 bajo la metodología previamente descrita. Como condición control, se evaluó el efecto individual del AF sin la adición de fuentes de carbono y nitrógeno. Además, se incluyó un segundo control denominado "sistema de medio agotado (SMA)", en el cual, se añadieron 3 mL de una solución concentrada de AF directamente en el cultivo sumergido de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 después de las 40 h de incubación.

Los sistemas de biotransformación fueron incubados a 37 ºC y 180 rpm durante 30 h tomando consecutivamente tres matraces (considerados como unidades experimentales independientes) cada 5 h para cada condición evaluada. Las muestras fueron almacenadas a -20 ºC para la cuantificación de AF y productos catabólicos mediante HPLC.

5.4. Producción de VAN en Ciclos Semicontinuos de Operación

Se realizaron dos ciclos semicontinuos de síntesis de VAN; 4.0 mg de biomasa de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 fue resuspendido en 30 mL (pH 8, buffer de fosfatos 100 mM) de AF 25.75 mM (pH 8), sólo (control) o suplementado con las fuentes de carbono y nitrógeno previamente descritas. Las suspensiones de células fueron nuevamente colocadas en matraces Erlenmeyer de 125 mL y fueron incubados a 37 ºC y 180 rpm durante 24 h. Posteriormente, las células fueron recuperadas

por centrifugación y lavadas dos veces con buffer de fosfatos (10 mM) a 4500 rpm a 4 ºC durante 20 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en una solución nueva de 25.75 mM (pH 8, buffer de fosfatos 100 mM) de AF, sólo (control) o suplementado con las fuentes de carbono y nitrógeno. En ambos ciclos de síntesis se tomaron muestras y fueron almacenados a -20 ºC para la cuantificación de AF y productos catabólicos mediante HPLC.

5.5. Determinaciones Analíticas

5.5.1. Cuantificación de ATP Intracelular

Para la cuantificación de ATP, la biomasa de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 se cosechó mediante centrifugación (4500 rpm a 4 ºC durante 20 min) a las 0 y 24 h de la biotransformación del AF sólo (control) o suplementado con las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Posteriormente, se hicieron dos lavados sucesivos de la biomasa recuperada con 20 mL buffer de fosfatos 10 mM (pH 7.0) y las células fueron lisadas mediante sonicación con una amplitud del 30% en ciclos cortos de encendido/apagado de 1 min por un tiempo total de exposición de 5 min. Los restos de membrana celular fueron removidos mediante centrifugación y las proteínas intracelulares fueron separadas del sobrenadante mediante filtración con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa (Merck Millipore). El rechazo fue almacenado a 4 ºC para posteriores ensayos de actividad enzimática, mientras que, el permeado resultante fue empleado para cuantificar el contenido intracelular de ATP mediante un kit comercial colorimétrico (Sigma MAK190). Para cada condición evaluada, la concentración de ATP (µmol) se normalizó con respecto el contenido de proteína (mg) del extracto crudo intracelular, medido por el método de Bradford (Bradford, 1979) usando seroalbúmina bovina como estándar.

5.5.2. Determinación De Actividad Enzimática Del Extracto Intracelular

La fracción de rechazo (> 10 kDa) obtenida anteriormente en la sección 5.5.1, fue empleada como extracto intracelular para evaluar el efecto de la suplementación de fuentes de carbono y nitrógeno sobre la actividad feruloil-CoA sintetasa y vainillina deshidrogenasa. La actividad feruiloil-CoA se cuantificó de acuerdo con la metodología propuesta por Yang y col., (2013) con algunas modificaciones. En una microplaca de 96 pozos, se añadieron 100 µL del extracto intracelular a 100 µL de buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.0) que contenía una concentración de 0.25 mM de AF, 2 mM de ATP, 2.5 mM de $MgCl_2$. $6H_2O$ y 0.4 mM de coenzima A. La mezcla de reacción se incubó a 30 ºC durante 30 minutos, monitoreando la formación de feruloil-CoA a 346 nm cada 5 minutos en un lector de microplaca Epoch 2 (Biotek). La actividad feruloil-CoA sintetasa se determinó mediante la velocidad inicial de la reacción con un coeficiente de extinción molar de la feruloil-CoA de 10 cm^2/µmol reportado previamente por Zenk y col. (1980).

Por otra parte, la actividad vainillina deshidrogenasa se determinó añadiendo 100 µL del extracto intracelular a 100 µL de buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.0) que contenía una concentración de 0.25 mM de VAN, 2 mM de DTT y 0.2 mM de NAD^+. La mezcla de reacción se incubó a 30 ºC durante 30 minutos, monitoreando la disminución en la concentración de VAN a 340 nm cada 5 minutos en un lector de microplaca Epoch 2 (Biotek). La actividad vainillina deshidrogenasa se determinó mediante la velocidad inicial de la reacción empleando un coeficiente de extinción molar de VAN de 11.492 cm^2/µmol reportado previamente por Fleige y col., (2013).

Para ambos ensayos se analizó un control en el cual se sustituyeron los 100 µL del extracto intracelular por 100 µL de agua destilada. La actividad para ambas enzimas se reportó como U/mg de proteína, por lo que, una unidad se define como la cantidad de enzima que produce o convierte 1 µmol de feruloil-CoA o VAN por minuto. La concentración de proteína del extracto intracelular se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1979) usando seroalbúmina bovina como estándar.

5.5.3. Determinación de Biomasa

La biomasa se determinó por el método gravimétrico reportado por Contreras-Jácquez y col., (2020) y Baqueiro-Peña y col. (2010). 30 mL del cultivo sumergido de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 se centrifugaron a 4500 rpm a 4 ºC durante 20 minutos (Centrífuga Allegra 64R) y la biomasa resultante se lavó dos veces con buffer de fosfatos (10 mM) y se secó a 80 ºC durante 48 h en una estufa Yamato DX 402.

5.5.4. Cuantificación de AF y Productos del Catabolismo

Las muestras se diluyeron 10 veces con etanol al 96% (v/v) y fueron centrifugadas a 4500 rpm a 4 ºC durante 15 min (Centrifuga Eppendorf 5417R). Posteriormente, las muestras se filtraron a través de membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 µm de poro. La cuantificación del AF, VAN, AV y GY se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Varian 920-LC equipado con una columna Phenomenex ODS-2 (4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y un detector de arreglo de diodos (280 y 320 nm). La elución de los compuestos se realizó de acuerdo con el método reportado previamente por Contreras-Jácquez y col. (2020) con un flujo no isocrático. Durante los primeros 12 minutos, la fase móvil fue acetonitrilo: agua: ácido trifluoracético (20:80:0.001 v) con un flujo de 1 mL/min y a 35°C. A partir del minuto 12 se cambió de fase a acetonitrilo: agua: ácido trifluoracético (40:60:0.001) con un flujo de 1 mL/min a 35°C.

5.6. Parámetros Cinéticos de Biotransformación

El rendimiento molar de VAN fue expresado como se muestra en la Ecuación 1 donde P_0 indica la concentración molar inicial de VAN, P la concentración molar máxima alcanzada, S_0 es la concentración molar inicial de AF y S la concentración molar final.

(Ecuación 1)……..$\%Rendimiento = \frac{p-p_0}{S_0-S} * 100$

Por otra parte, la producción específica se calculó a partir de la ecuación 2 donde P es la producción máxima alcanzada del producto catabólico y Wb es la concentración de biomasa en mg/ml.

(Ecuación 2)…….$Producción\ específica = \frac{P}{W_b}$

Así también, la productividad se calculó a partir de la ecuación 3, donde *Productividad* es la productividad máxima alcanzada del producto catabólico y *t* es el tiempo.

(Ecuación 3)……..$Productividad = \frac{P}{t}$

Finalmente, el *Consumo* de AF se determinó con la ecuación 4, donde S_0 es la concentración molar inicial de AF y S la concentración molar final.

(Ecuación 4)……$Consumo = \frac{S_o-S}{S_o} * 100$

5.7. Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron con al menos dos réplicas biológicas y tres repeticiones, considerando cada matraz Erlenmeyer como una unidad experimental independiente. Los resultados se reportan como la media ± desviación estándar y para establecer las diferencias

estadísticas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de diferencias de medias de Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 95%. El análisis se llevó a cabo en el paquete estadístico NCSS versión 7.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Efecto de Fuentes de Carbono y Nitrógeno sobre la Producción de VAN en Cultivo Sumergido

6.1.1. Efecto de las Fuentes de Carbono

La figura 3, describe el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono, como co-sustratos, sobre la biotransformación del AF en cultivo sumergido.

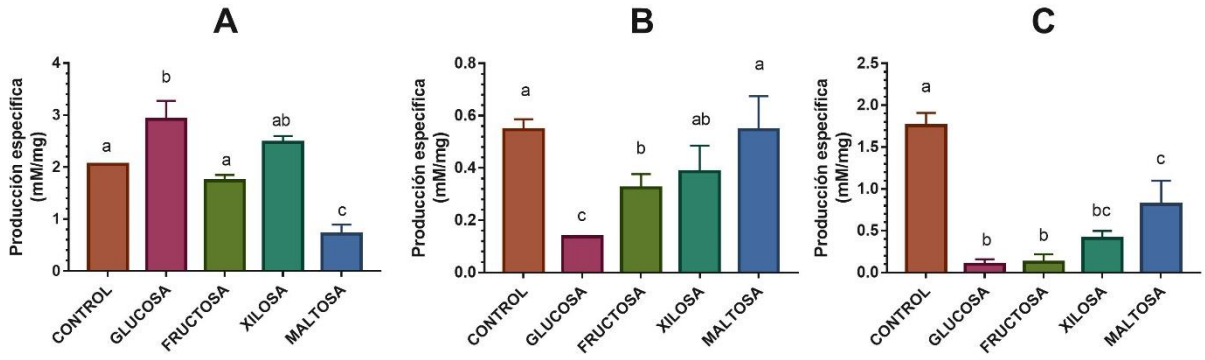


Figura 3. Ensayos de biotransformación de AF durante 24 h con células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, usando diferentes fuentes de carbono para la regeneración de cofactores enzimáticos. Producción molar específica de: A) VAN; B) AV y C) GY. Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p<0.05$).

En cuanto a la producción de VAN, al cabo de 24 h de biotransformación (Fig. 3A), en el control se alcanzó una producción específica de 2.05 mM VA/mg de biomasa, que resultó estadísticamente similar a la alcanzada con la adición de fructosa o xilosa. En el caso del medio de biotransformación adicionado con glucosa, se observó un incremento del 42% en la producción ($p<0.05$), mientras que la adición de maltosa tuvo un efecto contrario, provocando una disminución de 160% ($p<0.05$).

Con relación a la formación de otros subproductos del catabolismo, como el AV (Fig. 3B), se observa que la adición de xilosa o maltosa no tuvo ningún efecto sobre la producción en comparación con el control. Sin embargo, la adición de glucosa provocó su disminución en un 397%, mientras que la fructosa en un 75% ($p<0.05$).

