

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

▶ APLICACIONES ENERGÉTICAS, ▶
AMBIENTALES Y ALTERNATIVAS



ROSALBA ARGUMEDO DELIRA
GABRIELA SÁNCHEZ VIVEROS
ALEJANDRO ALARCÓN
JESSICA VIRIDIANA GARCÍA MEZA
(coordinadores)



Universidad Veracruzana

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

◀ APLICACIONES ENERGÉTICAS ▶
AMBIENTALES Y ALTERNATIVAS

Quehacer científico y tecnológico

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Sara Ladrón de Guevara

Rectora

María Magdalena Hernández Alarcón

Secretaria Académica

Salvador Tapia Spinoso

Secretario de Administración y Finanzas

Octavio Ochoa Contreras

Secretario de Desarrollo Institucional

Édgar García Valencia

Director Editorial

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

◀ APLICACIONES ENERGÉTICAS ▶
AMBIENTALES Y ALTERNATIVAS

ROSALBA ARGUMEDO DE LIRA
GABRIELA SÁNCHEZ VIVEROS
ALEJANDRO ALARCÓN
JESSICA VIRIDIANA GARCÍA MEZA
(coordinadores)

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
XALAPA, VER., MÉXICO
2018

uetación y collage digital de forros: Jorge Cerón

Primera edición,

D. R. © Universidad Veracruzana

Dirección Editorial

Hidalgo núm. 9, Centro, CP 91000

Xalapa, Veracruz, México

Apartado postal 97

diredit@uv.mx

Tel./fax (01228) 8 18 59 80; 8 18 13 88

Impreso en México

Printed in Mexico

CONTENIDO

Prólogo, 11

SECCIÓN 1. GENERALIDADES Y APLICACIONES ENERGÉTICAS, 13

**.1.
LA MICROBIOLOGÍA Y SUS APLICACIONES
POTENCIALES, 15**

*Ronald Ferrera Cerrato, Alejandro Alarcón,
Nayelli Ayatzol Vidal Martínez y Erick Herrera Jiménez*

**.2.
PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL USANDO
MICROALGAS, 45**

Alfredo de Jesús Martínez Roldán y Rosa Olivia Cañizares Villanueva

.3.
MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA
PARA LA GENERACIÓN DE METANO, 69

*José Ramón Laines Canepa, José Aurelio Sosa Olivier
y Karla Cristel Cámara Moguel*

SECCIÓN 2. APLICACIONES
AMBIENTALES, 13

.4.
PRODUCCIÓN MICROBIANA
DE ELECTRICIDAD, 85

*Liliana Alzate Gaviria, Ruby Valdez Ojeda
y Daniella Esperanza Pacheco Catalán*

.5.
BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA APLICADA
A CONTAMINANTES ORGÁNICOS, 117

*Alejandro Alarcón, Rosalba Argumedo Delira
Ronald Ferrera Cerrato y María Esther Díaz Martínez*

.6.
BIORREMEDIACIÓN MICROBIANA APLICADA
A CONTAMINANTES INORGÁNICOS, 145

*Daniel González Mendoza, Onécimo Grimaldo Juárez
Carlos Ceceña Durán y Gabriela Sánchez Viveros*

.7.
BIORREMEDIACIÓN POR MICROALGAS, 161

*Rosa Olivia Cañizares Villanueva
y Alfredo de Jesús Martínez Roldán*

.8.
ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN DE
XENOBIÓTICOS DE USO AGROPECUARIO, 185
David Antonio Moreno Medina y Sharma Ashutosh

.9.
CIENCIAS GENÓMICAS APLICADAS A LA
BIORREMEDIACIÓN, 215
Fernando Carlos Gómez Merino y Libia Iris Trejo Téllez

SECCIÓN 3. APLICACIONES ALTERNATIVAS, 13

10.
SÍNTESIS MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS, 237
*Mariana Peña Martínez, Francisco J. Cervantes
y José Luis Rodríguez López*

.11.
BIOFERTILIZANTES DE RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO
Y SU POTENCIAL AGRÍCOLA, 267
*Juan J. Almaraz Suárez, Cristina Heredia Acuña,
Vivian Quiroz Sarmiento y Deisy Y. Pineda Mendoza*

.12.
HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS EN
LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS PARA EL DESARROLLO
FORESTAL SUSTENTABLE, 293
*Jesús Pérez Moreno, Faustino Hernández Santiago
y Magdalena Martínez Reyes*

.13.
BIOMINERÍA MICROBIANA, 327
Jessica Viridiana García Meza

.14.
BIOTRANSFORMACIÓN MICROBIANA DE
MOLÉCULAS ORGÁNICAS, 345
*Oscar García Barradas, María Remedios Mendoza López
y Mario Ordoñez*

.15.
RECUPERACIÓN MICROBIANA DE METALES A
PARTIR DE FUENTES SECUNDARIAS, 375
Rosalba Argumedo Delira, María Esther Díaz Martínez

BIOTRANSFORMACIÓN MICROBIANA DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS

Oscar García Barradas,¹ María Remedios Mendoza López²
y Mario Ordoñez³

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, la biotransformación es la modificación de compuestos químicos mediante la acción de organismos vivos o preparaciones de enzimas a los que se denomina biocatalizadores (Wermuth *et al.*, 1998). Estos biocatalizadores pueden ser tanto enzimas como células, y pueden ser empleadas bajo muy diferentes condiciones como enzimas libres, células completas, enzimas inmovilizadas/células completas, en sistemas acuosos o sistemas de dos fases. Pueden ser usadas para llevar a cabo reacciones regio y estereoselectivas o para generar quiralidad en formas que podrían ser muy difíciles o imposibles de llevar a cabo mediante procesos clásicos de síntesis química.

Las biotransformaciones fueron observadas por los humanos desde antes de comprender que los microorganismos constituían la causa subyacente de éstas; por ejemplo, la pudrición de los alimentos y los produc-

¹ Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana (osgarcia@uv.mx).

² Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana.

³ Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

tos de la fermentación microbiana han sido disfrutados por el hombre desde hace miles de años. Sin embargo, fue hasta 1858 cuando Pasteur proporcionó evidencia acerca del rol que desarrollan microorganismos específicos en la fermentación del jugo de uva. La biotransformación del etanol a ácido acético (vinagre) por *Acetobacter* fue probablemente desarrollada de manera concomitante con la producción de etanol a partir de azúcares fermentables, y probablemente también la conversión de etanol a vinagre fue el primer proceso real de biotransformación aplicado a nivel industrial; sin embargo, las propiedades de las enzimas y el principio de la biocatálisis comenzó a ser comprendido a partir de diversos estudios cinéticos realizados en 1900 por Michaelis y Menten. La producción de sustancias estratégicas en época de guerra motivó el desarrollo de nuevos procesos de biotransformación; tal es el caso del proceso de fermentación a escala industrial dirigido hacia la producción de acetona para cubrir las necesidades de la Gran Bretaña en 1916 (Glazer y Kikaido, 2007).

En el cuadro 14.1 se mencionan algunos de los ejemplos más significativos en la historia de las biotransformaciones aplicadas. En general, las transformaciones microbianas ofrecen muchas ventajas sobre los métodos químicos convencionales, y particularmente las transformaciones en las que se emplean levaduras han sido extensamente utilizadas desde los primeros días de la existencia humana para la producción de pan, productos lácteos y la elaboración de bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza.

CUADRO 14.1. Algunas biotransformaciones relevantes industrialmente y procesos biocatalíticos seleccionados (Leresche y Meyer, 2006)

Año	Proceso
5000 a. c.	Producción de vinagre
800 a. c.	Hidrólisis de la caseína con quimosina para la producción de queso
1670	Proceso para la biooxidación industrial de etanol a ácido acético (Proceso Orleans)
1680	Anton van Leeuwenhoek, primero en observar los microorganismos con su microscopio
1987	E. Buchner, descubre que las enzimas producidas por las levaduras convierten los azúcares en alcohol
1934	Biooxidación regioselectiva de sorbitol a sorbosa para la producción de vitamina C, mediante el proceso Reichstein
1940	Inversión de la sacarosa mediante una invertasa
1950	Bioconversión de esteroides
1970	Hidrólisis de la penicilina al ácido 6-aminopenicilánico

(Continúa)

1973	Primeros experimentos exitosos de ingeniería genética
1974	Isomerización de glucosa a fructosa con glucosa isomerasa inmovilizada
1985	Proceso enzimático para la producción de acrilamida
1990	Obtención de insulina humana a partir de insulina porcina mediante hidrólisis por proteasa
1995	Establecimiento de una planta para la biotransformación de nicotinitrilo a nicotinamida

Estas primeras aplicaciones emplearon mezclas de cultivos de microorganismos, y las operaciones biotecnológicas estuvieron dirigidas principalmente a la agricultura y a la nutrición humana. En 1862, Pasteur estableció las bases científicas de una de esas primeras aplicaciones, la oxidación de alcohol a ácido acético, utilizando un cultivo puro de *Bacterium xylinum* (Brown, 1886). Asimismo, la oxidación de glucosa a ácido glucónico por *Acetobacter aceti* y de sorbitol a sorbosa por *Acetobacter* sp. fueron estudiadas por Boutroux en 1880 y por Bertrand en 1896, respectivamente. La acción reductora de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue observada por primera vez en 1874 por Dumas, quien demostró que la adición de azufre finamente pulverizado a una suspensión fresca de levadura en una solución de azúcar libera sulfuro de hidrógeno.

