



*Unidad Iztapalapa*

**BIOCONVERSIÓN DE LA FLAVONONA NARINGENINA  
POR CÉLULAS COMPLETAS DE *Y. lipolytica* 2.2ab**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

**M. en B. CHRISTIAN HERNÁNDEZ GUZMÁN**

DIRECTOR

**Dr . SERGIO HUERTA OCHOA**

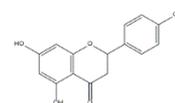
ASESORES

**Dra. LILIA ARELY PRADO BARRAGAN**

**Dr. MIQUEL GIMENO SECO**

*Ciudad de México 28 de enero de 2021.*

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) Nivel Competencia Internacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Y se agradece al CONACyT por la beca otorgada (302006) para la realización de este trabajo.**





BIOCONVERSIÓN DE LA  
FLAVONONA  
NARINGENINA POR  
CÉLULAS COMPLETAS DE *Y.  
lipolytica* 2.2ab.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de enero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DR. MIQUEL GIMENO SECO  
DRA. DULCE MARIA PALMERIN CARREÑO  
DRA. OLGA MIRIAM RUTIAGA QUIÑONES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
DE: CHRISTIAN HERNANDEZ GUZMAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

CHRISTIAN HERNANDEZ GUZMAN  
ALUMNO

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RIGALDE

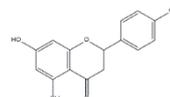
PRESIDENTA  
  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL  
  
DR. MIQUEL GIMENO SECO

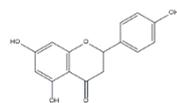
VOCAL  
  
DRA. DULCE MARIA PALMERIN CARREÑO

SECRETARIA  
  
DRA. OLGA MIRIAM RUTIAGA QUIÑONES

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella



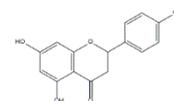
*A mi Madre María Luisa*



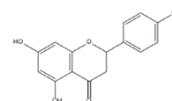
IV

## ÍNDICE

INDICE ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
RESUMEN .....	X
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Compuestos bioactivos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Flavonoides .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Estrés oxidativo .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Antioxidantes .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Biosíntesis de flavonoides en plantas .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Biosíntesis de flavonoides en microorganismos .....</b>	<b>11</b>
<b>1.7. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Objetivo general .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Objetivos particulares.....</b>	<b>17</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1. Reactivos .....</b>	<b>19</b>
<b>5.2. Microorganismo .....</b>	<b>19</b>
<b>5.3. Conteo celular .....</b>	<b>19</b>
<b>5.4. Cinética de crecimiento.....</b>	<b>20</b>
<b>5.5. Peso seco.....</b>	<b>20</b>
<b>5.6. Ensayos de viabilidad celular .....</b>	<b>20</b>
<b>5.7. Producción de compuestos bioactivos en medio superficial .....</b>	<b>21</b>
<b>5.8. Producción de compuestos bioactivos en diferentes medios líquidos .....</b>	<b>21</b>
<b>5.9. Efecto de la concentración de naringenina en los sistemas de producción .....</b>	<b>22</b>
<b>5.9.1. Procedimiento de bioconversión en medio superficial .....</b>	<b>22</b>
<b>5.9.2. Procedimiento de bioconversión en medio líquido .....</b>	<b>23</b>
<b>5.10. Análisis de productos por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....</b>	<b>23</b>
<b>5.11. Análisis del producto por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS/MS) .....</b>	<b>24</b>

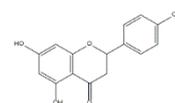


5.12.	Actividad Antioxidante .....	25
5.13.	Flavonoides Totales .....	26
5.14.	Análisis estadístico.....	26
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1.	Producción de compuestos bioactivos en medio superficial .....	29
6.2.	Producción de compuestos bioactivos en medio líquido .....	31
6.2.1.	Cinéticas de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en medio líquido .....	31
6.2.2.	Bioconversión de la naringenina en medio líquido.....	32
6.3.	Efecto de la concentración de naringenina en el proceso de bioconversión.....	39
6.3.1.	Efecto de la concentración de naringenina en medio superficial. ....	39
6.3.2.	Efecto de la concentración de naringenina en medio líquido. ....	40
6.3.3.	Producción de Apigenina.....	42
6.3.4.	Producción de Eriodictiol .....	44
6.3.5.	Producción de Luteolina.....	45
6.3.6.	Producción de Aromadetrina .....	46
6.3.7.	Producción de Quercetina .....	47
6.3.8.	Producción de Ampelopsina .....	47
6.3.9.	Producción de Miricetina .....	48
6.4.	Actividad antioxidante.....	52
VII.	CONCLUSIONES.....	56
VIII.	PERSPECTIVAS .....	59
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
X.	ANEXOS .....	70
10.1.	Abreviaturas .....	70
10.2.	Cronogramas de estándares comerciales de compuestos bioactivos.....	72
10.3.	Análisis estadístico.....	73
10.4.	Publicación.....	76
10.5.	Participación en congresos .....	89