Por su parte, en el caso de la producción de GY (Fig. 3C), la adición de cualquiera de los azúcares tuvo un efecto negativo, aunque en diferente grado. La glucosa, fructosa o xilosa provocaron una disminución de alrededor del 500% con relación al control, mientras que la maltosa del 125% ($p<0.05$). Por otro lado, no se encontró efecto sobre la cantidad de biomasa por ninguno de los azúcares empleados como co-sustratos para la biotransformación del AF. El efecto inverso entre el incremento de la producción de VAN y el decremento en la formación de otros subproductos, particularmente AV, también fue reportado por otros autores y es atribuido al direccionamiento preferencial de los flujos de carbono por la ruta catabólica de la desacetilación no oxidativa para la formación de VAN, evitando o reduciendo el flujo por la vía de la β-oxidación que conduce a la formación directa de AV o a la aceleración de la degradación de VAN a AV y luego a GY (Contreras-Jacquez y col., 2020).

El efecto positivo del uso de glucosa como co-sustrato del AF durante su biotransformación a VAN podría deberse a una mayor producción de ATP, requerido para el primer paso de la biotransformación, que se inicia con la formación de feruloil-CoA, dependiente de ATP.

Se ha descrito que el catabolismo de la glucosa en actinomicetos es mediado por la ruta Embded Meyerhof (EM) en la que se obtienen 2 moléculas de ATP por cada mol de glucosa. En otras actinobacterias, como *Streptomyces coelicolor*, la glucosa inhibe la producción de metabolitos secundarios mediante la represión de reguladores de transcripción bldD, bldM, bldN (Gubbens y col., 2012). Esto indica que los flujos de carbono se redireccionan al catabolismo de la glucosa para la producción de energía relacionada con el mantenimiento celular y que a su vez podría ser usada para la biotransformación del AF en VAN.

Otro de los factores que influye en el metabolismo de carbohidratos es su transporte hacia el interior de las células. Una ventaja de los actinomicetos es que poseen transportadores específicos de glucosa que no requieren de energía (Nichols y Harwood, 1997). El sistema de transporte de glucosa, que se ha descrito en *Streptomyces coelicolor* A3, es a través de la superfamilia de facilitadores principales (MFS por sus siglas en inglés) que no es dependiente de ATP. Se ha demostrado que estos transportadores son fuertemente inducibles por glucosa (Van Wezel y col.,

2005). La rapidez y facilidad del transporte de la glucosa dentro las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, facilitaría el catabolismo de este carbohidrato. Esto puede explicar, porque se obtuvieron los valores más altos de producción de VAN con la adición de glucosa a diferencia la fructosa, xilosa o maltosa (Fig. 3A). De igual manera, la disminución en la formación de AV y GY por la adición de glucosa (Figs. 3B y 3C, respectivamente), podría estar asociada con el restablecimiento energético, ya que, las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, al obtener energía por el metabolismo de la glucosa, no requerirían catabolizar la VAN para su mantenimiento y otras funciones celulares.

En el caso de la adición de los otros azúcares y su efecto nulo (fructosa o xilosa) o efecto negativo en la producción de VAN (maltosa), podría también explicarse por el balance energético de su metabolismo y los mecanismos de transporte. En el caso de la fructosa, su transporte está mediado por el sistema fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) y está regulado por el factor HPr, que interactúa con diferentes proteínas para realizar el transporte (Bertram y col., 2004). Este es impulsado por la fosforilación de la enzima I perteneciente al complejo PTS, que utiliza como sustrato al fosfoenolpiruvato (Parche y col., 2000), que es un intermediario de la vía de la glucólisis, y posee un enlace altamente energético que es transformado en piruvato y ATP por la acción catalítica de la piruvato quinasa. En síntesis, el transporte de fructosa utiliza una molécula energéticamente equivalente a un ATP, por lo que es considerado transporte activo; es decir, a diferencia del transporte de la glucosa, la célula gasta energía para ingresarla (Nothaft y col., 2003). Si bien este azúcar aporta energía a la célula, esta es menor comparada con el aporte de una molécula de glucosa y probablemente no es suficiente para el mantenimiento y otras funciones celulares.

Con relación al transporte de xilosa en *Amycolatopsis* sp., si bien no existe información para este actinomiceto en particular, se conoce que en *Streptomyces. coelicolor* es mediado por transportadores tipo ABC, que están codificados en el gen putativo *xylFGH* (Bertram y col., 2004). Ya en el medio intracelular, la xilosa se isomeriza a xilulosa (Zhao y col., 2020) y es fosforilada a xilulosa-5-fosfato, que ingresa a la vía de las pentosas fosfato para obtener fructosa 6-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato que son intermediarios de la glucólisis (Zhao y col., 2020).

Se conoce que los intermediarios en la ruta de las pentosas fosfato, tales como la ribosa-5-fosfato, entre otros, son precursores para la producción de metabolitos secundarios y nucleótidos (Świątek y col., 2013). Lo anterior alude, que la xilosa podría mediar también otras funciones en las células

de *Amycolatopsis* y no solo es utilizado como aporte energético, favoreciendo la degradación de la VAN con el consecuente incremento de otros subproductos, como el AV y el GY.

Con relación al transporte de maltosa se conoce que en *S. coelicolor*, está dado por transporte activo secundario (Ehrmann y col., 1998). En otros microorganismos como *E. coli*, se ha descrito que el transportador de maltosa Mal FGK_2, posee dos subunidades de unión a ATP y que puede transportar diferentes azúcares (2 a 7 carbonos) (Orelle y col., 2008). Del mismo modo, Bertram y col. (2004), en un análisis *in silico*, identificaron que los transportadores de *S. coelicolor* para maltosa pudieran estar mediados por Mal EFG, una proteína putativa, con las subunidades que codifican para el gen putativo con una alta similitud con las subunidades del transportador Mal FGK_2 de *E. coli* (Zolnerciks y col., 2011).

Esta similitud de transportadores indica que existe un gasto energético para el transporte de maltosa al medio intracelular en *Amycolatpsis sp*. Así también, se ha encontrado que en células de *S. coelicolor* y *Streptomyces lividans* el transporte de maltosa es inducible (no constitutivo) por maltosa, maltotriosa y otras maltodextrinas y que la transcripción es reprimida por la presencia de glucosa (Gubbens y col., 2012). Sin embargo, a diferencia de la adición de fructosa y xilosa que no tuvieron efecto sobre la producción de VAN, la adición de maltosa causó una disminución por lo que su efecto no estaría limitado únicamente a cuestiones de transporte o catabolismo del carbohidrato. Al parecer, la maltosa estaría acelerando la degradación de la VAN, aunque no quedan claros los mecanismos que estarían impulsando dicha aceleración, posiblemente asociados a inducción de otro tipo de genes, además de los de su transporte.

6.1.2. Cinéticas de Biotransformación del AF con Fuentes de Carbono como Cosustratos

De los diferentes azúcares ensayados como co-sustratos, la glucosa tuvo un efecto significativo sobre la producción de VAN y la reducción de en la formación de subproductos, como el AV y el GY. Por otro lado, la maltosa tuvo un efecto contrario al de la glucosa, pero con el experimento previo no quedó claro si la disminución en la formación de VAN y el incremento de subproductos se debió a un efecto de redireccionamiento de las rutas catabólicas o a una aceleración de las reacciones que, al tiempo de las evaluaciones, mostraron los productos de degradación de la VAN.

Para evaluar de mejor manera estos aspectos, se siguieron las cinéticas de biotransformación con la adición de estos azúcares, durante 30 h, incluyendo un segundo control (SMA C), consistente en el medio de crecimiento agotado al cual fue añadido AF. Los resultados se presentan en la Figura 4.

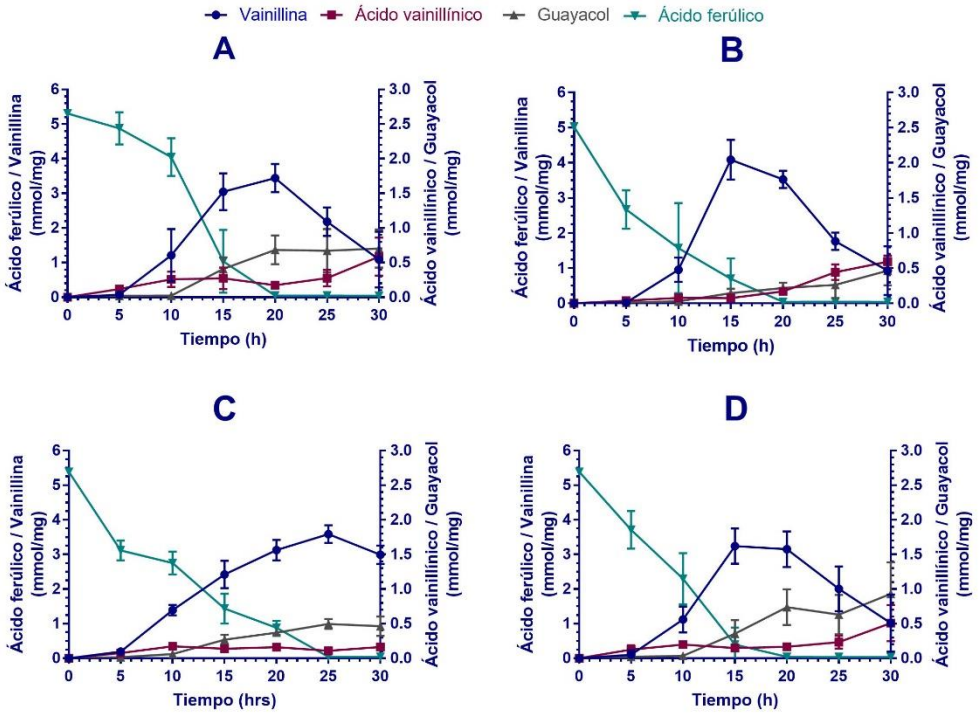


Figura 4. Cinéticas de biotransformación de AF en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de carbono para la regeneración de cofactores enzimáticos. Producción específica de VAN AV, GY y consumo de AF. A) Control B) SMA C) Glucosa D) Maltosa.

El control (Figura 4A), mostró una formación exponencial de VAN entre la hora 5 a la hora 15 de biotransformación, teniendo luego un comportamiento estacionario hasta la hora 20, punto en el cual se agotó el AF y se alcanzó la producción máxima de VAN (3.37 mM/mg de biomasa) que corresponde a una productividad molar de 0.17 mM/h y un rendimiento molar de VAN del 65.5%. A partir de la hora 20, inició un decaimiento lineal en su concentración, fruto de su degradación a AV, que alcanzó su máximo a las 30 horas (0.62 mM/mg de biomasa).

Contreras-Jácquez y col. (2020), utilizando un sistema de células en reposo de *Amycolatopsis* sp.

ATCC 39116, encontraron el mismo comportamiento con algunas diferencias en el tiempo de agotamiento de AF (40 h) y la producción máxima de VAN (aproximadamente 38 mM), comparada con el valor máximo de VAN (25 h) obtenido en este estudio (13.9 mM de VAN). Las diferencias en la concentración de VAN se debieron a los cambios en la concentración inicial de AF, que en su estudio fue 55 mM y en el presente 25.7 mM. Aunado a eso, el crecimiento de las células fue realizado con 5.14 mM de AF y 2 mL de inóculo, para evaluar la inducción de este y de otros ácidos hidroxicinámicos, a diferencia de este estudio en el que empleo únicamente 3 mL de inóculo. El comportamiento cinético del control y la degradación de VAN podría deberse al bajo estado energético celular debido a una baja tasa de transferencia de oxígeno desde la interfase gaseosa al seno del líquido, característica de los cultivos sumergidos. Esto estaría ocasionando una disminución en la eficiencia de los procesos metabólicos centrales, como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, que disminuye la producción de ATP. En consecuencia, se produce un incremento en la demanda de NADH, por lo que la relación NAD^+/NADH también se incrementa, provocando un desbalance redox en las células.