La primera reducción bioquímica consistió en la reducción de furfural a alcohol furfuril por levaduras vivas, bajo condiciones de fermentación anaerobia (Windisch, 1898; Lintner y von Liebig, 1911). A estas siguieron diversas biotransformaciones, bioconversiones, biodegradaciones y fermentaciones microbianas o enzimáticas, las cuales acompañaron invariablemente el nacimiento de un nuevo campo de estudio (Mori y Sugai, 1983). Originalmente, las biotransformaciones fueron aclamadas como una solución que podría desplazar a la química orgánica tradicional (Eveleigh, 1981; Maugh, 1983); sin embargo, los métodos bioquímicos representan actualmente una poderosa herramienta sintética que complementa a otras metodologías en la química orgánica sintética moderna. En este sentido, las biotransformaciones poseen una serie de ventajas cuando se comparan con los correspondientes métodos químicos; económicamente, algunas biotransformaciones pueden ser más baratas, más directas que sus análogos químicos, y normalmente la conversión procede bajo condiciones consideradas como ambientalmente aceptables (Hanson, 1995). En las biotransformaciones, las enzimas o las células completas proporcionan un notable incremento en la velocidad de la reacción, así como en la especificidad para exhibir una alta estereoselectividad sobre las reacciones correspondientes (Whitesides y Wong, 1985).

Las transformaciones microbianas ofrecen la ventaja de operar con una alta selectividad a pH no extremo, cercano a la temperatura ambiente y a niveles bajos de subproductos tóxicos (Rathbone y Bruce, 2002). Las biotransformaciones con enzimas de microorganismos recombinantes han sido ampliamente utilizadas, incluyendo aplicaciones para la producción de hormonas, antibióticos y químicos muy particulares (Schmid *et al.*, 2001; Faber, 2011). Las enzimas o las células completas representan los sistemas catalíticos más eficientes conocidos para reacciones químicas convencionales. En muy corto tiempo, los procesos de biotransformación han ganado una gran importancia como intermediarios en la síntesis química, principalmente si las reacciones no son posibles, o si lo son pero con un gran esfuerzo. Estas reacciones han sido ampliamente documentadas en el caso de mezclas racémicas, o bien, las dirigidas a la incorporación de grupos funcionales individuales de diversas moléculas.

El aislamiento y la purificación de enzimas relevantes a menudo puede resultar costosa y complicada. Los biocatalizadores de células completas pueden ser más baratos y simples de obtener que las enzimas aisladas, pero pueden adicionar contaminantes a la mezcla de reacción. En las células completas, las membranas y las paredes celulares protegen a las enzimas de los factores externos que podrían afectarlas, mientras que los cofactores enzimáticos pueden ser regenerados dentro de la célula bajo ciertas condiciones. Una cascada de reacciones, tal como la necesaria para la producción de esteroides, puede ser lograda por un biocatalizador de células completas sencillo; sin embargo, el control y la reproducibilidad de las bioconversiones con células completas son más difíciles de lograr que con un proceso enzimático, y generalmente ocurren reacciones secundarias. Las células usadas como biocatalizador pueden ser empleadas en forma libremente suspendida o inmovilizadas, y pueden estar en diversos estados fisiológicos: viables y en crecimiento, viables, pero sin crecimiento y no viables. En el último caso, no ocurrirá la regeneración *in situ* de los cofactores. Una buena comparación de las diversas formas del biocatalizador ha sido publicada por Straathof y Adlercreutz (2000). Así mismo, van der Werf *et al.* (1997) discuten las oportunidades de la biotransformación microbiana y las dificultades asociadas con la implementación de estas biotransformaciones a escala industrial.

14.1. ¿POR QUÉ USAR LA BIOTRANSFORMACIÓN?

Existen dos razones principales por las que alguien podría querer emplear la biotransformación: la capacidad de los microorganismos, por ejemplo,

las bacterias, para producir grandes cantidades de biomasa y una gran variedad de enzimas en un corto tiempo. Debido a su pequeño tamaño (0.5 m a 1.5 m), las bacterias son los organismos con mayor proporción superficie/volumen, lo que les permite maximizar su metabolismo debido al gran intercambio de moléculas y metabolitos a través de su superficie. Con las condiciones de cultivo apropiadas, los microorganismos crecen exponencialmente de acuerdo con la ecuación 14.1:

$$x_t = x_o e^{(\mu \cdot t)} \quad [\text{Ec. 14.1}]$$

donde X_o es la concentración de biomasa al tiempo cero o al inicio del cultivo. X_t es la concentración de biomasa al tiempo de la cosecha y μ es la constante específica de crecimiento de la cepa.

Algunas de las bacterias de más rápido crecimiento tienen un peso de 10^{-12} g y teóricamente son capaces de duplicarse y crecer tan rápido que su biomasa podría alcanzar la masa de la Tierra (9×10^{54} toneladas) en menos de una semana. Esto significa que si una cepa bacteriana produce una enzima que puede ser utilizada industrialmente, teóricamente se pueden obtener grandes cantidades de enzimas a precio reducido.

La mayoría de los microorganismos también son capaces de crecer bajo diversas condiciones y sobre una gran variedad de sustratos. Esta flexibilidad metabólica requiere que estos microorganismos sean también capaces de producir cientos de enzimas diferentes para todo el surtido de reacciones que deben desarrollar. Sin embargo, estas enzimas no se sobreproducen de manera natural, pero sí son reguladas de acuerdo con las necesidades fisiológicas de las células. Además, estas enzimas solamente se producen y funcionan bajo condiciones ambientales determinadas en algún periodo del tiempo.

Resulta claro que la elección entre la biotransformación y la tecnología química estará determinada por el desarrollo comercial de la estrategia sintética seleccionada sobre una molécula objetivo-específica. Existe un número de tecnologías químicas bien establecido para introducir quiralidad en una molécula donde la biotransformación podría no ser competitiva y, por el contrario, el metabolismo microbiano podría ser muy útil en aquellos casos en los que no existe una solución química o no se cuenta con alguna estrategia posible dentro del amplio arsenal de transformaciones químicas. La pregunta es ¿cuál de estas dos tecnologías podría dominar en una transformación química en particular?

14.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS PROCESOS DE BIOTRANSFORMACIÓN

En términos generales, un proceso de biotransformación ofrece diversas ventajas. Generalmente las biotransformaciones se llevan a cabo empleando biocatalizadores muy eficientes (enzimas/células completas) y son ambientalmente aceptables:

- Los biocatalizadores operan bajo condiciones suaves de temperatura (20 °C a 40 °C), presión atmosférica y pH neutro o en un rango cercano a la neutralidad (5 a 8).
- Como los biocatalizadores son compatibles, diversas reacciones de biotransformación pueden ser desarrolladas en un matraz; esto es aplicable para procesos secuenciales en los que se utilizan sistemas multienzimas, ya que el aislamiento de intermediarios inestables puede ser omitido.
- Los biocatalizadores poseen una alta selectividad, quimiospecificidad, regioselectividad y enantioselectividad.
- Los biocatalizadores pueden llevar a cabo reacciones que no son posibles a través de síntesis química convencional o que no son económicamente factibles mediante la síntesis química tradicional.
- Las biotransformaciones son procesos amigables con la naturaleza, por lo que se clasifican como química verde.

Entre las principales desventajas que pueden atribuirse a este tipo de procesos, destacan:

- En biotransformación, los catalizadores requieren de parámetros de operación muy controlados; si una reacción procede lentamente bajo ciertos parámetros, existe solamente un pequeño margen de alteración que puede conducir a la inactivación de la enzima/proteína.
- La mayoría de las veces, el desplazamiento de una reacción de biocatálisis de un medio acuoso a un medio orgánico no resulta factible y reduce su actividad; los biocatalizadores despliegan mayor actividad catalítica en condiciones acuosas; sin embargo, el agua es el disolvente menos deseado para la mayoría de los compuestos orgánicos.
- Muchas reacciones biocatalíticas son propensas a inhibición por sustratos o por productos, lo cual provoca que las enzimas/células

completas dejen de funcionar a concentraciones altas de sustratos o de productos.

- Las enzimas como un biocatalizador existen en forma enantioméricamente pura y sensible a condiciones extremas de temperatura, pH, etcétera.
- Algunos biocatalizadores pueden provocar alergias.

14.3. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES BIOQUÍMICAS DE BIOCATALIZADORES RELEVANTES

Las enzimas son las herramientas de la biocatálisis y son clasificadas y categorizadas por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, la cual es una subdivisión de la Federación de Bioquímica (Schomburge, 1998). Se sabe que las enzimas catalizan una gran variedad de reacciones químicas y se clasifican en seis clases, de acuerdo con el tipo de transformación que desarrollan (Ager, 1999; Hoh y Villela-Filho, 2006), las cuales ya han sido mencionadas en el capítulo 8 de este libro.

La gran mayoría de las enzimas utilizadas para biotransformación en química orgánica son empleadas en forma cruda y son relativamente baratas. Las preparaciones típicamente contienen entre 1% y 30% de la enzima; el resto son proteínas inactivas, estabilizadores, *buffers* salinos y carbohidratos del caldo de fermentación del que fueron aisladas. Con frecuencia, las preparaciones crudas son más estables que las enzimas purificadas. Dada la importancia que han adquirido los procesos de biotransformación en la preparación de sustancias, tanto de interés comercial como científico, a continuación se mencionan algunos de los grupos de compuestos en los que se ha desarrollado mayor investigación.

14.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS

Durante siglos, los aceites esenciales de las plantas fueron la fuente principal de sustancias aromáticas. Cuando las estructuras de los compuestos presentes en esos aceites esenciales fueron determinadas, se recurrió a la síntesis química para disponer de mayores cantidades de los mismos. Sin embargo, en la actualidad, muchas sustancias aromáticas aún son extraídas a partir de sus fuentes vegetales, debido a la preferencia del consumidor por los productos naturales (McNutt *et al.*, 1986). No obstante, la creciente demanda de aromas naturales ha provocado la escasez de diversas especies vegetales. Tal es el caso de los aromas de menta y

de fresas. Para contrarrestar este problema, los métodos biotecnológicos ofrecen una alternativa viable para la producción de aromas naturales.

En los alimentos han sido identificados cerca de 6300 compuestos químicos volátiles. La compleja mezcla química responsable del aroma de un alimento en particular puede contener cerca de 1000 compuestos diferentes; muchos de estos contribuyen al aroma global del alimento en particular, aunque generalmente solo unos pocos de ellos contribuyen de manera mayoritaria al perfil característico del mismo.