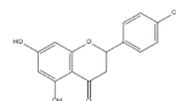


## INDICE ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura genérica de los flavonoides y de las distintas subclases. ....	4
<b>Figura 1.2.</b> Estructura de los grupos de flavonoides más comunes.....	6
<b>Figura 1.3.</b> Estructura de la naringenina. ....	7
<b>Figura 1.4.</b> Hidrólisis de la naringina en prunin, ramnosa, naringenina y glucosa por la naringinasa con actividad $\alpha$ -L-ramnosidasa y $\beta$ -D-glucosidasa.....	7
<b>Figura 1.5.</b> Resumen de la vía biosintética de fenilpropanoide. Abreviaciones de enzimas: CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa.....	11
<b>Figura 5.1.</b> Cepa de <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab utilizada en el proceso de bioconversión. ....	19
<b>Figura 6.1.</b> Cromatograma HPLC correspondiente a la bioconversión de naringenina por <i>Yarrowia lipolytica</i> 2.2ab 192 h de cultivo en PDA posterior a la adición de naringenina como precursor.....	29
<b>Figura 6.2.</b> Cromatograma HPLC-MS/MS correspondiente a la bioconversión de naringenina por <i>Yarrowia lipolytica</i> 2.2ab 192 h de cultivo posterior a la adición de naringenina como precursor.....	30
<b>Figura 6.3.</b> Cinética de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> 2.2 ab en caldo papa dextrosa y caldo dextrosa sabouraud.....	32
<b>Figura 6.4.</b> Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y viabilidad para <i>Y. lipolytica</i> 2.2 ab en CDS. ....	33
<b>Figura 6.5.</b> Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y viabilidad para <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en CPD. ....	34
<b>Figura 6.6.</b> Cromatograma UPLC-MS/MS tras análisis MRM que muestra los picos m/z correspondiente a naringenina y otros compuestos producidos por la bioconversión en los medios a) CDS y b) CPD. ....	35
<b>Figura 6.7.</b> Cromatograma UPLC-MS/MS tras análisis MRM que muestra los picos m/z correspondiente a naringenina y otros compuestos producidos por la bioconversión en buffer de fosfatos; las células provenían de los medios a) CDS y b) CPD.....	37
<b>Figura 6.8.</b> Análisis UPLC-ESI-MS/MS de flavonoides obtenidos por <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en cultivo líquido. ....	41
<b>Figura 6.9.</b> Vía biosintética de flavonoides sugerida para <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en cultivo superficial. Dos enzimas son responsables de la bioconversión de naringenina por <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab, CYP450 (monoxigenasa citocromo P450) y 2-ODG (dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato). ....	44
<b>Figura 6.10.</b> Vía biosintética de flavonoides sugerida para <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en cultivo líquido. Dos enzimas son responsables de la bioconversión de naringenina por <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab, CYP450 (monoxigenasa citocromo P450) y 2-ODG (dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato). ....	51

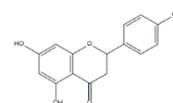


<b>Figura A1.</b> Estándar de naringenina.....	72
<b>Figura A2.</b> Estándares comerciales utilizados en el UPLC-MS/MS.....	72
<b>Figura A3.</b> Análisis UPLC-MS/MS en MRM (a) y HPLC (b) de los medios superficial y líquido esterilizados e inoculados con <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab. Las muestras fueron filtradas para la obtención de fragmentos y no se observan picos en ningún caso. ....	73



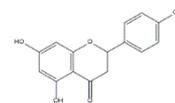
## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Propiedades biológicas de algunos compuestos bioactivos.....	3
<b>Tabla 1.2.</b> Clasificación de antioxidantes. (Modificado de Dabrowska y Moya, 2009; López y col., 2012).....	9
<b>Tabla 5.1.</b> Caldo de cultivo Dextrosa Sabouraud (CDS).....	22
<b>Tabla 5.2.</b> Caldo de cultivo Papa Dextrosa (CPD).....	22
<b>Tabla 6.1.</b> Productos identificados a partir de la bioconversión de la naringenina en medio superficial (PDA). ....	31
<b>Tabla 6.2.</b> Productos en la bioconversión de la naringenina en caldo dextrosa sabouraud y en caldo papa dextrosa. ....	36
<b>Tabla 6.3.</b> Productos identificados en la bioconversión de la naringenina en buffer de fosfatos. ....	38
<b>Tabla 6.4.</b> Concentración de productos en los diferentes medios. ....	38
<b>Tabla 6.5.</b> Concentración de productos de la bioconversión de la naringenina por <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en medio superficial. ....	43
<b>Tabla 6.6.</b> Concentración de luteolina y quercetina de la bioconversión de naringenina por <i>Yarrowia lipolytica</i> 2.2ab en cultivo superficial y líquido. ....	46
<b>Tabla 6.7.</b> Concentración de productos de la bioconversión de la naringenina por <i>Y. lipolytica</i> 2.2ab en medio líquido. ....	49
<b>Tabla 6.8.</b> Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos. ....	54
<b>Tabla A.1.</b> Prueba ANOVA de las concentraciones de los productos identificados en medio superficial.....	73
<b>Tabla A.2.</b> Prueba ANOVA de las concentraciones de los productos identificados en medio líquido. ....	74
<b>Tabla A.3.</b> Prueba ANOVA de los porcentajes de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos en medio superficial.....	74
<b>Tabla A.4.</b> Prueba ANOVA de los porcentajes de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos en medio líquido. ....	75