El sistema de medio agotado (SMA, Figura 4 B) exhibió un comportamiento similar al control con ligeras diferencias, mostrando una formación exponencial de VAN entre la hora 5 a la hora 15 de biotransformación, punto en el cual, se alcanzó la producción máxima (4.09 mM/mg de biomasa), que corresponde a una productividad de 0.27 mM/h, valor 59% mayor que la productividad alcanzada con el control, y un rendimiento molar de obtención de VAN del 94.5%, seguido de un ligero decremento hasta la hora 20, tiempo en el cual se agotó el AF. A partir de ese tiempo, inició un decaimiento lineal en su concentración, fruto de la degradación de VAN a AV, que alcanzó su máximo a las 30 horas (0.59 mM/mg de biomasa), que coincidentemente fue el punto máximo de producción de GY (0.47 mM/mg de biomasa).

Las diferencias de la producción de VAN con respecto al control pueden deberse a la concentración glucosa remanente de 2.974 g/L en el medio de crecimiento, contrario a lo mencionado por Contreras-Jácquez y col. (2020) quienes reportaron que la glucosa se agota por completo a las 40 horas de crecimiento. Así también, este medio agotado podría contener fuentes de nitrógeno, como péptidos y aminoácidos residuales, que no se hubieran catabolizado durante el crecimiento (no determinado). En el estudio de Ma y Daugulis (2014) se adicionó AF concentrado a células en crecimiento de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 y se reportó un efecto diferencial de aceleración del metabolismo al iniciar el crecimiento en cultivo sumergido con 8 g/L de extracto de levadura y

8 g/L de glucosa, previo a la biotransformación del AF. Los autores encontraron que existe un efecto de aceleración del catabolismo del AF y un incremento en la producción de VAN. No obstante, no se determinó la concentración de glucosa ni del de extracto de levadura residual, antes de la adición del AF. En síntesis, acorde a los resultados obtenidos en estas cinéticas, la presencia de glucosa y fuentes de nitrógeno remanentes posiblemente aceleran el catabolismo de AF de células de *Amycolatopsis* sp, ATCC 39116.

Otro de los factores que podría influir en los resultados obtenidos con el SMA y sus diferencias con el control podría deberse al efecto del tipo de sistema utilizado. Se ha reportado que en los sistemas de células en reposo de bacterias gram positivas como *Lactobacillus bulgaricus*, donde se realizan procesos como la centrifugación, la manipulación de biomasa los cambios de pH y de temperatura, tienen un efecto sobre la viabilidad celular (Streit y col., 2010). En el caso de los sistemas de células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 podría existir también una pérdida de viabilidad celular lo cual afectaría los rendimientos y productividad de VAN.

Asimismo, la biotransformación utilizando glucosa como co-sustrato, exhibió un comportamiento diferente respecto al control y al SMA; a partir de la hora 5 se inició la producción de VAN la cual exhibió un incremento inicialmente lineal que se va ligeramente atenuando hasta la hora 25, punto en el cual se alcanzó la producción máxima (3.58 mM/mg de biomasa), que corresponde a un rendimiento molar de bioconversión de 67% y a una productividad de 0.14 mM/h, valor 18% y 48% por debajo que la productividad del control y el sistema SMA, respectivamente. Este comportamiento coincide con el consumo de todo el AF. A partir de la hora 25 inició un decaimiento lineal de la concentración de VAN, producto de su degradación a AV y GY, que exhibieron sus valores más altos entre las horas 25 y 30.

Los resultados de la biotransformación, utilizando glucosa como co-sustrato, muestran un efecto de ralentización en el consumo de AF, en la producción de VAN y en su degradación.

Durante la biotransformación existe una disminución de la eficiencia de los procesos metabólicos centrales como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa ocasionado por el limitado oxígeno en el medio (Akram, 2014). Asimismo, la producción de ATP es altamente dependiente de la reducción de moléculas como el NADH debido a que estas últimas están orientadas hacia la producción de ATP por medio de la fosforilación oxidativa. En ese sentido, posiblemente se puede generar una demanda de moléculas para restablecer el equilibrio redox durante la biotransformación, la cual, se podría regenerar a partir de la reducción de NAD^+ en NADH por

medio de la catálisis de la vainillina deshidrogenasa para la degradación de VAN y enzimas deshidrogenasas involucradas de la *β*-oxidación.

Sin embargo, el aporte de glucosa como co-sustrato y su metabolismo puede ocasionar un aporte de ATP rápido y directo mediante la ruta Embded Meyerhof que es análoga a la glucólisis y en consecuencia esto podría reducir la demanda de NADH por lo se reduciría la actividad de las enzimas anteriormente mencionadas, asimismo, esto provocaría una reducción la degradación de VAN y la producción de AV por la *β*-oxidación del AF. Lo anterior sugiere que el uso de glucosa podría estar siendo asimilada como fuente primaria de carbono y regenerando ATP mediante la ruta Embden Meyerhof y que la célula no se vea en la necesidad de usar VAN, como fuente de carbono y energía.

Finalmente, se desarrollaron las cinéticas de producción de VAN, AV, GY y el consumo de AF, adicionando maltosa como co-sustrato (Figura 4 D). La producción de VAN empezó a las 5 h y aumentó de forma exponencial hasta las 15 h, alcanzando un máximo de 3.24 mM/mg, que corresponde a un rendimiento molar del 65% y a una productividad de 0.22 mM/h, un valor 27% más elevado que la productividad alcanzada en el control, aunque 19% más baja que en el sistema SMA. A partir de las 20 h, punto en el cual el AF fue completamente agotado, la concentración de VAN tuvo un decaimiento lineal pronunciado hasta las 30 h. Asimismo, la producción de AV mantuvo un comportamiento similar al control y la producción de GY mostró un valor ligeramente superior al obtenido en el control a la hora 30.

Este comportamiento sugiere que la maltosa como co-sustrato acelera ligeramente el catabolismo del AF y la degradación de VAN debido a que se alcanza rápidamente un máximo en la producción de VAN. Asimismo, este efecto se muestra reflejado en un ligero incremento en la velocidad producción de GY. No está claro por qué la maltosa produce un aparente efecto de aceleración del metabolismo en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 durante la biotransformación del AF, no obstante, el aporte energético de la maltosa podría estar siendo aprovechado para funciones de mantenimiento celular y almacenamiento energético.

6.1.3. Efecto de Fuentes de Nitrógeno

La Figura 5, describe el efecto del uso de diferentes fuentes de nitrógeno, como co-sustratos, sobre

la biotransformación del AF en cultivo sumergido en diferentes subproductos y la producción de biomasa.

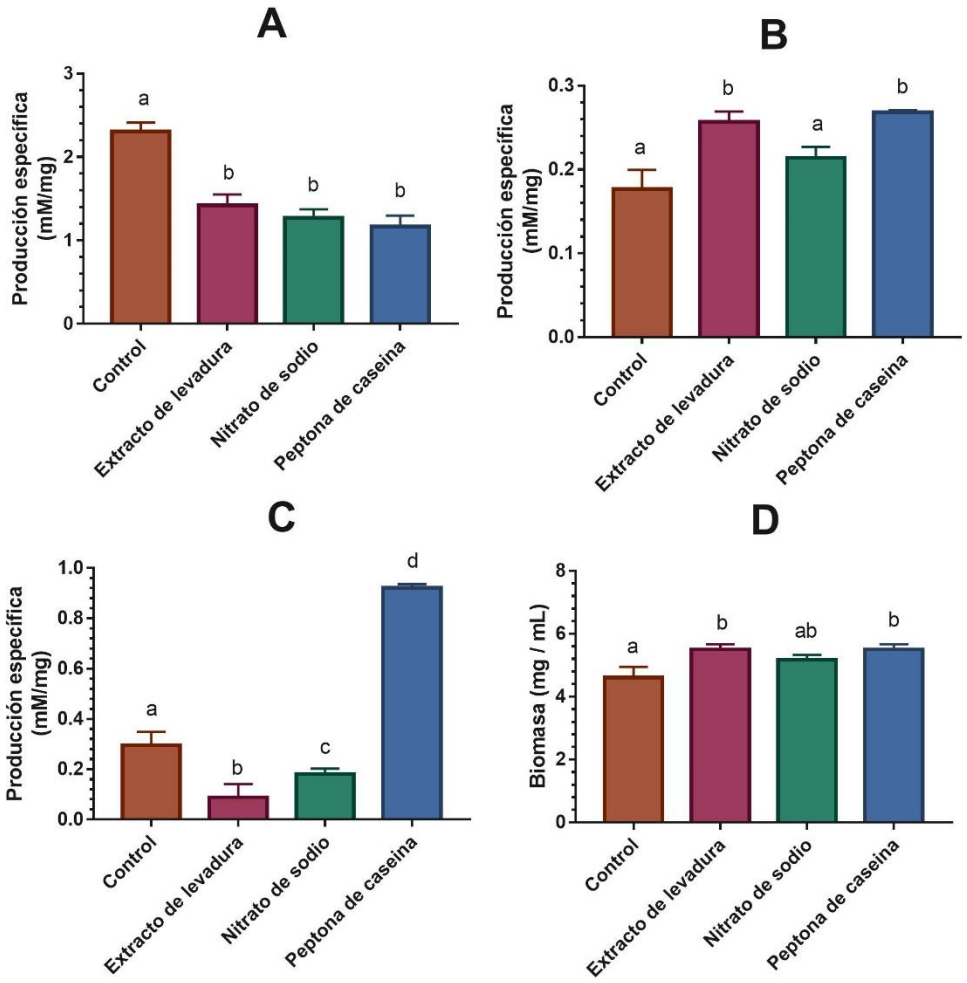


Figura 5. Ensayos de biotransformación de AF, durante 12 h con células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de nitrógeno para la regeneración de cofactores enzimáticos. Producción específica de: A) VAN B) AV C) GY. D) Biomasa al cabo del proceso de biotransformación. Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p<0.05$).

En cuanto a la producción de VAN, al cabo de 12 h de biotransformación (Fig. 5A), en el control se alcanzó una producción específica de 2.31 mM VAN/mg de biomasa, que resultó estadísticamente diferente a la alcanzada con la adición de extracto de levadura, nitrato de sodio y peptona de caseína al medio de biotransformación, lo cual, ocasionó un decremento del 38%, 45% y 49% en la producción de VAN respectivamente ($p<0.05$). Con relación a la formación de otros

subproductos del catabolismo, como el AV (Fig. 5B), se observó que la adición de nitrato de sodio no tuvo ningún efecto sobre la producción, mientras que la adición de extracto de levadura y peptona de caseína tuvieron un efecto negativo, provocando una disminución de 45% y 51%, respectivamente ($p<0.05$), en comparación con el control.

Respecto a la formación de GY (Fig. 5 C), la adición de extracto de levadura y nitrato de sodio provocó una disminución del 70 y 39%, respectivamente ($p<0.05$), con relación al control y, por el contrario, la adición de peptona de caseína provocó un incremento de alrededor del 200%, ($p<0.05$). Asimismo, respecto a la producción de biomasa (Fig. 5 D), el control alcanzó 4.61 mg de biomasa/ml, que resultó estadísticamente similar a la alcanzada con la adición de nitrato de sodio. Por el contrario, la adición de extracto de levadura y peptona de caseína provocaron un incremento de alrededor del 20%. Uno de los factores que podría explicar estos resultados es que *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, al tener disponibles fuentes de nitrógeno favorables para el crecimiento, podría redireccionar los flujos de carbono obtenidos a través de la biotransformación del AF para la producción de biomasa. La presencia de fuentes de nitrógeno adicionales en el medio posiblemente acelera el catabolismo del AF y lo redirige hacia la degradación de VAN para la formación de GY y ácido protocatecoico. Estos intermediarios, a través, de una serie de reacciones se degradan en catecol, compuesto que ingresa a la ruta de los ceto adipatos por medio de la ruptura del anillo aromático y posteriormente es transformado en succinato y acetil-CoA, los cuales se incorporan al ciclo de Krebs.