Los métodos biotecnológicos pueden ser usados para la producción de mezclas complejas, así como para la producción de compuestos puros; sin embargo, no existe mucha información en la literatura sobre la producción biotecnológica de mezclas complejas. La producción de estas mezclas complejas requiere de una continua evaluación sensorial del caldo de fermentación, y la industria de los aromas sí produce mezclas complejas de aromas específicos mediante métodos biotecnológicos; pero esto ocurre bajo total secrecía. El uso más prometedor de los métodos de producción biotecnológica en la industria de los aromas parece ser la producción de compuestos característicos de aromas específicos (Welsh *et al.*, 1989; Janssens *et al.*, 1992). El método biotecnológico para la producción de aromas puros puede ser dividido en dos grupos: fermentación y biotransformación. La fermentación involucra la síntesis *de novo* utilizando microorganismos que crecen sobre sustratos de bajo costo, tales como carbohidratos. Ejemplos de aromas producidos a escala industrial por fermentación son: butanoato y citrato. Por su parte, la biotransformación y la bioconversión involucran la alteración (simple o multietapas) de un precursor o intermediario a un producto más valioso, tanto química como comercialmente (Berger *et al.*, 1999).

Los terpenos son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y constituyen apropiados precursores y sustratos para la generación de sustancias de amplio interés comercial. Terpenos tales como el limoneno y al -pineno están disponibles en grandes cantidades a un costo bajo. En las plantas, los terpenos desarrollan principalmente funciones ecológicas, particularmente como disuasivos contra el ataque de los herbívoros, defensas antifúngicas y como atrayentes de los polinizadores (Langenheim, 1994). En los mamíferos, están involucrados en la estabilización de membranas celulares, rutas metabólicas y como reguladores de reacciones enzimáticas. Un ejemplo de estos son el colesterol y los esteroides relacionados, los cuales son triterpenos derivados de 6 unidades de isopreno que desarrollan funciones específicas en el organismo. Las hierbas y las plantas contienen terpenoides, y sus derivados oxigenados han sido utilizados como fragancias y saborizantes durante siglos.

Actualmente se conocen más de 22 000 terpenoides individuales, haciendo de estos el grupo más abundante de productos naturales (referencia). En los últimos años, los terpenos han adquirido mayor importancia comercial, debido a que se ha logrado una mayor comprensión de las funciones que desarrollan en la prevención y terapia de diversas enfermedades (incluido el cáncer), su actividad como insecticidas naturales y como agentes microbianos, propiedades que pueden ser útiles para el almacenamiento de productos agrícolas, así como para la generación de intermediarios clave para la síntesis de compuestos de alto valor agregado.

La biotransformación de los terpenos resulta de gran interés debido a que permite la producción de fragancias y saborizantes en forma enantioméricamente pura bajo condiciones de reacción suaves, además de que los productos obtenidos mediante este tipo de procesos pueden ser considerados como “naturales”. El uso industrial de los monoterpenos como sustitutos de los clorofluorocarbonos es también un campo floreciente (Kirchner, 1994). Los terpenos pueden ser usados como sustitutos de los disolventes clorados en aplicaciones tales como la limpieza de componentes electrónicos y cables, el desengrasado de metales y la limpieza de partes de aeronaves, entre otras (Brown *et al.*, 1992).

Diversos estudios indican que existe una variedad de bacterias y de hongos filamentosos del suelo capaces de biotransformar monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos; sin embargo, la mayoría de los procesos para la biotransformación de monoterpenos resulta más de interés académico que práctico, y ninguno de estos procesos ha sido comercializado aún. Los principales problemas encontrados para ello son: la baja solubilidad en agua de los monoterpenos precursores, la inestabilidad química, la alta volatilidad y la alta citotoxicidad tanto de precursores (monoterpenos) como de productos (terpenoides), y el bajo rendimiento de la transformación.

Algunos ejemplos de la utilidad de la biotransformación en la producción de sustancias de interés comercial son los casos del alcohol de patchulol, el cual puede ser hidroxilado regioselectivamente mediante un aislado de microorganismos de suelo (*Pithomyces sacchari* ATCC 24323, *P. cynodontis* ATCC 26150, *P. chartarum* ATCC 22637 y *P. atro-olivaceus* IFO 6651) a 10-hidroxipatchoulol con un rendimiento menor de 1.2 g/L en una fermentación de 5 L. Posteriormente el 10-hidroxipatchoulol puede ser convertido químicamente a nor-patchoulenol, el componente principal del aceite esencial del patchuli (Suhara *et al.*, 1981). Así mismo, la bioconversión de -ionona por la acción de diversos hongos permite la producción de sustancias con aromas de tabaco. De igual modo, esclareólide

y ambrox, dos sustancias de utilidad en perfumería pueden generarse utilizando esclareol como sustrato mediante la acción de *Cryptococcus* (Cheetham, 1993). Estos ejemplos demuestran la amplia utilidad de las biotransformaciones en el campo de la perfumería.

14.5. BIOTRANSFORMACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias empleadas para nuestra defensa contra microorganismos, como bacterias no endógenas. Típicamente son fármacos antibacterianos que interfieren con alguna estructura o proceso esencial para el crecimiento de la bacteria o para la supervivencia de la misma. Su descubrimiento, realizado por Alexander Fleming en 1928, permitió contar por primera vez con una terapia contra las enfermedades infecciosas, que constituían la mayor causa de muerte en ese tiempo. En los años ochenta y noventa, la lucha contra la mayoría de los agentes infecciosos parecía haberse ganado, tanto que en muchas compañías la investigación y el desarrollo de capacidades fueron reducidos o al menos no se incrementaron. Sin embargo, en todas partes del mundo, los agentes bacterianos nuevamente están a la ofensiva (Begley, 1994).

Las razones son diversas: la falta de higiene, la falta de medidas contra transmisores de enfermedades tales como los roedores, o la falta de salud en general, como es el caso de pacientes con sistemas inmunitarios severamente comprometidos y, finalmente, el progresivo desarrollo de resistencia de muchas bacterias contra los antibióticos β -lactámicos. Vivimos una era en la que la resistencia a los antibióticos se ha incrementado de forma alarmante y en la que las frecuentes predicciones acerca de la falta de fármacos antibacterianos efectivos son cada vez mayores. La situación puede ser muy bien marcada como una carrera entre el progreso de la medicina y el desarrollo de resistencia de las bacterias. Tras 70 años de uso clínico, que se iniciaron con la administración de penicilina a un paciente con sepsis estafilocócica en 1941, los β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales.

A pesar de que no se dispone de ningún β -lactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el aumento incesante de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares han condicionado que exista una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos (Marín y Gudiol, 2003). La estructura química básica que define a la familia de los antibióticos β -lactámicos es precisamente la presencia del anillo β -lactámico, a partir del cual se han originado diversos grupos: las

penicilinas, las cefalosporinas, las carbapenemas, las monobactamas y los inhibidores de las β -lactamasas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al sistema de anillos característico. Además, poseen una cadena lateral que varía de una penicilina a otra en la posición 6 del anillo β -lactámico y que es la que define sus propiedades. Las cefalosporinas, por su parte, son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiazínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo β -lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas (figura 14.1).

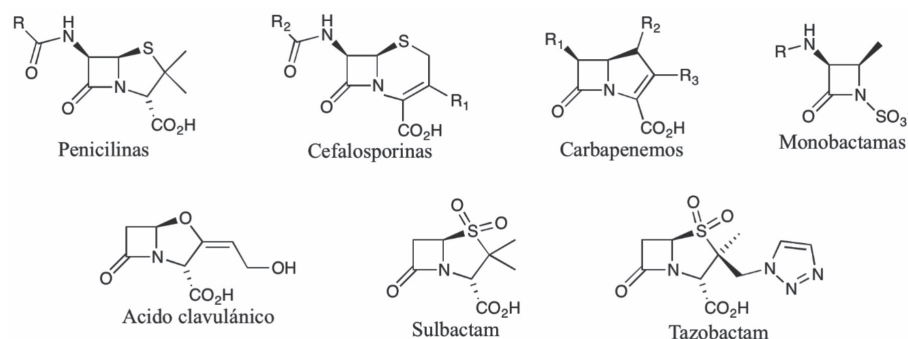


Figura 14.1. Modificaciones en las cadenas laterales llevadas a cabo por microorganismos, originando diversas cefalosporinas.

La estructura básica de las carbapenemas consiste de un anillo β -lactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, así como el incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las β -lactamasas, siendo los β -lactámicos los de más amplio espectro y actividad. Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA); poseen una estructura -lactámica sencilla, con una estructura monocíclica en la que el anillo -lactámico no está fusionado a otro secundario.

En el momento actual, únicamente se emplean en clínica inhibidores de las -lactamasas de estructura química β -lactámica. El ácido clavuláni-

co tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las - lactamasas), y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico. El tazobactam se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3.

Cuando se inició la extracción de penicilina, el hongo *Penicillium notatum* se hacía crecer sobre la superficie de un medio de cultivo simple durante 5 a 10 días. El líquido sobre el cual crecía el hongo contenía penicilina con una actividad real equivalente a 0.006-0.012 mg L⁻¹ de penicilina benzóica pura (penicilina G) (Swartz, 1985). Actualmente, la producción de penicilina utilizando cepas industriales de *Penicillium chrysogenum* es de 10-20 mg L⁻¹ (Pirt, 1987; Stahl *et al.*, 1987). *Penicillium chrysogenum* es un hongo filamentoso ampliamente utilizado para la producción comercial de penicilinas y cefalosporinas a nivel industrial. El gran avance en la producción de penicilina se obtuvo gracias a los métodos de mutación y de selección de cepas de *P. chrysogenum* productoras de penicilina (Elander, 1981), así como al desarrollo de medios de cultivo específicos y al avance tecnológico en la industria de fermentación.