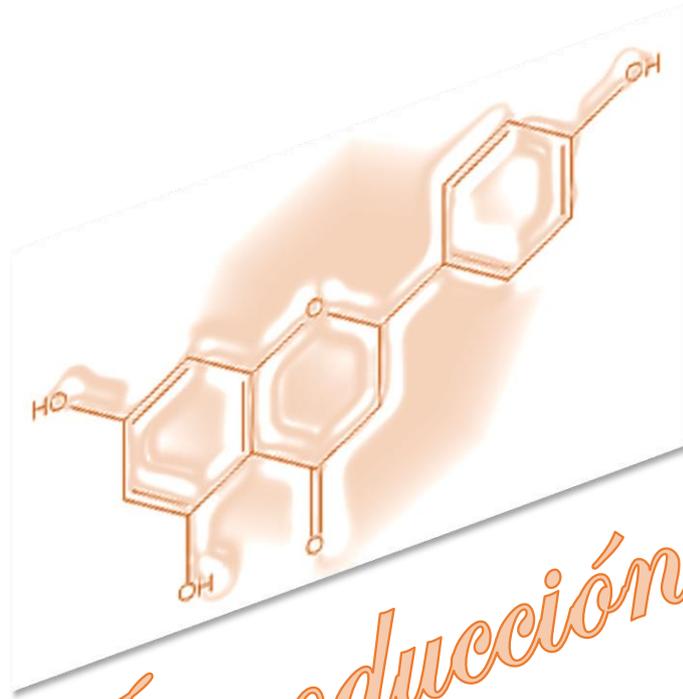


## RESUMEN

En este trabajo se obtuvo con éxito la bioconversión de naringenina bioactiva para la producción de compuestos de mayor valor agregado en cultivo superficial y líquido. Este enfoque es una alternativa a la producción comercial de estos compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales y principalmente de frutas cítricas, que están limitados debido a sus bajas concentraciones y la complejidad de los procesos de purificación. Mediante esta metodología, la transformación microbiana aumentó hasta 57 veces la producción de flavonoides en experimentos con células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab como biocatalizador en medio líquido, en comparación a la producción de flavonoides mediante la extracción *in situ* de organismos vegetales. De la experimentación se obtuvo apigenina, eriodictiol, luteolina, quercetina, aromadetrina, ampelopsina y miricetina, todos compuestos de valor agregado en cultivos de bioconversión tanto superficial como líquido. Algunos de los compuestos producidos no se han reportado previamente como productos de los procesos de bioconversión en medio líquido, como es el caso de la ampelopsina, en el caso del proceso de bioconversión en medio superficial ningún compuesto producido en este trabajo ha sido reportado previamente. Se plantearon vías biosintéticas para la bioconversión de naringenina por células enteras de *Y. lipolytica* 2.2ab. Finalmente, los extractos obtenidos mostraron mayor porcentaje de inhibición de los radicales DPPH• y ABTS•, en comparación con la actividad de la naringenina comercial.



X

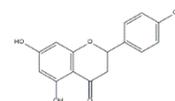


# *Introducción*

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Compuestos bioactivos

Los alimentos de origen vegetales contienen gran variedad de nutrientes y fitoquímicos, también denominados compuestos bioactivos no esenciales en el metabolismo secundario de los vegetales. Por lo que su ausencia en la dieta no genera consecuencias como sucede con los micronutrientes como las vitaminas y algunos minerales. Sin embargo, se ha observado que los compuestos bioactivos pueden tener un impacto significativo en el curso o prevención de ciertas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, diabetes o enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Es por esto que los compuestos bioactivos han ganado gran importancia en los últimos años (Jiménez, 2015; Manach, 2004). Para que un compuesto sea considerado bioactivo debe de ser capaz de aportar un beneficio para la salud más allá de las consideraciones propias de la nutrición elemental (Chalé y col., 2014). Mundialmente, se considera que las dietas bajas en verduras y frutas, principales proveedores de fitoquímicos, son responsables del 1.5 al 4 % de las enfermedades crónico-degenerativas causantes de la mortalidad humana (Hollman, 2014). Entre los compuestos bioactivos se encuentran los compuestos fenólicos o polifenoles, vitaminas C y E, probióticos, prebióticos, carotenoides, terpenoides, éstos poseen importantes propiedades biológicas (Tabla 1.1) y de interés para diversos sectores incluyendo el alimentario y farmacéutico, ya que ambas industrias incorporan compuestos bioactivos en la formulación de sus productos. Estos compuestos poseen una mayor actividad antioxidante en hortalizas, granos y frutas, en el cual existe una correlación con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. (Espín y col., 2007; Heo y col., 2007). Los polifenoles son los compuestos bioactivos naturales más abundantes ampliamente distribuidos en el reino vegetal y generalmente son clasificados en flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, cumarinas y taninos, estos compuestos se caracterizan por realizar importantes funciones contra patógenos, reparan daños producidos por la radiación ultravioleta y la transducción de señales (Fantini y col., 2015; Liu, 2013; Manach y col., 2004).