Así también, el transporte y el metabolismo de compuestos nitrogenados están relacionados con la formación de biomasa. Las fuentes de nitrógeno que tienen una estructura compleja tales como proteínas y péptidos contenidos en el extracto de levadura y la peptona de caseína no ingresan directamente a la célula, sino que son previamente hidrolizadas por una serie de proteasas excretadas al medio extracelular (hidrolasas, lipasas, deaminasas y peptidasas). Se conoce que *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 excreta enzimas implicadas en la hidrólisis de medios complejos (Salvachúa y col., 2020). Estas proteínas son hidrolizadas en moléculas más pequeñas como amonio residual que requiere de un transportador.

En *S. coelicolor*, el transporte de amonio es realizado por AmtB, que a su vez está relacionado con el regulador transcripcional GlnR que regula el consumo de amonio y otros compuestos nitrogenados que son favorables para la formación de biomasa y las metaboliza por el sistema GS/GOGAT (glutamina sintetasa/ glutamato sintetasa) en condiciones limitantes de nitrógeno

(Liao y col., 2015). Este mecanismo de transporte y las enzimas del metabolismo podrían ser similares en *Amycolatopsis* ATCC 39116 dado que el extracto de levadura y la peptona de caseína poseen un alto de contenido amínico total (61.4% y 62.5% respectivamente), el cual podría estar siendo utilizado como fuentes de carbono y nitrógeno para la formación de biomasa.

La similitud estadística en la producción de biomasa del control y el tratamiento con la adición de nitrato de sodio puede estar relacionado con el transporte de esta fuente de nitrógeno hacia el interior de la célula. En actinomicetos el regulador transcripcional GlnR está asociado con el transporte y el metabolismo de fuentes de nitrógeno y tiene efecto sobre el gen *narR* que codifica para las enzimas nitrato/nitrito reductasa (Wohlleben y col., 2010). Este paso de reducción requiere como cofactor NADPH, que hace menos eficiente el catabolismo de nitrato (Jonsbu y col., 2000). Aunado a esto, se ha reportado que el nitrato no es una fuente favorable para el crecimiento de biomasa, por lo que probablemente favorezca la formación de metabolitos secundarios.

6.1.4. Cinéticas de Biotransformación del AF Usando Fuentes de Nitrógeno

Entre las diferentes fuentes de nitrógeno evaluadas como co-sustratos si bien, ninguna mostró un efecto significativo en la producción de VAN, el extracto de levadura y la peptona de caseína sí mostraron un efecto en la formación de sus productos de degradación: el AV y el GY. Para complementar el estudio de estos efectos, se evaluó también el comportamiento cinético de los procesos de biotransformación con la adición de estas fuentes de carbono, durante 30 h, contrastándola con el control y un segundo control (SMA), de la misma manera que en el apartado 6.1.3.

Los resultados se presentan en la Figura 6.

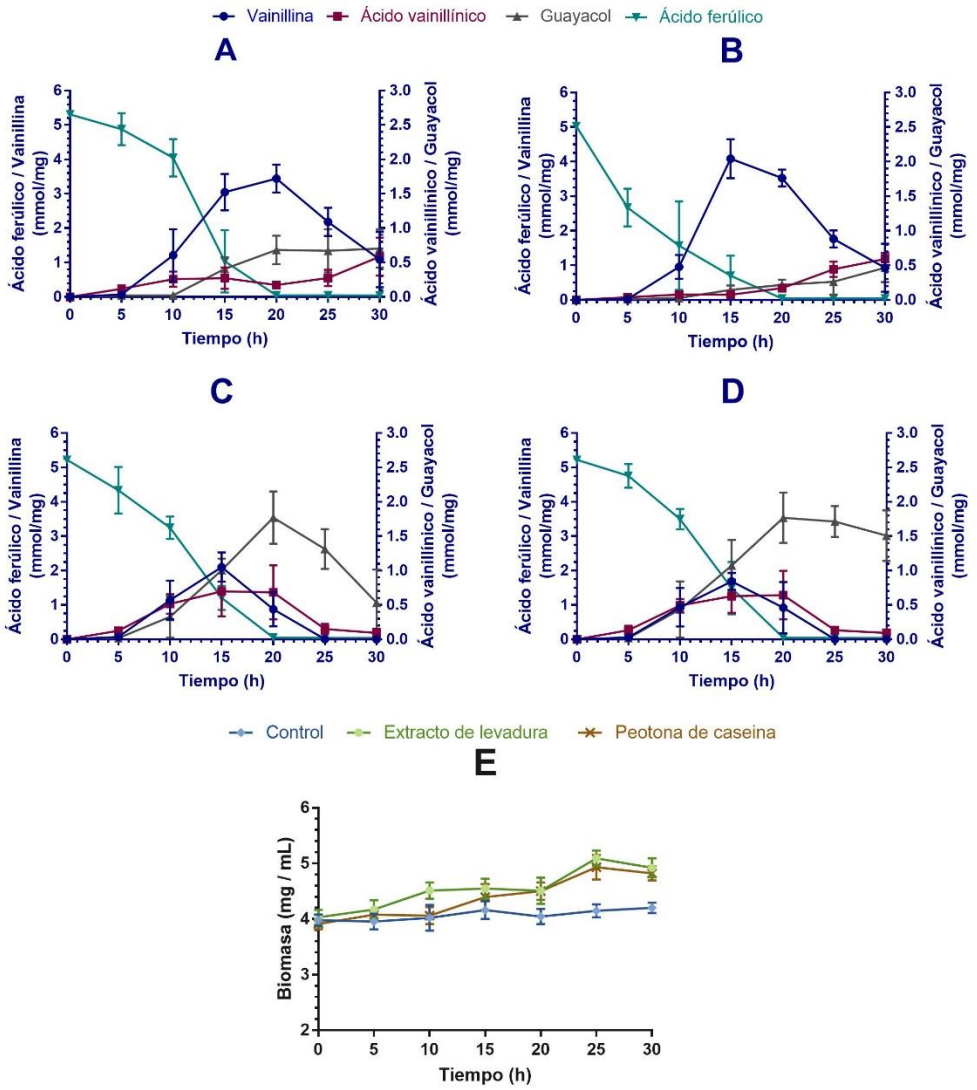


Figura 6. Cinéticas de biotransformación de AF en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 usando diferentes fuentes de nitrógeno para la regeneración de cofactores enzimáticos. Producción específica de VAN, AV, GY y consumo de AF. A) Control B) SMA C) Extracto de levadura D) Peptona de caseína E) Biomasa.

El control (Fig. 6A), mostró una formación exponencial de VAN entre la hora 5 a la hora 15 de biotransformación, teniendo luego un comportamiento estacionario hasta la hora 20, punto en el cual se alcanzó la producción máxima de 3.37 mM/mg de biomasa que corresponde a una productividad molar de 0.17 mM/h y un rendimiento molar de obtención de VAN del 65.5%. Así también, en ese punto se agotó el AF. A partir de la hora 20, inició un decaimiento lineal en su concentración, fruto de su degradación a AV, que alcanzó su máximo a las 30 horas (0.62 mM/mg de biomasa).

El sistema de medio agotado (SMA, figura 6 B) exhibió un comportamiento similar al control con ligeras diferencias, mostrando una formación exponencial de VAN entre la hora 5 a la hora 15 de biotransformación, punto en el cual, se alcanzó la producción máxima (4.09 mM/mg de biomasa), que corresponde a una productividad de 0.27 mM/h y un rendimiento molar de obtención de VAN del 94.5%, seguido de un ligero decremento hasta la hora 20, tiempo en el que se agotó el AF. A partir de ese tiempo, inició un decaimiento lineal en su concentración, fruto de la degradación de VAN a AV, que alcanzó su máximo a las 30 horas (0.59 mM/mg de biomasa), que coincidentemente fue el punto máximo de producción de GY (0.47 mM/mg de biomasa). Las cinéticas con extracto de levadura (Figura 6C), mostraron la formación de VAN siguiendo una forma lineal a partir de la hora 5 hasta la hora 15 de biotransformación, punto en el cual se alcanzó la producción máxima (2.01 mM/mg de biomasa), que corresponde a una de productividad de 0.13 mM/h, un valor 21% más bajo que la productividad obtenida con el control, y un rendimiento molar de bioconversión de 50%.

A partir de ese punto, inició un decaimiento también lineal de su concentración hasta su completa degradación a la hora 25. Sin embargo, contrariamente a lo observado en las cinéticas de adición de distintas fuentes de carbono, la producción de GY y AV arrancó de forma conjunta con la de la VAN a la hora 5, continuando de forma lineal hasta la hora 20, en la que se alcanzaron máximos de producción de 0.68 mM/mg de biomasa y 1.77 mM/mg de biomasa, respectivamente. Cabe mencionar que, a este tiempo, el AF había sido completamente agotado. A partir de la hora 20 y hasta la hora 25 se produjo prácticamente la degradación total, tanto del GY, como del AV.

Por otro lado, la cuantificación de biomasa durante el proceso de biotransformación (Figura 6 D), muestra que en el control, la biomasa se mantuvo de forma estacionaria (4.15 mg de biomasa/ml), mientras que la adición de extracto de levadura y peptona de caseína promovieron su crecimiento a partir de la hora 10, alcanzando máximos de 4.92 mg de biomasa/ml y 4.82 mg de biomasa/ml, respectivamente, entre las 25 y 30.

Estos resultados también sustentan lo descrito en la sección 6.1.3, debido a que se muestra un catabolismo acelerado por parte de las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, que condujo a un incremento moderado de la formación de biomasa (Aproximadamente 20%). Así también, el extracto de levadura posiblemente fue usado como fuente de carbono y de nitrógeno, promoviendo el crecimiento de las células y acelerando la degradación de VAN para su uso como otra fuente de carbono. Estos resultados son contrarios a lo descrito por Ma y Daugulis (2014), que encontraron

un efecto positivo en la producción de VAN por la adición de extracto de levadura en el medio inicial de crecimiento de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

El efecto en el comportamiento cinético del AV y el GY, anteriormente descritos, es atribuido a una rápida degradación de la VAN, probablemente relacionada con la necesidad de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 de sintetizar moléculas para el crecimiento y división celular y/o metabolismo primario. Por otro lado, la producción de AV fue mucho más elevada que en el control y que en el SMA, fenómeno que podría deberse a que la ruta de la *β*-oxidación se encuentra mucho más activa por el efecto de regulación positiva que pudieran tener péptidos, aminoácidos o metabolitos secundarios sobre los genes de esta vía metabólica; sin embargo, no hay información al respecto por lo que se requieren más estudios para sustentar este juicio.