Las vías metabólicas microbianas de biosíntesis de la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos, incluyendo las enzimas involucradas en los principales pasos metabólicos, se determinaron a finales de la década de los ochenta (Martín *et al.*, 1986; Martín y Liras, 1998; Núesch, *et al.*, 1987). En la figura 14.2., se muestran las rutas biosintéticas microbianas de la penicilina y de la cefalosporina, elaboradas a partir de datos obtenidos de varios microorganismos que producen estos antibióticos. Ningún microorganismo es capaz de llevar a cabo toda la serie de reacciones mostradas, pero todos ellos son capaces de realizar la serie de pasos metabólicos iniciales hasta isopenicilina N, el intermediario común para la formación de todos los antibióticos β -lactámicos (Demain *et al.*, 1982).

La elaboración microbiana de las penicilinas y de las cefalosporinas se lleva a cabo por una serie de reacciones que incluyen, en todos los casos, dos pasos comunes: primero, la formación de tripéptido *L*- α -aminoadipil-*L*-cisteinil-*D*-valina (ACV) por medio de la enzima ACV sintasa; y segundo, la enzima isopenicilina N sintetasa o ciclasa lleva a cabo la conversión del tripéptido ACV a isopenicilina N. En la biosíntesis de la penicilina, la isopenicilina N es convertida a penicilina G por medio de la enzima aciltransferasa.

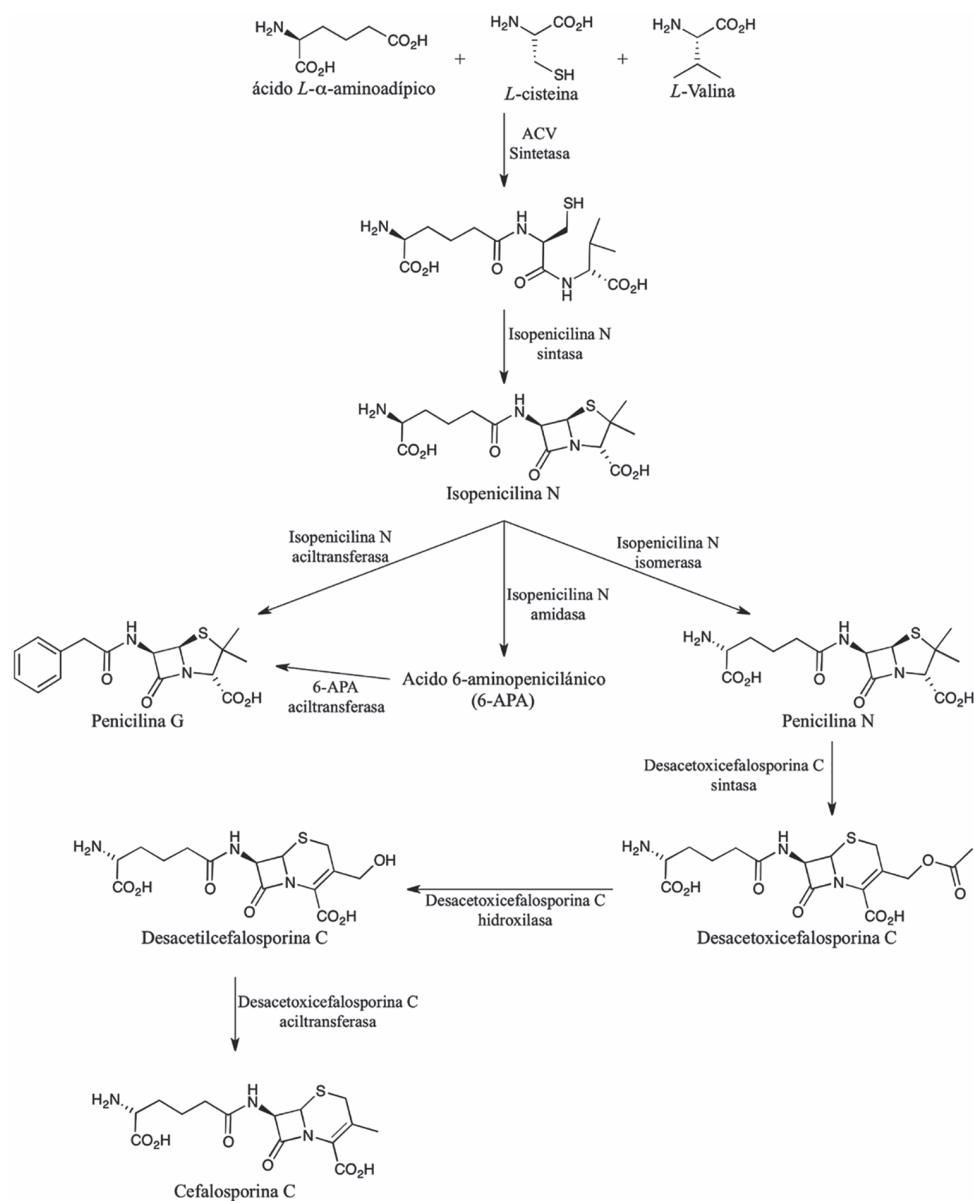


Figura 14.2. Rutas biosintéticas para la obtención de penicilinas y cefalosporinas.

Por su parte, en la ruta biosintética de la cefalosporina, la isopenicilina N es convertida a penicilina N por la enzima isopenicilina N isomerasa. Posteriormente, la penicilina N es convertida a desacetoxicefalosporina C (DAOC) por acción de la enzima desacetoxicefalosporina C sintetasa, también conocida como expandasa. La siguiente transformación es la hidroxilación de DAOC con la enzima desacetoxicefalosporina C hidrolasa, para formar la desacetoxicefalosporina C (DAC). La reacción final en los microorganismos productores de la cefalosporina es la acetilación de

DAC por medio de la enzima acetiltransferasa para formar la cefalosporina C (figura 14.2).

Uno de los primeros procesos industriales de ingeniería enzimática a nivel mundial fue la producción del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) a partir de la penicilina (pen G o pen V), implementado prácticamente por todas las compañías a finales de los setenta. Hoy en día, la industria utiliza las enzimas inmovilizadas también para la producción de los aminoácidos clave, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) y ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Actualmente, la síntesis enzimática de los antibióticos β -lactámicos sobre la base de los aminoácidos clave es el campo en perspectiva de la biotecnología. Los mecanismos de acción de las enzimas, utilizadas en la síntesis y en la transformación de los antibióticos β -lactámicos, así como la cinética y la termodinámica de los procesos catalizados por peptidohidrolasas de diferentes microorganismos, son el objeto estudio de muchas investigaciones. Sin embargo, hoy en día solo existen ejemplos individuales de síntesis enzimática industrial de los antibióticos β -lactámicos, tales como penicilina semisintética amoxicilina, y la cefalosporina cefalexina (Fujii *et al.*, 1976). Posiblemente, la biosíntesis y transformación de antibióticos β -lactámicos es uno de los mejores ejemplos de la aplicación exitosa de la biocatálisis en la fabricación de compuestos diana. Una visión general de las rutas para la obtención de los ácidos 6-aminopenicilánico (6-APA), 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), penicilinas semisintéticas (SSP) y cefalosporinas semisintéticas (SSC) revela que se han logrado importantes avances mediante la aplicación de la fermentación y de la biocatálisis (van de Sandt y de Vroom, 2000).

14.6. BIOTRANSFORMACIÓN DE NITRILOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Las nitrilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de nitrilos orgánicos para producir ácidos carboxílicos y, en algunos casos, amidas como subproductos, y resultan muy atractivos como biocatalizadores, por su utilidad en la manufactura de diversos productos farmacéuticos. La historia de las nitrilasas se remonta a los años sesenta, cuando estas enzimas fueron descubiertas en cepas bacterianas aisladas de la cebada. En estudios posteriores, fueron purificadas y caracterizadas cerca de 20 nitrilasas, principalmente del género *Rhodococcus*. La atención se centró en nitrilasas de hongos filamentosos, considerados como una rica e inexplorada fuente de nitrilasas. Inicialmente, fue examinada la actividad nitrilasa en una colección de

cultivos de hongos filamentosos; esta actividad se encontró principalmente en los géneros *Fusarium* y *Penicillium*. Sin embargo, la producción de la enzima en estos hongos (crecidos en 3-cianopiridina) era, en general, demasiado baja para la purificación y caracterización de la misma.

Las α/β -hidrolasas pertenecientes a la superfamilia de la nitrilasa han sido ampliamente reconocidas como valiosas alternativas a los catalizadores químicos convencionales, ya que han demostrado transformar eficientemente una inmensa variedad de nitrilos orgánicos en condiciones de reacción suaves y, a menudo, en forma estereoselectiva o regioselectiva. Sin embargo, el uso técnico de estas enzimas aún está en desarrollo (Brady *et al.*, 2004; Nelp *et al.*, 2014). Al parecer, esto puede estar causado por diversas limitaciones, las cuales con frecuencia son observadas para enzimas biotecnológicamente relevantes: una baja actividad, baja estabilidad, inapropiada gama de sustratos y competencia con reacciones no enzimáticas (Andexer *et al.*, 2009). Aunque muchas de las biotransformaciones reportadas catalizadas por nitrilasa presentan un uso técnico potencial, en la mayoría de los casos las enzimas y/o las condiciones de los procesos aún necesitan ser mejorados para cubrir las demandas industriales.