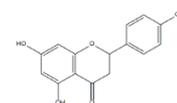


**Tabla 1.1.** Propiedades biológicas de algunos compuestos bioactivos.

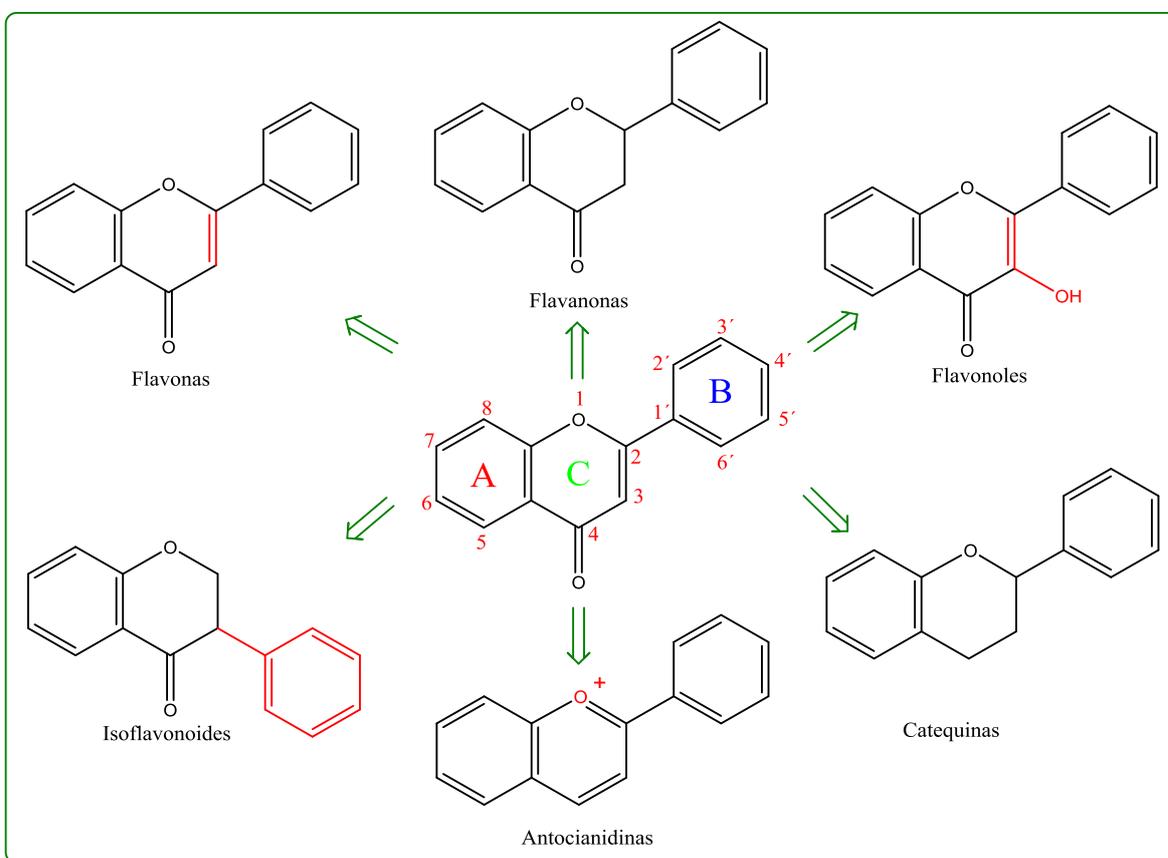
Compuestos bioactivos	Actividad Biológica	Referencias
<b>Probióticos, prebióticos y simbióticos</b>	Regula la circulación intestinal y balancea el microbiota intestinal, reduce problemas asociados a cáncer de colon.	(Arias y col., 2018)
<b>Carotenoides, vitaminas C y E</b>	Promueven la respuesta inmunológica contra el cáncer, tienen propiedades antioxidantes, proporcionan beneficios en la función cognitiva, ocular y cardiovascular.	(Eggersdorfer y Wyss, 2018; Fuentes-Lara y Benavides-Mendoza, 2004)
<b>Terpenoides</b>	Son potencialmente útiles contra el cáncer y las enfermedades inflamatorias.	(González-Vallinas y col., 2013)
<b>Compuestos Fenólicos (Flavonoides)</b>	Actúan como antioxidantes, antibacterianos, antiinflamatorios, hepatoprotectores y propiedades anticancerígenas.	(Chu y col., 2016; Das y Rosazza, 2006; Karabin y col., 2014; Madej y col., 2014)