Con relación a las cinéticas de biotransformación utilizando peptona de caseína como co-sustrato (Figura 6 D), se observaron comportamientos muy similares a cuando se añadió extracto de levadura (Figura 6C). La VAN alcanzó una producción máxima (1.69 mM/mg de biomasa) a la hora 15, que corresponde a una productividad de 0.10 mM/h, un valor 44% menor que la productividad obtenida con el control, y a un rendimiento molar de 45.3%. Por su parte, el AV alcanzó un máximo de producción de 0.63 mM/mg de biomasa a la hora 20. Finalmente, la producción de GY alcanzó un máximo de producción de 1.77 mM/mg de biomasa a la hora 20, punto en el cual también se consumió todo el AF. A diferencia de las cinéticas de biotransformación con extracto de levadura como co-sustrato, el GY presentó un comportamiento estacionario hasta la hora 25 y una ligera degradación hasta la hora 30.

El GY ha sido reportado como el principal producto de degradación del AV en cultivos sumergidos de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 y posiblemente este siendo utilizado como fuente de carbono para la formación de biomasa. El extracto de levadura, debido a su composición compleja (aminoácidos y factores de crecimiento), podría estar acelerando la velocidad de degradación de GY para la formación de biomasa en comparación con la peptona de caseína. Si bien, las diferencias entre la cantidad de biomasa no son significativas, en la figura 6 E se aprecia que la cantidad de biomasa en el sistema adicionado con extracto de levadura fue ligeramente mayor al adicionado con peptona de caseína. Esto sugiere que existe un efecto diferencial cuando se utiliza extracto de levadura o peptona de caseína como co-sustratos en la biotransformación del AF, sobre velocidad de degradación del guayacol. Asimismo, se ha propuesto otra vía alterna competitiva de degradación del AV en ácido protocatecoico en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. (Meyer y col.,

2018). La reacción de formación de ácido protocatecoico a partir de AV es catalizada por la enzima vainillato demetilasa (EC.1.14.13.82); esta enzima está presente en otros organismos similares de los géneros *Pseudomonas*, *Rhodiococcus* y *Streptomyces* (Buswell y Ribbons, 1988; Chen y col., 2012; Nishimura y col., 2014), lo cual sugiere que *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 podría contar con una enzima similar y que hasta el momento se ha descrito como una enzima putativa (WP_020422153.1, WP_020422151.1) (Meyer y col., 2018). En este contexto el ácido protocatecoico por una serie de reacciones mediante una ruptura del anillo puede ser redirigido hacia la producción de succinil-CoA y acetil-CoA que son intermediarios del ciclo de Krebs (Nichols y Harwood, 1997). Sin embargo, no hay información sobre la regulación de una u otra vía de degradación, probablemente el extracto de levadura o algún aminoácido producto de su hidrólisis podría contener algún compuesto que favorezca la actividad de la enzimas involucradas en la degradación del GY, que hasta la fecha se han encontrado que en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 se tratan de enzimas de la familia del citocromo P450 (Mallinson y col., 2018) empero, hacen falta más estudios para corroborar esta información.

6.2. Efecto de Fuentes de Carbono y de Nitrógeno en la Formación de ATP

En la Figura 7 se muestra la concentración de ATP intracelular al inicio y al final (24 h) de los procesos de biotransformación con la adición de azúcares (A) y de fuentes de nitrógeno (B) como co-sustratos del AF.

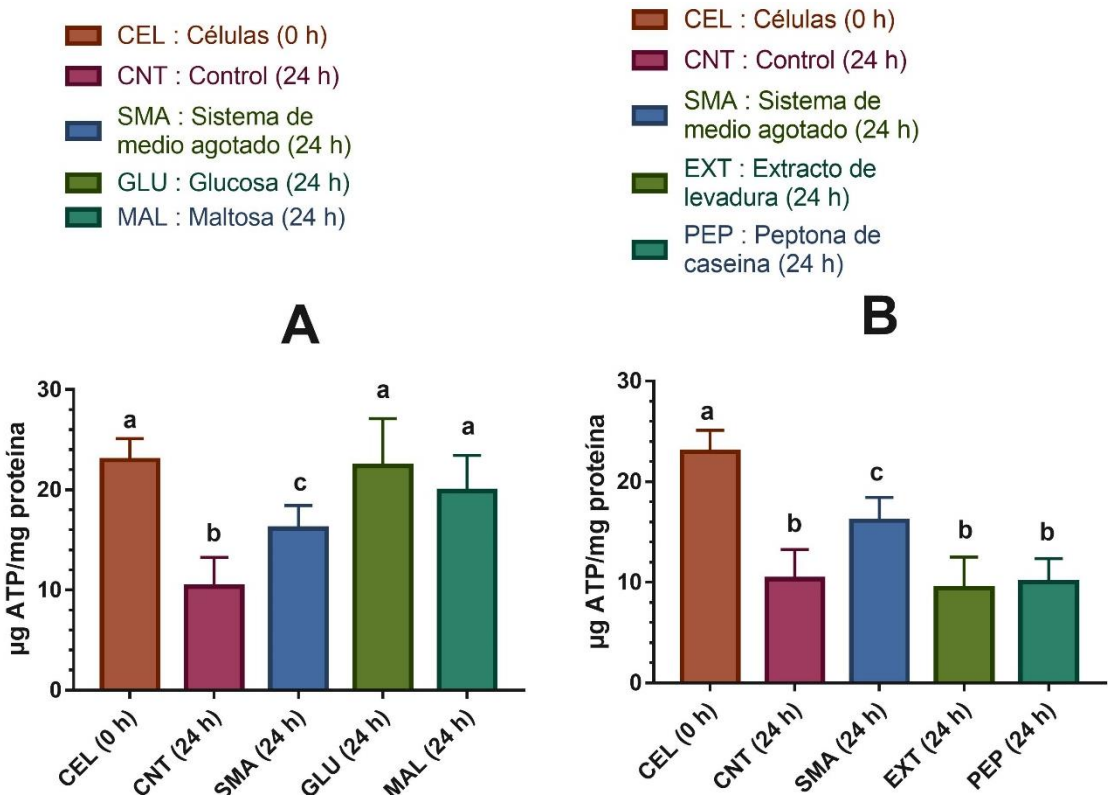


Figura 7. Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la concentración de ATP. A) Fuentes de carbono, B) fuentes de nitrógeno. Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p<0.05$).

La Figura 7 A muestra que las células del sistema de biotransformación sin la adición de ningún azúcar (control), tuvieron una reducción del 55% en su contenido respecto al contenido de ATP de en las células al inicio de la biotransformación (0 h), mientras que, en el medio de crecimiento agotado conteniendo glucosa residual (aproximadamente 2.9 g/L), la reducción fue tan sólo del 29.8%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Contreras-Jácquez y col. (2020) quienes encontraron una reducción del 68% en el contenido de ATP intracelular en cultivos sumergidos, posteriores a las 24 h de iniciado el periodo de biotransformación. Por su parte, los sistemas a los que se les añadió glucosa o maltosa no presentaron decaimiento en el contenido de ATP intracelular.

Estos resultados confirman las hipótesis planteadas en las secciones 6.1.1 y 6.1.2, que el efecto de ralentización en la degradación de VAN podía ser atribuida a la regeneración del ATP y el restablecimiento del balance redox durante la biotransformación, lo que no ocurre en el sistema control que a las 24 h ya había mostrado una degradación notoria de la VAN.

Los resultados muestran claramente un aporte similar en la regeneración del ATP intracelular utilizando glucosa y maltosa como co-sustratos ($p>0.05$); sin embargo, los comportamientos cinéticos de biotransformación con ambos azúcares como co-sustratos muestran diferencias notables (sección 6.1.2.). En el primer caso, la glucosa promovió la ralentización de la degradación de VAN y por ende una baja producción de AV y GY y en el caso de la maltosa, contrariamente promovió una aceleración de la degradación de AF, VAN y GY. Estas diferencias podrían ser atribuidas a los mecanismos de regulación de estos azúcares en el catabolismo de actinomicetos modelo, como *Streptomyces coelicolor*, que muy probablemente son mecanismos análogos en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. La glucosa en *Streptomyces coelicolor*, activa un mecanismo conocido como represión catabólica de carbono por glucosa dependiente de Glk que, mediante un regulador de quinasas (RoK 7B7), induce el transporte de xilosa (*xylF*, *xylG*, *xylH*) y reprime los genes (*fruA*, *fruK*, *fruR*, *msiK*, *malE*) involucrados en la síntesis de transportadores de fructosa, maltosa, y otros azucares transportados sistemas del tipo ABC (Gubbens y col., 2012).

Así también, se ha reportado otro tipo de regulación independiente de Glk, en la que los productos posteriores a glucosa como fructosa 1,6-bisfosfato y fosfoenolpiruvato, actúan como co-represores. Estos son activados por diferentes reguladores transcripcionales como malR, glyR y bldB para reprimir la síntesis de transportadores de maltosa, glicerol y la producción de metabolitos secundarios y compuestos relacionados con cambios morfológicos celulares (Romero-Rodríguez y col., 2017). Así también, se ha atribuido a la glucosa como el medio idóneo para el crecimiento y se ha descrito que cuando la glucosa está presente como fuente de carbono, reprime la gluconeogénesis debido a una fuerte represión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa PEPCK involucrada en la gluconeogénesis, estimulando el transporte de glucosa y redirigiendo el flujo hacia las vías Embded Meyehof y las pentosas fosfato (Romero-Rodríguez y col., 2016).

Por otro lado, se ha descrito que la maltosa en *Streptomyces coelicolor* se transporta por medio de transportadores del tipo ABC (Wink y col., 2017). Asimismo, se ha descrito que la maltosa (sin presencia de glucosa) induce la transcripción de *malE*, y posiblemente de *malFG* para la síntesis de los transportadores de maltosa *MalEFG* (van Wezel y col., 1997). A su vez la maltosa o algún metabolito de su catabolismo se une a un regulador transcripcional que puede regular la síntesis de transportadores de maltosa (van Wezel Gilles P y col., 1997). Esto nos indica que cuando las células poseen maltosa en el medio como fuente de carbono principal, se sintetizan los transportadores necesarios para el ingreso de maltosa a la célula por medio de transporte activo secundario. La

maltosa a diferencia de la glucosa no provoca represión catabólica de otros azúcares ni reprime la síntesis de enzimas involucradas en la gluconeogénesis. En este contexto, cuando se metaboliza maltosa, está activa la vía gluconeogénica, lo cual sugiere que, la aceleración del catabolismo del AF y una notoria aceleración de la degradación de VAN en AV y GY en células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 podría estar orientada a la obtención de moléculas y energía para el mantenimiento y otras funciones celulares.

Por su parte, la Figura 7B muestra que la adición de extracto de levadura o peptona de caseína no evitó la disminución de ATP intracelular, cuyas caídas resultaron estadísticamente similares a las del control. No obstante, los resultados cinéticos de la biotransformación del AF utilizando extracto de levadura y peptona de caseína, como co-sustratos, (Figura 6) muestran una aceleración en la degradación de AV, aunado al incremento en la biomasa. Esta aceleración del metabolismo por efecto de las fuentes de nitrógeno podría deberse a que las células de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 posiblemente utilicen los residuos de aminoácidos provenientes de la hidrólisis de las proteínas como fuentes de carbono y nitrógeno para la formación de biomasa. Asimismo el AF y sus productos de degradación también podrían dar un aporte como fuentes de carbono para la formación de biomasa.