En el pasado, la mayoría de las nitrilasas eran obtenidas determinando su actividad mediante ensayos (Martínková *et al.*, 2008); sin embargo, recientemente la minería genómica se ha convertido en el método más empleado para la búsqueda de una gran variedad de enzimas (Seffernick *et al.*, 2009). Las nuevas enzimas obtenidas mediante este enfoque son representantes de diferentes subtipos de nitrilasa que han sido clasificados de acuerdo con la especificidad del sustrato. Nuevas arilacetonnitrilasas con una preferencia por mandelonitrilo fueron descritas en *Burkholderia xenovorans* o *Bradyrhizobium japonicum* (Zhu *et al.*, 2008). Algunas nitrilasas también han sido encontradas en el genoma de algunas Archaea (Podar *et al.*, 2005) y también han sido reportadas las propiedades catalíticas de enzimas de *Synechocystis* sp. (Heinemann *et al.*, 2003) y el termófilo *Pyrococcus abyssi* (Mueller *et al.*, 2006). La primera enzima exhibió una amplia especificidad por el sustrato, a diferencia de la última, que fue específica hacia dinitrilos alifáticos (malononitrilo, fumaronitrilo); sin embargo, una característica única de esta última enzima es su alta termoestabilidad, caracterizada por su vida media de 25 horas (70 °C), 9 horas (80 °C) y 6 horas (90 °C), asociada a la termofilia de *P. abyssi*. Debido a que la utilidad de la mayoría de las nitrilasas está, hasta cierto punto, limitada por su inestabilidad, la investigación de tales enzimas resulta de gran interés. En este sentido, la ingeniería de

proteínas puede ser muy útil en la eliminación de sus limitaciones, en términos de la especificidad del sustrato.

De acuerdo con diversas bases de datos, algunos géneros de hongos filamentosos podrían también ser una rica fuente de nitrilasas (Martinková *et al.*, 2009). Los genes que codifican para nitrilasas han sido encontrados en su mayoría en *Aspergillus*, *Gibberella* y *Penicillium*. Algunas de las enzimas descubiertas fueron similares a las de *Aspergillus niger* (con $\geq 89\%$ de similitud de aminoácidos), la primera nitrilasa fúngica en ser caracterizada y secuenciada bioquímicamente (Kaplan *et al.*, 2006).

Los estudios publicados en los últimos años han ampliado significativamente el alcance de las posibles aplicaciones de las nitrilasas y, por otra parte, algunos de ellos han indicado procesos industrialmente viables, catalizados por nitrilasas. A menudo se ha encontrado un uso cada vez más amplio para arilacetónitrilasas que exhiben de buenas a excelentes enantioselectividades. Nitrilasas con propiedades catalíticas útiles han sido encontradas entre enzimas nativas, cuando un gran conjunto de variantes de la enzima fue analizado. Sin embargo, en la mayoría de los casos parece necesaria una mejora adicional de las enzimas por ingeniería de proteínas, para producir nitrilasas con aplicación técnica.

14.7. BIOTRANSFORMACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas que poseen un grupo metilo en uno de sus extremos, al cual se denomina omega (ω), y un grupo carboxilo en el extremo opuesto (figura 14.3). El átomo de carbono adyacente al grupo carboxilo comúnmente se denomina carbono α y al siguiente se le denomina carbono β .

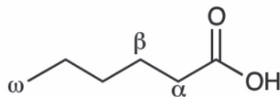


Figura 14.3. Estructura general de los ácidos grasos. El carbono adyacente al grupo carboxilo comúnmente se denomina carbono α , y al siguiente se le denomina carbono β .

La letra n se utiliza también a menudo para indicar la posición del doble enlace más próximo al extremo metilo. La nomenclatura sistemática para los ácidos grasos también puede indicar la ubicación de los dobles enlaces con referencia al grupo carboxilo, empleando la letra griega Δ .

El cuadro 14.2 esboza las estructuras de los diferentes tipos de ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza.

CUADRO 14.2. Ejemplos de ácidos grasos y su nomenclatura

Ácido graso	Estructura	Saturación	w	Δ
Ac. Esteárico		Saturado	18:0	
Ac. Oleico		Monoeno	18:1, ω-9	Δ9
Ac. Linoléico		Polieno	18:2, ω-6	Δ9,12
Ac. α-linolénico		Polieno	18:3, ω-3	Δ9,12, 15
Ac. eicosapentanoico (EPA)		Polieno	20:5, ω-3	Δ5,8, 11,14,17
Ac. Docosahexaenoico (DHA)		Polieno	22:6, ω-3	Δ4,7, 10,13,16, 19

En los ácidos grasos saturados, todos los átomos de carbono se “llean” (se saturan) con átomos de hidrógeno y constituyen cadenas hidrocarbonadas lineales con un número par de átomos de carbono. Los ácidos grasos saturados más comunes contienen de 12 a 22 átomos de carbono. Por su parte, los ácidos grasos monoinsaturados contienen un doble enlace carbono-carbono, que se puede encontrar en diferentes posiciones a lo largo de una cadena hidrocarbonada. La mayoría de los monoenos comunes tienen una longitud de cadena que va de 16 a 22 átomos de carbono y un doble enlace con la configuración *cis*; esto significa que los átomos de hidrógeno en cada lado del doble enlace están orientados en la misma dirección. Los isómeros *trans* generalmente se producen durante el procesamiento industrial de los aceites insaturados, así como en el tracto gastrointestinal de los rumiantes. La presencia de un doble enlace provoca restricción en la movilidad de la cadena; la configuración *cis* provoca una torcedura en la molécula y con esta configuración hace a los ácidos grasos menos estables termodinámicamente que los de configuración *trans*. Generalmente, los ácidos grasos *cis* tienen puntos de fusión más bajos que los *trans* o que los de sus homólogos saturados.

En los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), el primer doble enlace puede encontrarse entre el tercero y el cuarto átomo

de carbono a partir del carbono. Estos son conocidos como ácidos grasos ω -3. Si el primer doble enlace está entre el sexto y el séptimo átomos de carbono, entonces se les denomina ácidos grasos ω -6. Comúnmente, los dobles enlaces en los PUFA están separados uno del otro por un grupo metileno. Los PUFA son producidos solamente por las plantas y el fitoplancton, y son esenciales para el desarrollo de diversas funciones de los organismos superiores, incluyendo mamíferos y peces. Los ácidos grasos ω -3 y ω -6 no se pueden interconvertir, por lo que ambos se consideran nutrientes esenciales.

Además de las importantes funciones antes mencionadas, la biotransformación de los ácidos grasos puede conducir a diversos derivados cuya actividad resulta por demás interesante. Tal es el caso de la hidroxilación sobre los carbonos α , β y ω para la obtención de hidroxiácidos grasos con características y propiedades particulares.

14.7.1. α -Oxidación

Los hidroxiácidos grasos son sustancias comunes en la naturaleza. Los α -hidroxiácidos grasos de cadena larga son constituyentes esenciales de los lípidos cerebrales. Constituyen los componentes mayoritarios de los ácidos grasos encontrados en *Arthrobacter simplex*, donde los extractos libres de células contienen actividad enzimática capaz de convertir al ácido palmítico en ácido α -hidroxipalmítico (Yano *et al.*, 1971). Los esfingolípidos de una amplia variedad de organismos son ricos en α -hidroxiácidos grasos; particularmente, en *Sphingobacterium paucimobilis* el ácido α -hidroximirístico es el componente ácido graso mayoritario (Matsunaga *et al.*, 1997). La α -hidroxilasa de *S. paucimobilis*, responsable de convertir al miristato en α -hidroximiristato, es un miembro de la superfamilia P450 (Matsunaga *et al.*, 2000); sin embargo, dicha enzima utiliza peróxido de hidrógeno en lugar de NADH y oxígeno molecular (Matsunaga *et al.*, 1998).

Dichas enzimas exhiben una alta especificidad de sustrato por reacciones de -hidroxilación. Algunos ejemplos que demuestran la importancia de los derivados α -hidroxilados de ácidos grasos los encontramos en los siguientes casos: una mezcla de ácidos 2-(*D*)-hidroxilados (C14-C18) poseen una importante actividad antimicrobiana contra *Vibrio tyrogenuses* (Kurtzman *et al.*, 1973). Los ácidos 2-hidroxialcanoicos ramificados de cadena corta forman parte de la estructura cíclica de diversos péptidos con actividad antibiótica, tales como esporidesmolidos, amidomicina y valinomicina (Shemyakin *et al.*, 1963).

Aunque aún no se ha determinado la función que desarrolla, en algunas levaduras se ha aislado al metabolito ácido 2-(*D*)-hidroxihexadecanoico (Vesonder *et al.*, 1970). Los 2-hidroxiácidos grasos saturados (C20-C25) son constituyentes encontrados en los fosfolípidos de esponjas marinas (Carballeira *et al.*, 1989), y los 2-hidroxiácidos grasos saturados y monoinsaturados (C22-C24) son constituyentes de los fosfolípidos de un erizo del mar Caribe (Carballeira *et al.*, 1994).

14.7.2. β -oxidación

El proceso de β -oxidación constituye el destino final del metabolismo de los ácidos grasos en los mamíferos. Los ácidos grasos son oxidados en las mitocondrias a través de una secuencia de reacciones en las que la cadena del ácido es acortada dos carbonos cada vez. Durante este proceso son producidos los β -hidroxiácidos grasos. Estos derivados han llegado a ser muy populares como suplementos alimenticios; sin embargo, existen ejemplos que demuestran su importancia y sus funciones en los sistemas vivos. Tal es el caso del ácido 3-hidroxidodecanoico, un constituyente primordial de los péptidos antibióticos isariina (Vining y Taber, 1962) y serratomolidina (Wasserman *et al.*, 1962). Los ácidos grasos 3-hidroxi de 10 a 12 carbonos también forman parte del péptido antibiótico esperina (Thomas, 1969).