## 1.2. Flavonoides

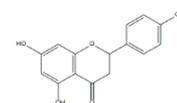
Los flavonoides son los compuestos polifenólicos más abundantes que representan el 60 % de los polifenoles de la dieta y se encuentran distribuidos en vegetales y frutas, así como en el té negro, té verde, el café, la soya, la cocoa, la cerveza, el vino tinto y principalmente en frutas cítricas. Pueden ser desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares mayores a los 30,000 Da (Trueba, 2003; González-Vallinas y col., 2013). Los flavonoides tienen una amplia variedad de actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antiviral, antialérgico, vasodilatadora, pero se caracterizan principalmente por su alta capacidad antioxidante, además de proporcionar protección contra enfermedades cardiovasculares y pueden utilizarse como tratamiento complementario en varios tipos de cáncer (Das y Rosazza, 2006; Karabin y



col., 2014; Madej y col., 2014; Markovic, 2007; Olsen y col., 2010; Ribeiro y col., 2008). La estructura genérica (Figura 1.1) de los flavonoides consta de tres anillos, dos anillos fenólicos denominados anillo A y anillo B unidos a través por un anillo pirona denominado anillo C, la estructura de este último los clasifica en seis subclases diferentes: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, antocianidinas e isoflavonoides (Zhang, 2007). Los flavonoides se diferencian de las subclases en el grado de insaturación y en los sustituyentes del anillo C, mientras que los compuestos individuales, dentro de cada una de estas subclases, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B. De esta forma, se han identificado hasta 5,000 compuestos diferentes (Álvarez y Cambeiro, 2003; Hernández-Guzmán, 2015; Trueba, 2003).

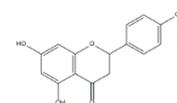


**Figura 1.1.** Estructura genérica de los flavonoides y de las distintas subclases.

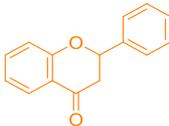
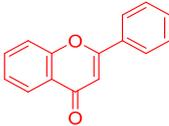
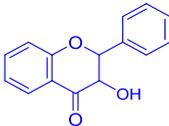
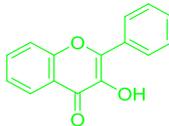
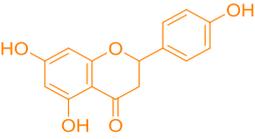
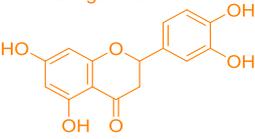
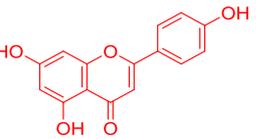
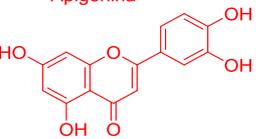
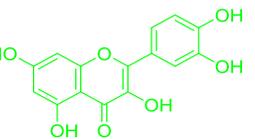
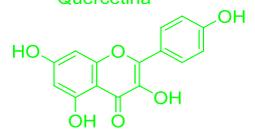


Los flavonoides se encuentran presentes en los organismos vegetales en forma de agliconas así como conjugados en formas glicosiladas: estos últimos son los que aportan el color a los frutos, flores y hojas (Hernández-Guzmán, 2015). Los glicósidos son por lo general O-glicósidos, con un azúcar unido generalmente al grupo hidroxilo aglicona en C-7, o en algunos casos en el C-3. Las agliconas son las formas que carecen de los restos de azúcar, éstos son menos frecuentes en los jugos, debido a su naturaleza hidrofóbica y por lo tanto su baja solubilidad en agua. Los carbohidratos más comunes de azúcar incluyen D-glucosa y L-ramnosa (Gattuso y col., 2007). Las actividades biológicas de estos compuestos bioactivos dependen de las diferencias estructurales entre flavonoides como del patrón de glicosilación. Por consiguiente, todas sus actividades incluida la capacidad antioxidante son dependientes de las estructuras (Tsao, 2010). Los flavonoides poseen la capacidad de absorber radiación electromagnética en la zona UV - VIS y de esta forma proteger naturalmente a las plantas contra la radiación UV del sol. Por otra parte, actúan como barrera química defendiéndose contra hongos, bacterias y virus (Hernández-Guzmán, 2015).

Algunos de los subgrupos más comunes son (Figura 1.2): las flavonas, apigenina y luteolina presentes en cebollas, tomillo, pimienta, tomate, apio, perejil y plantas medicinales, presentan actividades quimiopreventiva, quimioterapéutica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante y antitumoral (López-Lázaro, 2009; Manach y col., 2004; Tong y col., 2012): Los flavanoles quercetina (presente en cebollas, col rizada, poros, brócoli y arándanos) y miricetina (presente en arándanos, grosellas negras y uvas) cuentan con actividad antiinflamatoria y antioxidante (Manach y col., 2004; Marín y col., 2018). Los dihidroflavonoles, aromadetrina o dihidrokaempferol, es una 3-hidroxiflavanona (presente en frijoles, brócoli y repollo) con actividad antitumoral y antiinflamatoria y la ampelopsina o dihidromiricetina con actividad antitumoral, antibacteriano, antiinflamatorio, neuroprotector, anticancerígeno hepatoprotector antihipertensión y antioxidante presente en plantas del género *Ampelopsis* y *Hovenia dulcis* (Cheng y col., 2017; Kou y col., 2017; Kou y Chen, 2012; Marín y col., 2017; Pinto y col., 2017). Otros fitoquímicos importantes son las flavanonas como la naringenina y el eriodictiol los cuales están presentes en una gran variedad de frutas cítricas y verduras, siendo la toronja y el limón la fuente más abundante de estas flavanonas, las cuales han demostrado tener una gran variedad de actividades