6.3. Actividad Enzimática de la Feruloil Coa Sintetasa y Vainillina Deshidrogenasa

La Figura 8 muestra los resultados de las actividades enzimáticas específicas de la feruloil-Coa sintetasa (expresada como velocidad de consumo de AF) y vainillina deshidrogenasa (expresada como velocidad de formación AV) en los extractos crudos intracelulares de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, en sistemas de biotransformación a los que se agregaron diferentes azúcares o fuentes de nitrógeno.

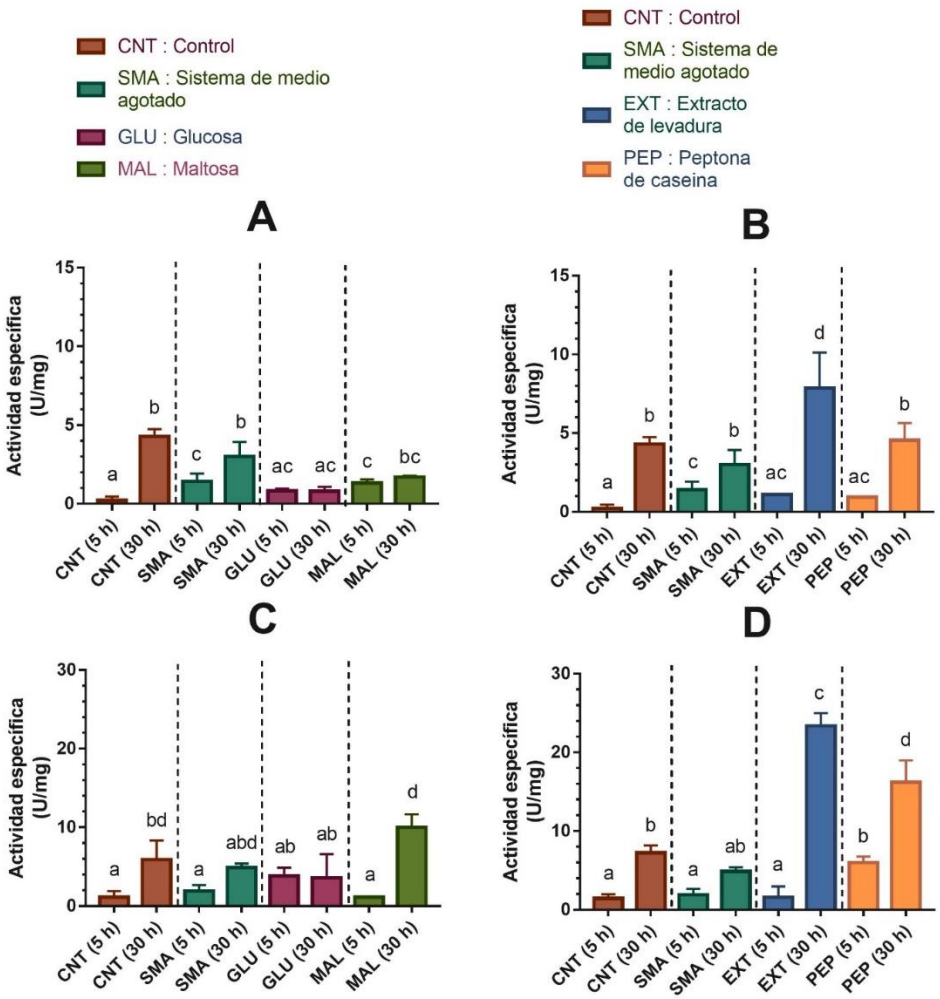


Figura 8. Efecto de la adición de fuentes de carbono y nitrógeno en la actividad enzimática de la feruloil CoA sintetasa y vainillina deshidrogenasa. A) efecto de las fuentes de carbono en la feruloil CoA sintetasa, B) efecto de las fuentes de nitrógeno en la feruloil CoA sintetasa, C) efecto de las fuentes de carbono en la vainillina deshidrogenasa, D) efecto de las fuentes de nitrógeno en la vainillina deshidrogenasa. Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p<0.05$).

Los resultados muestran las actividades a las 5 h de iniciada la transformación, tiempo en el cual comenzó la degradación del AF y la producción de VAN (Figuras 4 y 6), y a las 30 h, debido a que en la mayoría de los casos presentados anteriormente (Figuras 4 y 6), a dicho tiempo se observó la degradación de al menos el 50% de la VAN

En la Figura 8 A se observa que en el control y en el sistema con el medio de crecimiento agotado (SMA) hubo un incremento en la actividad de la feruloil-CoA sintetasa (18 y 2 veces, respectivamente, al cabo de 30 h), con respecto a la actividad inicial (5 h), lo que sugiere una inducción en la expresión del gen que codifica para esta enzima. En otros organismos, como

Corynebacterium glutamicum y *Pseudomonas putida*, el gen *fcs*, que codifica para la feruloil-CoA sintetasa, es inducible por AF y regulado por MarR; asimismo, el AF en cultivo sumergido podría provocar cambios en la afinidad de MarR que regula la síntesis de las enzimas involucradas con la *β*-oxidación (Graf y Altenbuchner, 2014; Kallscheuer y col., 2016). Este fenómeno podría estar ocurriendo de manera similar en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 durante la biotransformación del AF. Esto concuerda con los estudios de Contreras-Jácquez y col. (2020) que, en ensayos de biotransformación de AF, utilizando un sistema de células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 en cultivo sumergido, reportaron un comportamiento cinético similar que es atribuido a la regulación de la síntesis de enzimas benzaldehído deshidrogenasas de la *β*-oxidación por un regulador transcripcional del tipo MarR.

Adicionalmente, en el sistema SMA se observa que, a las 5 h, la actividad enzimática de la feruloil-CoA sintetasa fue 5.4 veces más alta que en el control, lo cual sugiere que en SMA, muy probablemente se requiere de un periodo de adaptación más corto para la activación de las vías catabólicas del AF con relación a las células del control. Este hecho puede estar relacionado con la presencia de glucosa y péptidos, residuales en el medio agotado que aceleran el catabolismo del AF. Justamente, la adición de glucosa o maltosa muestra un incremento de aproximadamente 5 veces la actividad inicial ($p<0.05$) durante las primeras 5 horas de biotransformación, con relación al control. Asimismo, mientras la actividad enzimática no aumenta cuando se utilizó glucosa y maltosa como co-sustrato entre la hora 5 y la hora 30 de biotransformación, el control y el SMA que incrementaron su actividad enzimática 18 y 2 veces. Estas diferencias en la actividad enzimática de la feruloil CoA sintetasa, podrían estar relacionadas con el aporte energético que tienen estos azucares (Figura 7).

Por su parte, la adición de extracto de levadura o de peptona de caseína (Figura 8 B), provocó un incremento aproximado de 5 veces de la actividad feruloil CoA sintetasa, con relación al control, a las 5 horas de biotransformación y un fuerte incremento de 6.21 y 3.89 veces respecto a la actividad inicial, luego de 30 h del proceso. En la Figuras 8 C y 8 D se presentan los resultados obtenidos del efecto de la adición de fuentes de carbono o nitrógeno en la actividad de la enzima vainillina deshidrogenasa al inicio (5h) y al final (30h) de la biotransformación.

En la Figura 8 C se observa que en el control y el SMA hubo un incremento de la actividad de la vainillina deshidrogenasa al cabo de 30 h (4 y 1.6 veces, respectivamente) respecto al control; fenómeno similar al encontrado en la actividad de la feruloil CoA sintetasa. Este comportamiento

es acorde a la formación de AV y GY descrita en las cinéticas de biotransformación (sección 6.1.2). Por otro lado, la actividad enzimática de la vainillina deshidrogenasa por efecto de la adición de glucosa como co-sustrato, no mostro diferencias respecto al control y al SMA tanto al inicio (5 h) como al final (30 h) de la biotransformación. Estos resultados son congruentes lo encontrado en el apartado 6.1.2. en el que se atribuía un efecto de ralentización del catabolismo del AF por efecto de la glucosa. Aunado a lo anterior los resultados presentados en esta sección, si bien no presentan diferencias ($p>0.05$), se aprecia una ligera reducción en la velocidad de formación de AV con respecto al control y al SMA.

Por otro lado, la adición de maltosa presentó un comportamiento similar al control sin diferencias significativas (Figura 8C), exhibiendo un valor de actividad enzimática de vainillina deshidrogenasa 8 veces mayor a las 30 h en comparación con el valor inicial a las 5 h. Curiosamente la maltosa, al igual que la glucosa, incrementó el estado energético celular y la formación de ATP, empero, la maltosa no exhibió un efecto de ralentización del catabolismo del AF y de su degradación.

Los niveles de actividad enzimática de la vainillina deshidrogenasa por adición de extracto de levadura o peptona de caseína, a las 30 h mostraron incrementos de 14 y 1.7 veces, respectivamente con relación al tiempo inicial (5 h). Este comportamiento es acorde con los resultados obtenidos en la sección 6.1.3. que mostraron un catabolismo acelerado del catabolismo del AF y de la degradación de VAN, donde péptidos y/o compuestos generados tengan un efecto de inducción en enzimas involucradas en la β-oxidación y/o con la degradación de VAN.

6.4. Ciclos Continuos de Biotransformación para la Producción de VAN

La figura 9 describe los resultados obtenidos a partir de dos ciclos de biotransformación de AF. Se observa que la producción específica de VAN (Figura 9A) en el control presenta diferencias ($p<0.05$), mostrando una reducción del 55% entre el primer y el segundo ciclo. Esta reducción concuerda con los estudios de Contreras-Jácquez y col. (2020) en los que se describe un fenómeno de inducción de moléculas formadas por el estrés oxidativo, que podrían generarse debido a la disponibilidad limitada de oxígeno en el sistema. Estas moléculas podrían modificar la afinidad del

regulador transcripcional MarR para regular la síntesis de enzimas involucradas con la *β*-oxidación en *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, lo cual puede ser reflejado en una mayor tasa de síntesis de dichas enzimas, que implica una mayor producción de ácido vainillínico que también es congruente con lo obtenido en este trabajo (figura 9 B). Así también, otro de los factores a los que se puede atribuir estos resultados es el gasto energético que supone la biotransformación del AF debido al consumo de ATP utilizado por la feruloil CoA sintetasa que, conllevaría a una mayor demanda de NADH, que ocasiona un desbalance en la relación NAD^+/NADH y, por tanto, en el estado redox celular.

En un estudio similar, Zheng y col. (2019) obtuvieron rendimientos molares de 28% y 30 % en el 1er y 2do ciclo de biotransformación, utilizando 3.5 g de células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 y 16 g/L de AF como sustrato durante 24 horas, mientras que, en este trabajo se alcanzó rendimientos molares de obtención de VAN de 42 y 24 % en el 1er y 2do ciclo, respectivamente. Estas diferencias podrían deberse al consumo de AF que en el estudio de Zheng y col. (2019) fue de 65 y 99% en el 1er y 2do ciclo respectivamente, en tanto que el consumo en este trabajo fue de 99% en ambos ciclos. Así también, las diferencias podrían atribuirse a la concentración del sustrato y la cantidad de biomasa de cada unidad experimental, dado que en este trabajo se aplicó únicamente 5 g/L de AF para la biotransformación y 4.0 g de biomasa. Si bien, en este trabajo en el primer ciclo se obtuvo un rendimiento más alto, en el segundo ciclo se vio atenuada la producción de VAN. Lo anterior apunta a que se suscitó el fenómeno de inducción anteriormente reportado por Contreras-Jácquez y col. (2020) y en consecuencia se produjo mayor cantidad de ácido vainillínico (Figura 9B) con el control.