El ácido 3-(*D*)-hidroxipalmítico es un metabolito extracelular encontrado en cultivos de la levadura *Saccharomycopsis malanga* NRRL Y-6954 (Vesonder *et al.*, 1968). En *Mucor* sp. A-73, la formación del ácido 3-hidroxialcanoico tiene la función de servir como un mecanismo fisiológico para prevenir la acumulación intracelular de metabolitos indeseables (Tahara *et al.*, 1977). La hidroxilación directa de ácido oleico en la posición C3 de la cadena ocurre de manera común en *Alcaligenes* sp. 5-18, produciendo ácido 3-hidroxioléico y ácido 3-hidroxihexadecenoico (Esaki *et al.*, 1994). La levadura *Dipodascopsis uninucleata* UOFS-Y128 puede transformar ácido araquidónico exógeno en ácido 3-hidroxi-5,8,11,14-eicosatetraenoico (3-HETE), un compuesto que posee actividad en la transducción de señales en los neutrófilos humanos (van Dyk *et al.*, 1991). La regioespecificidad de la hidroxilación de 3-HETE dirige la biosíntesis a través de una ruta de β -oxidación normal; sin embargo, se sugiere una reacción directa de monooxigenasa sobre C3, o bien una especificidad estérica opuesta con 2-enoil-CoA hidratasa. Así mismo, la levadura *Dipodascopsis* también convierte a los ácidos linoleico y (11*Z*,14*Z*,17*Z*)-eicosatrienoico exógenos en metabolitos (3*R*)-hidroxilados de cadena

corta, pero no hidroxila a los ácidos oleico, linolelaidico, γ -linolenico, ni eicosanoico (Venter *et al.*, 1997).

14.7.3. ω -Oxidación

Los ácidos grasos de cadena larga pueden sufrir ω -oxidación para producir ácidos grasos ω -hidroxilados que son subsecuentemente convertidos a ácidos dicarboxílicos. Esta serie de reacciones ha sido observada empleando enzimas de microsomas del hígado y con preparaciones de enzimas solubles de cultivos bacterianos. Los sistemas de enzimas libres de células de *Pseudomonas oleovorans* catalizan la ω -oxidación de ácidos grasos saturados con 8-18 átomos carbonos (Griffith *et al.*, 1978). Los ácidos grasos de cadena mediana (octanoato, decanoato, laurato y miristato) son los sustratos más reactivos, mientras que los ácidos grasos de cadena larga (palmitato y esteareato) se oxidan muy lentamente. Los alcanosatos de menos de seis átomos de carbono no son susceptibles de este tipo de oxidación (Kusunose *et al.*, 1964). El mismo sistema de enzimas también puede catalizar la epoxidación de alquenos y la hidroxilación de alcanos, pero no funciona sobre cadenas hidrocarbonadas de menos de 6 carbonos (May y Abbott, 1972; Abbott y Hou, 1973). El sistema de ω -hidroxilación de *P. oleovorans* (ω -hidroxilasa) requiere para su funcionamiento de iones hierro (Fe^{2+}), NADH, oxígeno molecular y dos coenzimas, rubredoxina y NADH-rubredoxina reductasa. La ω -hidroxilasa forma parte de una gran familia de enzimas funcionalmente diversa que incluye desaturasa, hidroxilasa, acetilasa y epoxidasa, las cuales comparten un mecanismo general para la modificación de ácidos grasos.

14.8. BIOTRANSFORMACIÓN DE ALCALOIDES

Los alcaloides conforman un grupo complejo de compuestos cuya principal característica es la presencia de nitrógeno. Han sido aislados de muy diversas fuentes, incluyendo microorganismos, organismos marinos y plantas, a través de complejas vías biosintéticas (Rathbone y Bruce, 2002). Han sido ampliamente aplicados en el tratamiento de una amplia gama de dolencias médicas como agentes anticancerígenos, antimaláricos y analgésicos, en el tratamiento del mal de Parkinson, la hipertensión y en trastornos del sistema nervioso central. La biotransformación de los alcaloides por microorganismos ha sido recientemente revisada por Rathbone y colaboradores (2001), quienes llevaron a cabo una recopilación sobre el progreso de las biotransformaciones de este tipo de sustan-

cias desde mediados de la década de los ochenta, así como de los sistemas enzimáticos implicados. En este sentido, se ha realizado un gran esfuerzo dirigido hacia la identificación de nuevos catalizadores biológicos para la biotransformación de alcaloides; los sistemas de transformación microbiana tienen ventajas sobre los sistemas de una planta, particularmente en que la producción de biomasa puede ser alcanzada de manera rápida y en que los sistemas genéticos microbianos generalmente pueden ser mejor comprendidos.

Es así que las transformaciones microbianas pueden simular eficientemente el catabolismo de los mamíferos y, por lo tanto, podrían permitir la producción de productos intermediarios útiles o metabolitos en cantidades lo suficientemente altas como para permitir la identificación, toxicidad y uso mediante estudios farmacológicos y biológicos. La expresión individual de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los alcaloides en huéspedes heterólogos, tales como las bacterias, permite el análisis detallado de los mecanismos catalíticos que operan, los cuales no necesariamente pueden ser conocidos en un proceso químico orgánico sintético. A continuación, se mencionan algunos ejemplos sobre la biotransformación de algunos de los alcaloides más ampliamente conocidos y estudiados.

14.9. TRANSFORMACIONES MICROBIANAS COMO RUTAS DE PRODUCCIÓN PARA COMPUESTOS CONOCIDOS

La compleja naturaleza policíclica de muchos alcaloides y la presencia de grupos funcionales pueden hacer de las modificaciones químicas un proceso difícil y tedioso, lo que a menudo conduce a la obtención de bajos rendimientos. Por su parte, las transformaciones microbianas ofrecen el uso de enzimas con una alta estereoespecificidad, eliminando la necesidad de proteger y desproteger grupos funcionales expuestos, lo que representa una atractiva alternativa para el químico sintético dado que, en general, operan a pH y temperatura no extremos y con niveles reducidos de productos residuales tóxicos. Los alcaloides derivados del opio, como la morfina y sus derivados semisintéticos, despliegan propiedades analgésicas, antitusivas o estupefacientes características y dan ejemplo de algunos de los compuestos farmacéuticos más importantes hoy en día. Naturalmente, los alcaloides a menudo actúan como compuestos modelo para la preparación de muchos derivados semisintéticos; por ejemplo, diversos narcóticos agonistas y antagonistas se derivan quími-

camente de tebaína, un componente minoritario del opio. La química involucrada en la *N*-desmetilación de tebaína resulta un proceso complicado y generalmente conduce a bajos rendimientos. Adicionalmente, la tebaína es una sustancia de producción limitada, por lo que esta reacción constituye un objetivo ideal para estudios de biotransformación. Madyastha y colaboradores (2000) identificaron nortebaína como el principal metabolito de la biotransformación de tebaína por *Mucor piriformis*, y sugirieron que la *N*-desmetilación de tebaína no procede a través de un *N*-óxido intermediario como originalmente se había propuesto. Este organismo también fue capaz de *N*-desalquilar diversas variantes de la tebaína, con rendimientos superiores a 80% (figura 14.4).

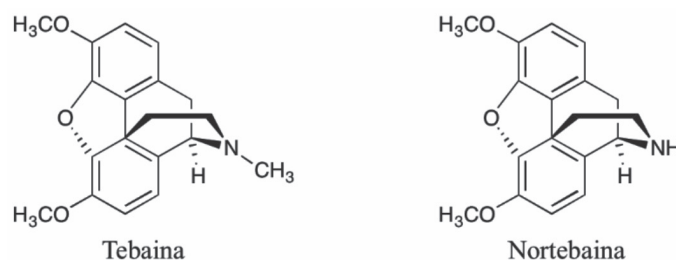


Figura 14.4. Nortebaína, el principal metabolito de la biotransformación de tebaína por *Mucor piriformis*.

Gran parte del análisis sobre la transformación microbiana de los alcaloides tipo morfina ha sido llevada a cabo por Bruce y colaboradores (1990) utilizando *Pseudomonas putida* M10. Esta bacteria fue aislada inicialmente a partir de los residuos industriales de una planta de procesamiento de opiáceos y parece es capaz de usar a la morfina y la codeína para apoyar su crecimiento (Boonstra et al., 2001; Rathbone y Bruce, 2001). Lister y colaboradores (1999) reportaron la hidroxilación de alcaloides de morfina por *P. putida* M10, este proceso representa una importante conversión desde el punto de vista industrial.

A menudo, una pequeña modificación en la estructura provoca un enorme cambio en la potencia o en la actividad del producto obtenido. En este ejemplo, la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 14 de la estructura aumenta considerablemente la potencia analgésica, lo cual es difícil de lograr químicamente, debido a la naturaleza poco reactiva del carbono terciario C14. La codeinona fue identificada como el sustrato que se hidroxila durante la incubación de células completas con codeína, formando 14 β -hidroxicodeinona, que posteriormente fue redu-

cida a 14 β -hydroxycodeine. Adicionalmente, también fue observada la producción de hidrocodona, dihidrocodeína y oxicodona. Los derivados equivalentes también fueron observados en incubaciones con morfina. Madyastha y colaboradores (1998) también identificaron una actividad dependiente de NAD⁺ en especies de *Bacillus* capaces de introducir un grupo hidroxilo en C14 de la morfina y la codeína. La 14-hidroxilación también fue observada cuando se substituyó al grupo N-metilo con grupos alquilo superiores (figura 14.5).

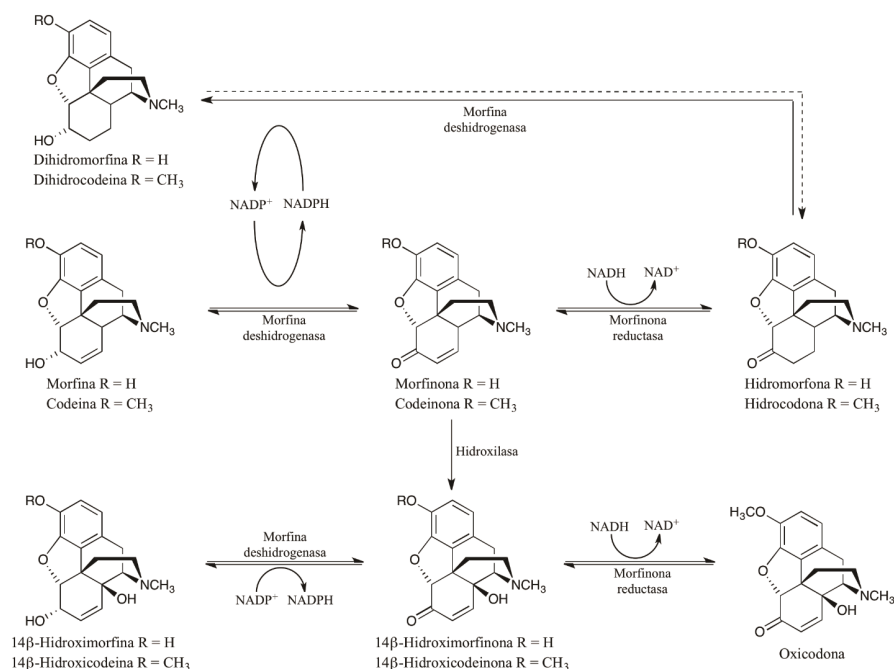


Figura 14.5. Biotransformación de alcaloides derivados de la morfina.