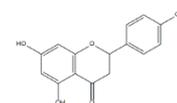


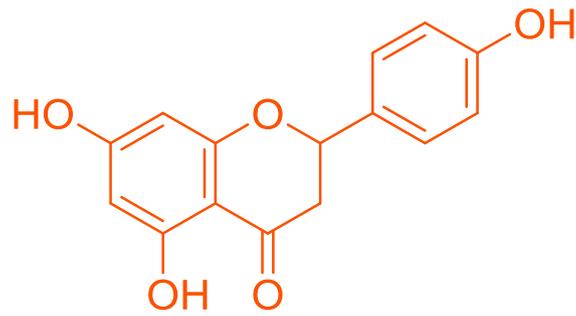
farmacológicas y biológicas (Jiménez-Atiénzar y col., 2005; Kasai y col., 2009; Minato y col., 2003).

Grupo de Flavonoides	Flavanonas	Flavonas	Flavanonoles	Dihidroflavonoles
Estructura				
Ejemplos	 Naringenina  Eriodictyol	 Apigenina  Luteolina	 Aromadetrina  Ampelopsina	 Quercetina  Kaempferol

**Figura 1.2.** Estructura de los grupos de flavonoides más comunes.

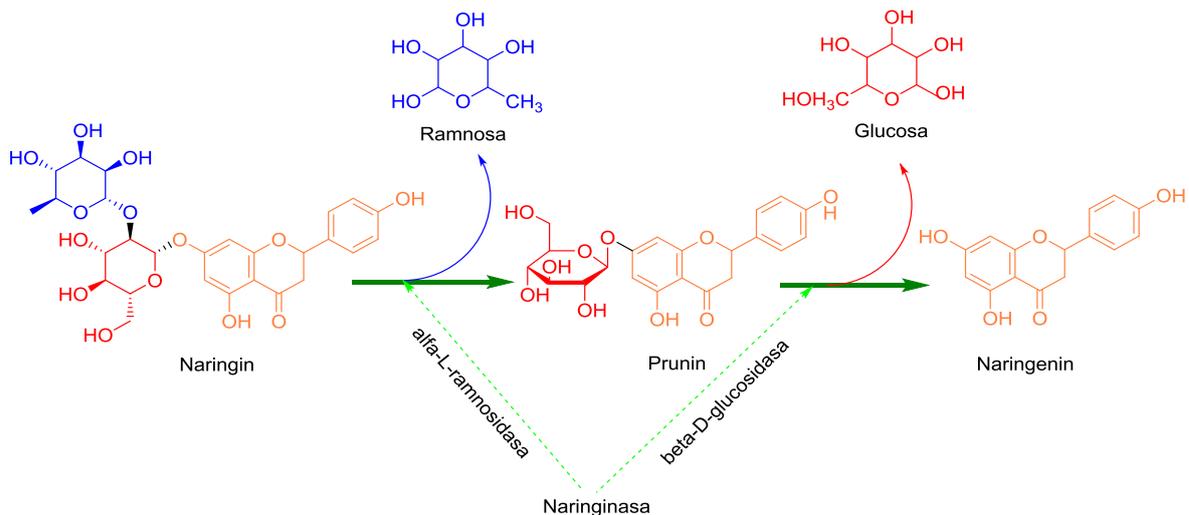
La naringenina (Figura 1.3), además de encontrarse en la piel de los cítricos, también se ha encontrado en uvas, toronjas y tomates (López-Lázaro, 2009; Nagy y col., 2008; Xu y col., 2012), aislado principalmente de desechos agroindustriales por lo que es relativamente económico (Madej y col., 2014). Este fitoquímico es de particular interés en los campos de la salud, alimentación y la agricultura debido a sus actividades farmacológicas, entre las que se cuentan la actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, vasodilatadora y a menudo su utilización se centra en tratamientos para bajar de peso ya que se ha reportado que absorbe grasas, lo cual podría prevenir el aumento en el nivel de colesterol, también es útil como agente farmacológico en el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis, aumenta la elasticidad de la piel y es un gran limpiador de toxinas (Jiménez-Atiénzar y col., 2005; Manach y col., 2004; Ribeiro y Ribeiro, 2008; Ribeiro y col., 2008; Zhang, 2007).





**Figura 1.3.** Estructura de la naringenina.

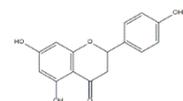
La naringenina es producto de la hidrólisis ácida de la naringina (Figura 1.4), componente en el jugo de toronja, el cual es hidrolizado por la actividad de la  $\alpha$ -L-ramnosidasa del complejo enzimático denominado naringinasa originando ramnosa y prunina. Posteriormente, la prunina es hidrolizado por la actividad  $\beta$ -D-glucosidasa de la naringinasa liberando el acoplamiento de la glucosa del flavonoide formando naringenina como producto final (Ribeiro y col., 2008).