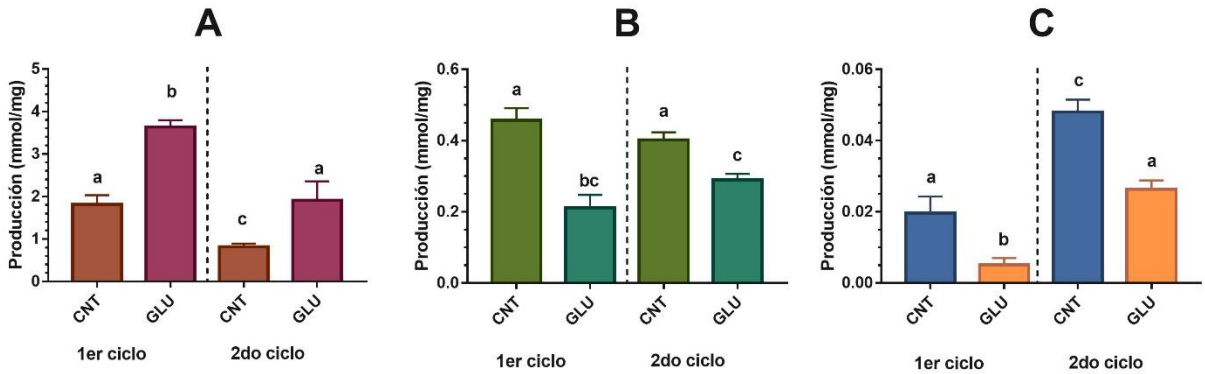


Figura 9. Ciclos continuos de biotransformación del AF en cultivo sumergido utilizando células en reposo de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. Resultados obtenidos a partir de dos ciclos mostrando (A) producción

específica de VAN, (B) AV, (C) GY. Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer, $p<0.05$).

Como estrategia para el restablecimiento energético, se estudió también el efecto de la glucosa en dos ciclos de biotransformación, debido a que en los apartados anteriores mostró un efecto positivo en la acumulación de VAN y en la regeneración del ATP intracelular. La glucosa como co-sustrato durante el primer ciclo de biotransformación alcanzó una producción de VAN de 3.63 mM/mg de biomasa que corresponde al doble del valor obtenido usando únicamente AF (1.81 mM/mg de biomasa). Por otro lado, en el segundo ciclo de biotransformación la adición de glucosa como co-sustrato el segundo ciclo se alcanzó una producción de VAN de 1.91 mM/mg de biomasa que es similar al valor alcanzado por el control en el primer ciclo (1.81 mM/mg de biomasa) y corresponde a 2.3 veces el valor obtenido con el control en el segundo ciclo (0.83 mM/mg de biomasa).

Así también, la producción de AV (Figura 9B) utilizando glucosa como co-sustrato durante dos ciclos de biotransformación del AF, mostró reducciones del 50 y 30% en el 1er y 2do ciclo respecto al control. Asimismo, la producción de GY (Figura 9C) mostró reducciones de 75% y 45% en el 1er y 2do ciclo, respectivamente con relación al control. Estos resultados sustentan a los obtenidos en apartados anteriores, donde el incremento del estado energético celular por la adición de glucosa reduce la degradación de la VAN y esto se ve reflejado en un mayor rendimiento de VAN en un segundo ciclo de biotransformación, atenuando el efecto de inducción por AF y moléculas producidas por el estrés oxidativo sobre las enzimas involucradas en la vía de la β-oxidación.

7. CONCLUSIONES

El uso de fuentes de carbono como co-sustratos para la bioconversión del AF en cultivo sumergido, tales como glucosa y maltosa regeneran el ATP intracelular, el principal cofactor necesario para la bioconversión del AF. De estas dos fuentes, el uso de glucosa incrementó notablemente el rendimiento de VAN y retardó su degradación durante dos ciclos consecutivos de bioconversión, por lo que puede ser considerado como un co-sustrato barato y funcional para elevar la eficiencia del proceso.

Al contrario, fuentes de nitrógeno, como extracto de levadura y peptona de caseína usadas como co-sustratos, no regeneran el ATP intracelular y aceleran los procesos metabólicos de degradación de VAN y la producción de AV por la vía de la β-oxidación. Asimismo, se evidenció la aceleración de la degradación del AV y GY, los cuales son utilizados como fuente de carbono para la producción de biomasa. Debido a lo anterior las fuentes de nitrógeno evaluadas en este estudio no son una alternativa útil para la regeneración de cofactores para la bioconversión del AF en VAN.

8. RECOMENDACIONES

Evaluar diferentes concentraciones de glucosa adicionada como co-sustrato durante la biotransformación del AF, con la finalidad de encontrar cual es la concentración óptima que incrementa la producción de VAN.

Examinar el efecto de la añadir de glucosa como co-sustrato durante más de dos ciclos de biotransformación del AF, tanto en la producción de VAN, como en la viabilidad celular de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116.

Estudiar el comportamiento de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, al agregar de glucosa como co-sustrato, en la biotransformación del AF en un sistema de lote alimentado.

Analizar el efecto de la oxigenación en cultivos sumergidos de *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, sobre los cambios en su morfología y su efecto en la producción de vainillina.

9. REFERENCIAS

Achterholt S. Priefert H. y Steinbüchel A. 2000. Identification of Amycolatopsis sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. Applied Microbiology and Biotechnology. 54(6): 799-807.

Akram M. 2014. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. Cell Biochemistry and Biophysics. 68(3): 475-478.

Asaff Torres A. Macias Ochoa R. M. y De la Torre Martinez M. (2009). Patente mexicana MX 2008 012689 A. Proceso para producir vainillina a partir de microorganismos inmovilizados por cultivo de superficie.

Baltz R. H. Demain A. L. y Davies J. E. 2010. Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press. 745 pp. 439-459.

Banerjee G. y Chattopadhyay P. 2019. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. Journal of the Science of Food and Agriculture. 99(2): 499-506.

Baqueiro-Peña I. Rodríguez-Serrano G. González-Zamora E. Augur C. Loera O. y Saucedo-Castañeda G. 2010. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of Aspergillus niger. Bioresource Technology. 101(12): 4721-4724.

Barghini P. Montebove F. Ruzzi M. y Schiesser A. 1998. Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by Pseudomonas fluorescens BF13 cells. Applied Microbiology and Biotechnology. 49(3): 309-314.

Berg J. M. Tymoczko J. L. y Stryer L. 2002. Biochemistry. WH Freeman. octava edición. New York. 843 pp. 341-359.

Bernd S. 2014. Flavours and Fragrances. Springer. Segunda edición. Berlin, Heidelberg. 831 pp. 108-119.

Bertram R. Schlicht M. Mahr K. Nothaft H. Saier M. H. y Titgemeyer F. 2004. In Silico and Transcriptional Analysis of Carbohydrate Uptake Systems of Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of Bacteriology. 186(5): 1362-1373.

Bomgardner M. M. (2016). The problem with vanilla. Chemical & Engineering News. Recuperado de: https://cen.acs.org/articles/94/i36/problem-vanilla.html

Bradford M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72(1-2): 234-254.

Buswell J. A. y Ribbons D. W. 1988. Vanillate O-demethylase from Pseudomonas species Methods in Enzymology Academic Press. pp. 294-301.

Calisti C. Ficca A. G. Barghini P. y Ruzzi M. 2008. Regulation of ferulic catabolic genes in Pseudomonas fluorescens BF13: involvement of a MarR family regulator. Applied Microbiology and Biotechnology. 80(3): 475-483.

Cavarelli J. Eriani G. Rees B. Ruff M. Boeglin M. Mitschler A. Martin F. Gangloff J. Thierry J. C. y Moras D. 1994. The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional

aspects of the aminoacylation reaction. The EMBO Journal. 13(2): 327-337.

Ciriminna R. Fidalgo A. Meneguzzo F. Parrino F. Ilharco L. M. y Pagliaro M. 2019. Vanillin: The Case for Greener Production Driven by Sustainability Megatrend. ChemistryOpen. 8(6): 660-667.

Civolani C. Barghini P. Roncetti A. R. Ruzzi M. y Schiesser A. 2000. Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by Means of a Vanillate-Negative Mutant of Pseudomonas fluorescens Strain BF13. Applied and Environmental Microbiology. 66(6): 2311-2317.

Contreras-Jácquez V. Rodríguez-González J. Mateos-Díaz J. C. Valenzuela-Soto E. M. y Asaff-Torres A. 2020. Differential Activation of Ferulic Acid Catabolic Pathways of Amycolatopsis sp. ATCC 39116 in Submerged and Surface Cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 192: 494-516.

Chambers A. H. Moon P. Edmond V. y Bassil E. 2019. Vanilla Cultivation in Southern Florida. EDIS. 6: 7.

Chen C. Pan J. Yang X. Xiao H. Zhang Y. Si M. Shen X. y Wang Y. 2017. Global transcriptomic analysis of the response of Corynebacterium glutamicum to ferulic acid. Archives of Microbiology. 199(2): 325-334.

Chen H.-P. Chow M. Liu C.-C. Lau A. Liu J. y Eltis L. D. 2012. Vanillin Catabolism in Rhodococcus jostii RHA1. Applied and Environmental Microbiology. 78(2): 586-588.

Davies J. E. y Demain A. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, DC: American society for microbiology. Tercera edición. 766 pp. 439-459.

Dutta R. 2008. Fundamentals of biochemical engineering. Anne Book India. Primera edición. India. 292 pp. 92-126.

Ehrmann M. Ehrle R. Hofmann E. Boos W. y Schlösser A. 1998. The ABC maltose transporter. Molecular Microbiology. 29(3): 685-694.

Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC 1334/2008 C.F.R. (2008).

Fache M. Boutevin B. y Caillol S. 2016. Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 4(1): 35-46.

FAOSTAT. (2018). Vainilla production quantity. En linea: Recuperado de: http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC

Felix G. Emilio G. y Santos V. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview [J]. Biochem Eng J. 49(3): 289-307.

Fleige C. Hansen G. Kroll J. y Steinbüchel A. 2013. Investigation of the Amycolatopsis sp. Strain ATCC 39116 Vanillin Dehydrogenase and Its Impact on the Biotechnical Production of Vanillin. Applied and Environmental Microbiology. 79(1): 81-90.

Fleige C. Meyer F. y Steinbüchel A. 2016. Metabolic Engineering of the Actinomycete Amycolatopsis sp. Strain ATCC 39116 towards Enhanced Production of Natural Vanillin. Applied and Environmental Microbiology. 82(11): 3410-3419.

Gallage Nethaji J. y Møller Birger L. 2015. Vanillin–Bioconversion and Bioengineering of the

Most Popular Plant Flavor and Its De Novo Biosynthesis in the Vanilla Orchid. Molecular Plant. 8(1): 40-57.

Garcia-Fuentes A. R. Wirtz S. Vos E. y Verhagen H. 2015. Short review of sulphites as food additives. European Journal of Nutrition & Food Safety: 113-120.

Graf N. y Altenbuchner J. 2014. Genetic engineering of Pseudomonas putida KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(1): 137-149.

Group I. (2020). Vanilla and Vanillin Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2019-2024. En linea: Recuperado de: https://www.imarcgroup.com/vanilla-vanillin-market

Grove A. 2013. MarR family transcription factors. Current Biology. 23(4): 142-143.