A pesar de la estructura compleja de muchos alcaloides, los microorganismos tienen la capacidad de transformarlos y degradarlos. Con el surgimiento de técnicas moleculares más poderosas, el químico sintético cuenta ahora con una gran cantidad de enzimas catalíticas. El estudio continuo de las transformaciones microbianas de alcaloides, sin duda proporcionará más ejemplos útiles en el futuro cercano. El uso de metodologías moleculares, tales como la evolución forzada, permitirá diseñar enzimas y eliminar cualquier limitación que pueda restringir su uso en procesos de biotransformación, proporcionando además toda una nueva gama de biocatalizadores eficaces. Actualmente los biocatalizadores

pueden ser diseñados para mejorar su actividad, selectividad y especificidad hacia diversos sustratos. Hoy en día es factible crear enzimas quiméricas o alterar dominios funcionales para la creación de nuevos catalizadores con una alta especificidad de sustrato o con las características de reacción deseadas.

REFERENCIAS

- ABBOTT, B. J. y C. T. Hou (1973). "Oxidation of 1-Alkenes to 1,2-Epoxyalkenes by *Pseudomonas oleovorans*", *Appl Microbiol.* 26: 86-91.
- AGER, D. J. (1999). *Handbook of Chiral Chemicals*. Nueva York: Marcel Dekker, pp. 6-8.
- ANDEXER, J. N., J. V. Langermann, U. Kragl y M. Pohl (2009). "How to Overcome Limitations in Biotechnological Processes-Examples from Hydroxynitrile Lyase Applications", *Trends Biotechnol.* 27: 599-607.
- BEGLEY, S. (1994). "The End of Antibiotics", *Newsweek.* 28: 39-43.
- BERGER, R. G., J. A. M. de Bont, G. Eggink, M. M. da Fonseca, M. Gehrke, J. B. Gros, F. van Keulen, U. Krings, C. Larroche, D. J. Leak y M. J. van der Werf (1999). "Biotransformations in the Flavour Industry", K. A. D. Swift (ed.), *Current Topics in Flavors and Fragrances*. Londres: Kluwer Academic Publishers, pp. 139-141.
- BOONSTRA, B., D. A. Rathbone y N. C. Bruce (2001). "Engineering Novel Biocatalytic Routes for Production of Semisynthetic Opiate Drugs", *Biomol Eng.* 18: 41-47.
- BRADY, D., A. Beeton, J. Zeevaart, C. Kgaje, F. van Rantwijk y R. A. Sheldon (2004). "Characterization of Nitrilase and Nitrile Hydratase Biocatalytic Systems", *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 76-85.
- BROWN, A. J. (1886). "The Chemical Action of Pure Cultivation of *Bacterium aceti*", *J Chem Soc.* 49: 172.
- BROWN, L. M., J. Springer y M. Bower (1992). "Chemical Substitution for 1,1,1-Trichloroethane and Methanol in an Industrial Cleaning Operation", *J Hazard Mater.* 29: 179-188.
- BRUCE, N. C., C. J. Wilmot, K. N. Jordan, A. E. Trebilcock, L. D. Gray, L. D. Stephens y C. R. Lowe (1990). "Microbial Degradation of the Morphine Alkaloids: Identification of Morphinone as an Intermediate in the Metabolism of Morphine by *Pseudomonas putida* M10", *Archives of Microbiology.* 154: 465-470.
- CARBALLEIRA, E. M., F. Shalabi y V. Negrón (1989). "2-Hydroxy Fatty Acids from Marine Sponges. 2. The Phospholipid Fatty Acids of the Caribbean Sponges *Verongula gigantean* and *Aplysina archeri*. *Lipids.* 24: 229-232.

- CARBALLEIRA, E. M., F. Shalabi y M. Reyes (1994). "New 2-Hydroxy Fatty Acids in the Caribbean Urchin *Trysneustes esculentus*", *J Na Prod.* 57: 614-619.
- CHEETHAM, P. S. J. (1993). "The Use of Biotransformations for the Production of Flavors and Fragrances", *Trends Biotechnol.* 35: 478-488.
- DEMAIN, A. L., J. Kupka, Y. Q. Shen y S. Wolfe (1982). "Microbiological Synthesis of β -Lactam Antibiotics", H. Humezawa (ed.), *Trends in Antibiotic Research. Genetic, Biosynthesis, Action and New Substances.* Tokio: Japan Antibiotic Research Association, pp. 233-246.
- DUMAS, M. (1874). "Recherches Sur La Fermentation Alcoolique", *Ann Chim Phys.* 3: 57.
- DYK, M. S. van, J. L. F. Kock, D. J. Coetzee, O. P. H. Augustyn y S. Nigam (1991). "Isolation of a Novel Arachidonic Acid Metabolite 3-Hydroxy-5,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid (3-HETE) from the Yeast *Dipodascopsis uninucleata* UOFS-Y128", *FEBS Lett.* 283: 195-198.
- ELANDER, R. P. (1981). "Strain Improvement Programs in Antibiotic β -Producing Microorganisms-Present and Future Strategies", M. Moo-Young, C. W. Robinson y C. Vézina (eds.), *Advances in Biotechnology.* Nueva York: Scientific and Engineering Principles Pergamon Press, pp. 3-9.
- ESAKI, N., S. Ito, W. Blank y K. Soda (1994). "Biotransformation of Oleic Acid by *Alcaligenes* Sp. 5-18, A Bacterium Tolerant to High Concentrations of Oleic Acid", *J Ferment Bioeng.* 77: 148-151.
- EVELEIGH, D. E. (1981). "Microbial Production of Industrial Chemicals", *Sci Am.* 245: 120-130.
- FABER, K. (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook.* 6a. ed., Austria: Springer, pp. 3-9.
- FUJII, T., K. Matsumoto y T. Watanabe (1976). "Enzymatic Synthesis of Cephalixin", *Process Biochem.* 11: 21-24.
- GLAZER, A. N. y H. Kikaido (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology.* 2a. ed., Nueva York: Cambridge University Press, pp. 510-528.
- GRIFFITH, G. R., R. T. Ruettinger, E. J. McKenna y M. J. Coon (1978). "Fatty Acid β -Hydroxylase (Alkane Hydroxylase) from *Pseudomonas oleovorans*", *Methods Enzymol.* 53D: 356-360.
- HANSON, J. R. (1995). "An Introduction to Biotransformation in Organic Chemistry", J. Man (ed.), *Biochemical and Medicinal Chemistry Series.* Nueva York: WH Freeman, pp. 1-89.
- HEINEMANN, U., D. Engels, S. Bürger, C. Kiziak, R. Mattes y A. Stolz (2003). "Cloning of a Nitrilase Gene from the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. Strain PCC6803 and Heterologous Expression and Characterization of the Encoded Protein", *Appl Environ Microbiol.* 69: 4359-4366.

- HOH, C. y M. Villela Filho (2006). "The Enzyme Classification", A. Liese, K. Seelbach y C. Wandrey (eds.), *Industrial Biotransformation*. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 37-62.
- JANSSENS, L., H. L. de Pooter, N. M. Schamp y E. J. Vandamme (1992). "Production of Flavours by Microorganisms", *Process Biochem.* 27: 195-215.
- KAPLAN, O., V. Vejvoda, O. Plíhal, P. Pompach, D. Kavan, P. Bojarová, K. Bezouska, M. Macková y M. Cantarella (2006). "Purification and Characterization of a Nitrilase from *Aspergillus niger* K10", *Appl. Microbiol Biotechnol.* 73: 567-575.
- KIRCHNER, E. M. (1994). "Environment, Health Concerns Force Shift in Use of Organic Solvents", *Chem Eng News.* 72: 13-20.
- KURTZMAN, C. P., R. F. Vesonder y M. J. Smiley (1973). "Formation of Extracellular C14-C18 2-D-Hydroxy Fatty Acids by Species of *Saccharomycopsis*", *Appl Microbiol.* 26: 50-652.
- KUSUNOSE, M., E. Kusunose y M. J. Coon (1964). "Enzymatic -Oxidation of Fatty Acids. I. Products of Octanoate, Decanoate, and Laurate Oxidation", *J Biol Chem.* 239: 1374-1380.
- LANGENHEIM, J. H. (1994). "Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview of their Ecological Roles", *J Chem Ecol.* 20: 1223-1280.
- LERESCHE, E. J. y H. P. Meyer (2006). "Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist", *Org Process Res Dev.* 10: 572-580.
- LINTNER, C. J. y H. J. von Liebig (1911). "The Reduction of Furfural Through Yeast in Alcoholic Fermentation", *HSZ Physiol Chem.* 72: 449-454.
- LISTER, D. L., G. Kanungo, D. A. Rathbone y N. C. Bruce (1999). "Transformations of Codeine to Important Semisynthetic Opiate Derivatives by *Pseudomonas putida* M10", *FEMS Microbiol Lett.* 181: 137-144.
- MADYASTHA, K. M., G. V. B. Reddy, H. Nagarajappa y G. R. Sridhar (2000). "N-Demethylation and N-Oxidation of Thebaine, an Isoquinoline Alkaloid by *Mucor piriformis*", *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem.* 39: 377-381.
- MARÍN, M. y F. Gudiol (2003). "Antibióticos betalactámicos", *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21: 42-55.
- MARTÍN, J. F. y P. Liras (1998). "Enzymes Involved in Penicillin, Cephalosporin and Cephamicyn Biosynthesis", A. Fiechter (ed.), *Advances Biochemical Engineering*. Nueva York: Springer-Verlag, pp. 153-187.
- MARTÍN, J. F., J. López Nieto, J. M. Castro, J. Cortés, J. Romero, F. R. Ramos, J. M. Cantoral, E. Álvarez, M. G. Domínguez, J. L. Barredo y P. Liras (1986). "Enzymes Involved in -Lactam Biosynthesis Controlled by Carbon and Nitrogen Regulation", H. Kelinkauf, H. von Döhren, H. Dornauer y G. Nesseman (eds.), *Regulation of Secondary Metabolite Formation*. Weinheim, VCH, pp. 213-220.