**Figura 1.4.** Hidrólisis de la naringina en prunin, ramnosa, naringenina y glucosa por la naringinasa con actividad  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-glucosidasa.

### 1.3. Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) cumplen numerosas funciones útiles en el organismo; por ejemplo, el organismo humano produce cantidades moderadas para combatir infecciones, pero cuando la producción de especies reactivas sobrepasa la capacidad para neutralizarlas y/o eliminarlas puede encaminar a la oxidación de componentes celulares, oxidar directamente el ADN, activar mutágenos y activar rutas de transducción de señales, a esta condición se le denomina estrés oxidativo. Las ROS son



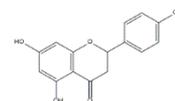
moléculas que contienen oxígeno e incluyen radicales libres, como el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), y no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este conjunto de moléculas se forma como resultado del metabolismo celular y en procesos fisiológicos normales, así como en procesos patológicos (Álvarez y Cambeiro, 2003; Corrales y Muñoz, 2012; Gutiérrez-Salinas y col., 2014; Fernández-Rebaza, 2018).

Los radicales libres son aquellas moléculas que presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo de su estructura atómica. Esta configuración espacial los hace muy inestable y totalmente reactivos, con una gran capacidad para reaccionar inespecíficamente con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un enorme daño a estas biomoléculas y en las membranas celulares. La alta inestabilidad de los radicales libres los hace reaccionar con biomoléculas secuestrando un electrón, oxidándola, provocando que su función específica en la célula se pierda (Dabrowska y Moya, 2009).

Estas especies reactivas son formadas por influencias endógenas como la respiración mitocondrial y la producción de energía, así como por causas exógenas como lesión celular, lesión química, toxicidad por oxígeno y otros gases tales como los que provienen de los escapes de los automóviles, la contaminación ambiental y el humo del cigarrillo, pesticidas, algunos medicamentos y por radiación (ultravioleta, gamma, hertziana) (Coronado y col., 2015; Dabrowska y Moya, 2009; Fernández-Rebaza, 2018).

#### **1.4. Antioxidantes**

Los antioxidantes son moléculas naturales y sintéticas que inhiben las reacciones de las especies reactivas de oxígeno o impiden su formación descontrolada. Estas moléculas se hallan a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Su función primordial en nuestro organismo es protegernos del daño oxidativo que causan los radicales libres, entre otras. Dicho daño oxidativo es el responsable de importantes enfermedades de carácter degenerativo del sistema circulatorio, enfermedades cardiovasculares, cataratas, envejecimiento precoz y cáncer, todas las cuales hoy son la principal causa de muerte en nuestra sociedad (Dabrowska y Moya, 2009; Fernández-Rebaza, 2018; Gómez-Gálvez, 2018).



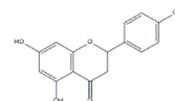
Cuando el antioxidante reacciona con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y convirtiéndose en un radical libre débil, con escasos o muy pocos efectos tóxicos y que, en algunos casos, pueden regresar a su forma original por la acción de otros antioxidantes. Estos compuestos poseen diferentes mecanismos de acción; existen los que evitan la formación de las especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los radicales libres (sistema barredor) y otros benefician la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas afectadas por los radicales libres (sistema de reparación) (Dabrowska y Moya, 2009).

La estructura de protección antioxidante está constituido por componentes enzimáticos como no enzimáticos (Tabla 1.2), que actúan colectivamente para preservar a la célula (López y col., 2012). El componente de tipo enzimático es considerado la defensa, encargándose de que los ROS no se acumulen, estos componentes aceleran la transferencia de electrones de un sustrato hacia los radicales libres (Corrales y Muñoz, 2012). La afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios depende del antioxidante, actuando en diferentes etapas del proceso oxidativo, además de poseer más de un mecanismo de acción. El núcleo activo de las enzimas antioxidantes requiere de algunos oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, para poder llevar a cabo sus mecanismos de acción. (Dabrowska y Moya, 2009). Los antioxidantes no enzimáticos son una agrupación de moléculas hidrófobas como hidrofílicas que secuestran radicales libres, generando moléculas menos dañinas para la célula, estabilizando al radical libre mediante la adición de un electrón (Corrales y Muñoz, 2012).

**Tabla 1.2.** Clasificación de antioxidantes (Modificado de Dabrowska y Moya, 2009; López y col., 2012).

Enzimáticos	Cofactores	No enzimáticos
Superóxido dismutasa		
Catalasa	Hierro	Flavonoides
Glutación peroxidasa		
Endógenos Glutación	Cobre	Betacaroteno
Coenzima Q	Zinc	Vitamina C
Ácido tióctico	Manganeso	Vitamina E

Los flavonoides además de brindar color a las flores y de atraer visualmente a los polinizadores, también actúan como quelantes de metales, capturan de forma *in vitro* especies reactivas de oxígeno e *in planta* equilibran los niveles de ROS en los tejidos

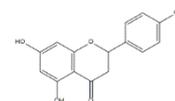


(Corrales y Muñoz, 2012; Falcone Ferreyra y col., 2012). La actividad secuestrante de radicales libres por flavonoides depende principalmente de la disposición de los sustituyentes dentro de su estructura. Sin embargo, la correlación entre la actividad antioxidante y la estructura de flavonoides todavía no es clara (Mandalari y col., 2007).