Gubbens J. Janus M. Florea B. I. Overkleeft H. S. y van Wezel G. P. 2012. Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in Streptomyces coelicolor by quantitative proteomics. Molecular Microbiology. 86(6): 1490-1507.

Havkin-Frenkel D. y Belanger F. C. 2011. Handbook of vanilla science and technology. Wiley Online Library. Segunda edición. New York, USA. 500 pp. 377-389.

Hazleton L. Tusing T. Zeitlin B. Thiessen R. y Murer H. 1956. Toxicity of coumarin. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 118(3): 348-358.

Hwang K.-S. Kim H. U. Charusanti P. Palsson B. Ø. y Lee S. Y. 2014. Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 32(2): 255-268.

Jeff G. (2018). Vanilla prices slowly drop as crop quality improves. Kansas city: Food Business News. Recuperado de: https://www.foodbusinessnews.net/articles/13570-vanilla-prices-slowly-drop-as-crop-quality-improves

Jonsbu E. Ellingsenc T. E. y Nielsen J. 2000. Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by Streptomyces noursei. The Journal of Antibiotics. 53(12): 1354-1362.

Kallscheuer N. Vogt M. Kappelmann J. Krumbach K. Noack S. Bott M. y Marienhagen J. 2016. Identification of the phd gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in Corynebacterium glutamicum. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(4): 1871-1881.

Karode B. Patil U. y Jobanputra A. 2013. Biotransformation of low cost lignocellulosic substrates into vanillin by white rot fungus, Phanerochaete chrysosporium NCIM 1197. 12: 281-283.

Kasai D. Kamimura N. Tani K. Umeda S. Abe T. Fukuda M. y Masai E. 2012. Characterization of FerC, a MarR-type transcriptional regulator, involved in transcriptional regulation of the ferulate catabolic operon in Sphingobium sp. strain SYK-6. FEMS Microbiology Letters. 332(1): 68-75.

Kaur B. y Chakraborty D. 2013. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. Applied Biochemistry and Biotechnology. 169(4): 1353-1372.

Kirby R. 2005. Actinomycetes and Lignin Degradation. En: A. I. Laskin y J. W. Bennett y G. M.

Gadd y S. Sariaslani (Eds.), Advances in Applied Microbiology Academic Press. pp. 125-168.

Krulwich T. A. Sachs G. y Padan E. 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. Nature Reviews Microbiology. 9(5): 330-343.

Leonardi R. y Jackowski S. 2007. Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A. EcoSal Plus. 2(2).

Liao C.-H. Yao L. Xu Y. Liu W.-B. Zhou Y. y Ye B.-C. 2015. Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112(51): 15630-15635.

Ma X.-k. y Daugulis A. J. 2014. Effect of bioconversion conditions on vanillin production by Amycolatopsis sp. ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation. Bioprocess and Biosystems Engineering. 37(5): 891-899.

Magni G. Amici A. Emanuelli M. Raffaelli N. y Ruggieri S. 1999. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology_ Mechanism of Enzyme Action. pp. 292.

Mallinson S. J. B. Machovina M. M. Silveira R. L. Garcia-Borràs M. Gallup N. Johnson C. W. Allen M. D. Skaf M. S. Crowley M. F. Neidle E. L. Houk K. N. Beckham G. T. DuBois J. L. y McGeehan J. E. 2018. A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion. Nature Communications. 9(1): 2487.

Meyer F. Netzer J. Meinert C. Voigt B. Riedel K. y Steinbüchel A. 2018. A proteomic analysis of ferulic acid metabolism in Amycolatopsis sp. ATCC 39116. Applied Microbiology and Biotechnology. 102(14): 6119-6142.

Motedayen N. Ismail M. B. y Nazarpour F. 2013. Bioconversion of ferulic acid to vanillin by combined action of Aspergillus niger K8 and Phanerochaete crysosporium ATCC 24725. African Journal of Biotechnology. 12(47): 6618-6624.

Murillo O. M. (1995). Ficha Técnica de industrialización de Vainilla (pp. 1-14): Dirección de Mercadeo y Agroindustria Area Desarrollo de Producto.

Nichols N. N. y Harwood C. S. 1997. PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from Pseudomonas putida. Journal of Bacteriology. 179(16): 5056-5061.

Nishimura M. Nishimura Y. Abe C. y Kohhata M. 2014. Expression and Substrate Range of Streptomyces Vanillate Demethylase. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 37(9): 1564-1568.

Nothaft H. Parche S. Kamionka A. y Titgemeyer F. 2003. In Vivo Analysis of HPr Reveals a Fructose-Specific Phosphotransferase System That Confers High-Affinity Uptake in Streptomyces coelicolor. Journal of Bacteriology. 185(3): 929-937.

Okai N. Masuda T. Takeshima Y. Tanaka K. Yoshida K.-i. Miyamoto M. Ogino C. y Kondo A. 2017. Biotransformation of ferulic acid to protocatechuic acid by Corynebacterium glutamicum ATCC 21420 engineered to express vanillate O-demethylase. AMB Express. 7(1): 130.

Orelle C. Ayvaz T. Everly R. M. Klug C. S. y Davidson A. L. 2008. Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. Proceedings of the National Academy of Sciences. 105(35): 12837-12842.

Parche S. Nothaft H. Kamionka A. y Titgemeyer F. 2000. Sugar uptake and utilisation in Streptomyces coelicolor: a PTS view to the genome. Antonie van Leeuwenhoek. 78(3): 243-251.

Plaggenborg R. Overhage J. Loos A. Archer J. A. C. Lessard P. Sinskey A. J. Steinbüchel A. y Priefert H. 2006. Potential of Rhodococcus strains for biotechnological vanillin production from ferulic acid and eugenol. Applied Microbiology and Biotechnology. 72(4): 745-755.

Plaggenborg R. Overhage J. Steinbüchel A. y Priefert H. 2003. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in Pseudomonas putida KT2440. Applied Microbiology and Biotechnology. 61(5): 528-535.

Rodrigues Alves A. M. d. C. (1997). Regulation of glucose metabolism in the actinomycetes amycolatopsis methanolica and streptomyces coelicolor A3(2). (Tesis doctoral), Universidad de Groningen, Lisboa.

Romero-Rodríguez A. Rocha D. Ruiz-Villafán B. Guzmán-Trampe S. Maldonado-Carmona N. Vázquez-Hernández M. Zelarayán A. Rodríguez-Sanoja R. y Sánchez S. 2017. Carbon catabolite regulation in Streptomyces: new insights and lessons learned. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 33(9): 1-11.

Romero-Rodríguez A. Rocha D. Ruiz-Villafan B. Tierrafría V. Rodríguez-Sanoja R. Segura-González D. y Sánchez S. 2016. Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in Streptomyces coelicolor. BMC Microbiology. 16(1): 1-16.

Salvachúa D. Werner A. Z. Pardo I. Michalska M. Black B. A. Donohoe B. S. Haugen S. J. Katahira R. Notonier S. Ramirez K. J. Amore A. Purvine S. O. Zink E. M. Abraham P. E. Giannone R. J. Poudel S. Laible P. D. Hettich R. L. y Beckham G. T. 2020. Outer membrane vesicles catabolize lignin-derived aromatic compounds in Pseudomonas putida KT2440. Proceedings of the National Academy of Sciences. 117(17): 9302-9310.

Schmid A. Dordick J. S. Hauer B. Kiener A. Wubbolts M. y Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature. 409: 258-268.

Schrewe M. Julsing M. K. Buehler B. y Schmid A. 2013. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C–O functional group introduction and modification. Chemical Society Reviews. 42(15): 6346-6377.

Shen Y. Han C. Liu B. Lin Z. Zhou X. Wang C. y Zhu Z. 2014. Determination of vanillin, ethyl vanillin, and coumarin in infant formula by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. Journal of Dairy Science. 97(2): 679-686.

Shuler M. L. y Kargi F. 1992. Bioprocess Engineering Basic Concepts. Prentice Hall. Segunda edición. Estados Unidos de America. 553 pp. 412-420.

Singh Y. K. (2002). Effect of impurity on crystal growth and morphology of some non linear optical crystals. (Tesis doctoral), V. B. S. Purvanchal University, India.

Streit F. Corrieu G. y Béal C. 2010. Effect of Centrifugation Conditions on the Cryotolerance of Lactobacillus bulgaricus CFL1. Food and Bioprocess Technology. 3(1): 36-42.

Świątek M. A. Gubbens J. Bucca G. Song E. Yang Y.-H. Laing E. Kim B.-G. Smith C. P. y van Wezel G. P. 2013. The ROK Family Regulator Rok7B7 Pleiotropically Affects Xylose Utilization, Carbon Catabolite Repression, and Antibiotic Production in Streptomyces coelicolor. Journal of Bacteriology. 195(6): 1236-1248.

Tan M. Liew S. Maskat M. Y. Aida W. W. y Osman H. 2015. Optimization of vanillin production using isoeugenol as substrate by Aspergillus niger I-1472. International Food Research Journal. 22(4): 1651.

Tilay A. Bule M. y Annapure U. 2010. Production of Biovanillin by One-Step Biotransformation Using Fungus Pycnoporous cinnabarinus. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(7): 4401-4405.

Van Wezel G. P. Mahr K. König M. Traag B. A. Pimentel-Schmitt E. F. Willimek A. y Titgemeyer F. 2005. GlcP constitutes the major glucose uptake system of Streptomyces coelicolor A3(2). Molecular Microbiology. 55(2): 624-636.

van Wezel G. P. White J. Bibb M. J. y Postma P. W. 1997. The malEFG gene cluster of Streptomyces coelicolor A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. Molecular and General Genetics MGG. 254(5): 604-608.

van Wezel G. P. White J. Young P. Postma P. W. y Bibb M. J. 1997. Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by Streptomyces coelicolor A3 (2) is controlled by malR, a member of the lacI–galR family of regulatory genes. Molecular Microbiology. 23(3): 537-549.

Waldmann H. y Drauz K. 2002. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook, Vols. I-III. Wiley-VCH. Segunda edición. Dortmund, Alemania. 1559 pp. 185-254.

Walton N. J. Mayer M. J. y Narbad A. 2003. Vanillin. Phytochemistry. 63(5): 505-515.

Wink J. Mohammadipanah F. y Hamedi J. 2017. Physiology of Actinobacteria. Springer International Publishing. Primera edición. Iran. 395 pp. 151-172.

Wohlleben W. Mast Y. y Reuther J. 2010. Regulation of nitrogen assimilation in Streptomycetes and other actinobacteria. En: P. Dyson (Eds.), Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology Caister Academic Press. Swansea, UK. pp. 125-136.

Zenk M. H. Ulbrich B. Busse J. y Stöckigt J. 1980. Procedure for the enzymatic synthesis and isolation of cinnamoyl-CoA thiolesters using a bacterial system. Analytical biochemistry. 101(1): 182-187.

Zhao Z. Xian M. Liu M. y Zhao G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for biofuels, 13*, 21.

Zheng L. Zheng P. Sun Z. Bai Y. Wang J. y Guo X. 2007. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by Aspergillus niger and Pycnoporus cinnabarinus. Bioresource Technology. 98(5): 1115-1119.

Zheng P. Li H. Wang X. Zhou J. y Chu S. (2019). Patente United States US 10,351,817 B2. Amycolatopsis sp. Strain and methods of using the same for vanillin production.

Zolnerciks J. K. Andress E. J. Nicolaou M. y Linton K. J. 2011. Structure of ABC transporters. Essays in biochemistry. 50(1): 43.