- MARTÍNKOVÁ, L., V. Vejvoda y V. Kren (2008). "Selection and Screening for Enzymes of Nitrile Metabolism", *J Biotechnol.* 133: 318-326.
- MATSUNAGA, I., T. Sumimoto, A. Ueda, E. Kusunose y K. Ichihara (2000). "Fatty Acid Specific, Regiospecific, and Stereospecific Hydroxylation by Cytochrome P450 (CYP152B1) from *Sphingomonas paucimobilis*: Substrate Structure Required For ω -Hydroxylation", *Lipids.* 35: 365-371.
- MATSUNAGA, I., M. Yamada, E. Kusunose, T. Miki y K. Ichihara (1998). "Further Characterization of Hydrogen Peroxide-Dependent Fatty Acid Hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*", *J Biochem.* 124: 105-110.
- MATSUNAGA, I., N. Yokotani, O. Gotoh, E. Kusunose, M. Yamada y K. Ichihara (1997). "Molecular Cloning and Expression of Fatty Acid ω -Hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*", *J Biol Chem.* 272: 23592-23596.
- MAUGH II, T. H. (1983). "Catalysts that Break Nature's Monopoly: Chiral Complexes Can Approach the Specificity of Enzymes for Synthesis of Optically Active Compounds, and Can Act on a Wider Variety of Substrates", *Science.* 221: 351-354.
- MAY, S. W. y B. J. Abbott (1972). "Enzymatic Epoxidation. I. Alkene Epoxidation by the ω -Hydroxylation System of *Pseudomonas oleovorans*", *Biochem Biophys Res Commun.* 48: 1230-1236.
- MCNUTT, K. W., M. Powers y A. E. Sloan (1986). "Food Colors, Flavors, and Safety: A Consumer Viewpoint", *Food Technol.* 40: 72-78.
- MORI, K. y T. Sugai (1983). "Applications of Microorganisms and Enzymes in the Syntheses of Natural Products", *J Synth Org Chem, Jpn.* 41: 1044-1053.
- MUELLER, P., K. Egorova, C. E. Vorgias, E. Boutou, H. Trauthwein, S. Verseck y G. Antranikian (2006). "Cloning, Overexpression, and Characterization of a Thermoactive Nitrilase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*", *Protein Express Purif.* 47: 672-681.
- NELP, M. T., A. V. Astashkin, L. A. Breci, R. M. McCarty y V. Bandarian (2014). "The Alpha Subunit of Nitrile Hydratase is Sufficient for Catalytic Activity and Post-Translational Modification", *Biochemistry.* 53: 3990-3994.
- NÚESCH, J., J. Heim y H. J. Teichler (1987). "The Biosynthesis of Sulfur-Containing β -Lactam Antibiotics", *Ann Rev Microbiol.* 41: 51-75.
- PIRT, S. J. (1987). "Microbial Physiology in the Penicillin Fermentation", *Trends Biotechnol.* 5: 69-72.
- PODAR, M., J. R. Eads y T. H. Richardson (2005). "Evolution of a Microbial Nitrilase Gene Family: A Comparative and Environmental Genomics Study", *BMC Evol Biol.* 5: 42.
- RATHBONE, D. A. y N. C. Bruce (2001). "Novel Biocatalytic Routes to Semisynthetic Opiate Drugs", N. Ahmed, F. Qureshi, O. Khan y U. K. Wymondham (eds.),

- Industrial and Environmental Biotechnology*. Reino Unido: Horizon Press, pp. 113-130.
- RATHBONE, D. A. y N. C. Bruce (2002). "Microbial Transformation of Alkaloids", *Current Opinion Microbiol.* 5: 274-281.
- RATHBONE, D. A., D. L. Lister y N. C. Bruce (2001b). "Biotransformation of Alkaloids", G. A. Cordell (ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. San Diego: Academic Press, pp. 1-74.
- SANDT, E. J. A. X. van der y E. de Vroom (2000). "Innovations in Cephalosporin and Penicillin Production: Painting the Antibiotics Industry Green", *Chimica Oggi.* 18: 72-75.
- SCHMID, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts y B. Witholt (2001). "Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow", *Nature.* 409: 258-268.
- SCHOMBURGE, D. (1998). *Enzyme Handbook*,. Heidelberg: Springer, p. 17.
- SEFFERNICK, J. L., S. K. Samanta, T. M. Louie, L. P. Wackett y M. Subramanian (2009). "Investigative Mining of Sequence Data for Novel Enzymes: A Case Study with Nitrilases", *J Biotechnol.* 143: 7-26.
- SHEMYAKIN, M. M., E. L. Vinogradova, M. Y. Feigina y N. A. Aldanova (1963). "On Structure of Amidomycin and Valinomycin", *Tetrahedron Lett.* 6: 351-356.
- STAHL, U., E. Leitner y K. Esser (1987). "Transformation of *Penicillium chrysegenum* by a Vector Containing a Mitochondrial Origin of Replication", *App Microbiol Biotechnol.* 26: 237-241.
- STRAATHOF, A. J. J. y P. Adlercreutz (2000). *Applied Biocatalysis*. 2a. ed., Londres: Reading Harwood Academic, pp. 1-14.
- SUHARA, Y., S. Itoh, S. Ogawa, K. Yokose, T. Sawada, T. Sano, R. Nimomiya y H. B. Maruyama (1981). "Regio-Selective 10-Hydroxylation of Patchoulol, a Sesquiterpene, by *Pithomyces* Species", *Appl Environ Microbiol.* 42: 187-191.
- SWARTZ, R. W. (1985). "Comprehensive Biotechnology", H. W. Blach, S. Drew y D. I. C. Wang (eds.), *The Principles, Applications and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Oxford: Pergamon Press, pp. 7-47.
- TAHARA, S., Y. Suzuki y J. Mizutani (1977). "Fungal Metabolism of Trans-2-Octenoic Acid Using One of *Mucor* Species", *Agric Biol Chem.* 41: 1643-1650.
- THOMAS, D. W. (1969). "The Revised Structure of the Peptide Antibiotic Esperin, Established by Mass Spectrometry", *Tetrahedron.* 25: 1985-1990.
- VENTER, P., J. L. F. Kock, G. S. Kumar, A. Botha, D. J. Coetzee, P. J. Botes, R. K. Bhatt, J. R. Falck, T. Schewe, S. Nigam (1997). "Production of 3R-Hydroxy-Polyenoic Fatty Acids by the Yeast *Dipodascopsis uninucleata*", *Lipids.* 32: 1277-1283.

- VESONDER, R. F., F. H. Stodola, W. K. Rohwedder y D. B. Scott (1970). "2-D-Hydroxyhexadecanoic Acid: A Metabolic Product of the Yeast *Hansenula sydowiorum*," *Can J Chem.* 48: 1985-1986.
- VESONDER, R. F., L. J. Wickerham y W. K. Rohwedder (1968). "3-D-Hydroxypalmitic Acid: A Metabolic Product of the Yeast NRRL Y-6954", *Can J Chem.* 46: 2628-2629.
- VINING, L. C. y W. A. Taber (1962). "A New Depsipeptide from *Isaria Cretacea*", *Can J Chem.* 40: 1579-1584.
- WASSERMAN, H. H., J. J. Keggi y J. E. McKeon (1962). "The Structure of Serratomolide", *J Am Chem Soc.* 84: 2978-2982.
- WELSH, F. W., W. D. Murray y R. E. Williams (1989). "Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals", *CRC Crit Rev Biotechnol.* 9: 105-169.
- WERF, M. J. van der, J. A. M. de Bont y D. J. Leak (1997). "Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes", *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 55: 147-177.
- WERMUTH, C. G., R. Ganellin, P. Lindberg y L. A. Mistcher (1998). "Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry", *Ann Rep Med Chem.* 33: 385-395.
- WINDISCH, W. (1898). "Wochenschrift für Brauerei", *Chem Zentr.* 15: 189.
- YANO, I., Y. Furukawa y M. Kusunose (1971). "-Oxidation of Long-Chain Fatty Acids in Cell-Free Extracts of *Arthrobacter simplex*", *Biochim Biophys Acta.* 239: 513-516.
- ZHU, D. M., C. Mukherjee, Y. Yang, B. E. Rios, D. T. Gallagher, N. N. Smith, E. R. Biehl y L. Hua (2008). "A New Nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 - Gene Cloning, Biochemical Characterization and Substrate Specificity", *J Biotechnol.* 133: 327-333.

Siendo rectora de la Universidad Veracruzana
la doctora Sara Ladrón de Guevara,
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA. APLICACIONES ENERGÉTICAS
AMBIENTALES Y ALTERNATIVAS
de Rosalba Argumedo de Lira, Gabriela Sánchez Viveros,
Alejandro Alarcón y Jessica Viridiana García Meza (coordinadores)
se terminó de imprimir

La edición fue impresa en papel bond de 90 g
y los forros en cartulina sulfatada de 14 pts.
En su composición se usaron tipos Palatino.