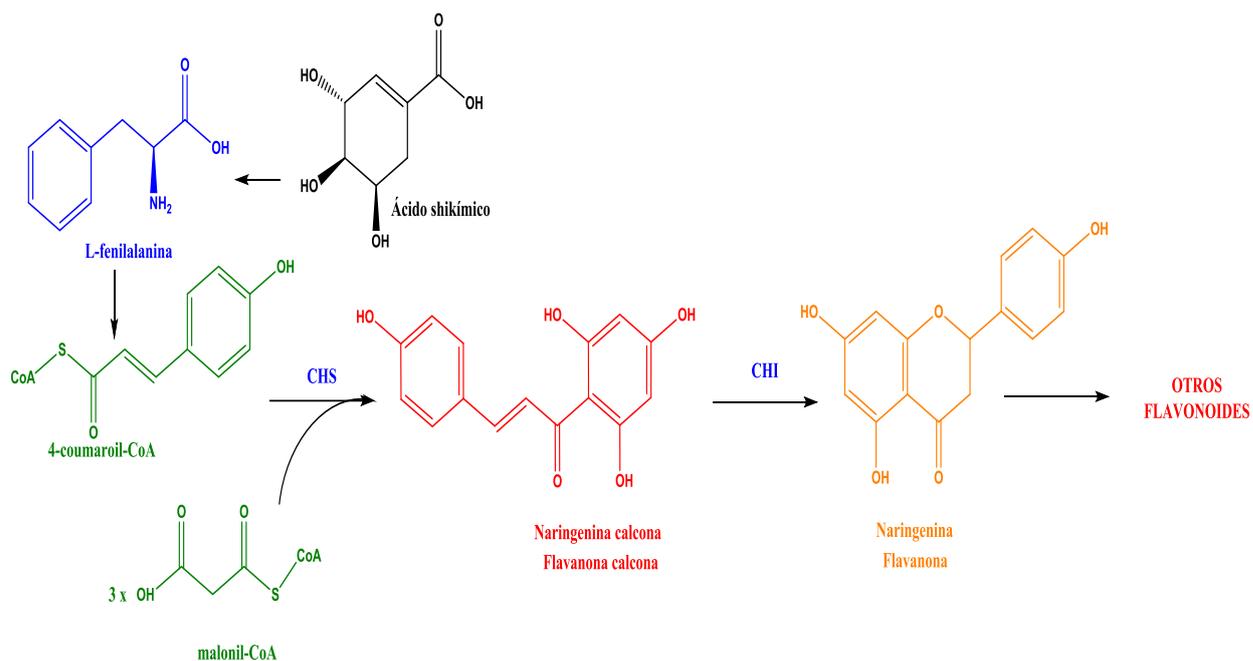
La actividad antioxidante puede ser medida por diferentes ensayos basados en reacciones por transferencia de electrones y en reacciones por transferencia de átomos de hidrógeno. Los ensayos de transferencia de electrones implican una reacción redox con el oxidante como indicador del punto final de reacción y los ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno monitorean una cinética competitiva, por lo general interfiere un generador de radical libre sintético, un ensayo molecular oxidable y un antioxidante. En la actualidad se utilizan una gran variedad de técnicas, llevadas a cabo *in vitro* utilizando un captador de radicales libres, en donde el objetivo es determinar la actividad antioxidante de una gran variedad de sustancias. Los métodos más utilizados son el ensayo de decoloración ABTS<sup>•+</sup> y puede ser aplicada a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. El método de DPPH<sup>•</sup> es el más rápido, es simple y de menor costo en comparación con otros métodos (Tovar-Del Rio, 2013).

### 1.5. Biosíntesis de flavonoides en plantas

Los flavonoides, son generados por el metabolismo secundario de las plantas a partir de la ruta denominada vía fenilpropanoide, iniciando con la ruta del ácido shikímico el cual es precursor de la L-fenilalanina (L-Phe), la L-Phe se convierte en 4-coumaroil-CoA, que junto con tres moléculas de malonil-CoA son la base para la formación de flavonoides (Figura 1.5), formando en primera instancia a la chalcona naringenina, esta reacción es catalizada por la chalcona sintasa (CHS) que condensa las tres moléculas de malonil-CoA y la 4-coumaroil-CoA, produciendo la estructura de la cual se derivan todos los flavonoides (Álvarez y Cambeiro, 2003; Crozier y col., 2009; Falcone Ferreyra y col., 2012; Tsao, 2010). La chalcona isomerasa (CHI) genera a la naringenina catalizando el cierre heterociclo. Esta flavanona es precursor de la flavona apigenina, así como del dihidroflavonol aromaderina y de la flavanona eriodictiol. Se requiere de la actividad de la flavona sintasa (FNS), la cual es una enzima dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (2-ODG) para la formación de la apigenina el cual es sustrato del flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) para la formación de luteolina. La naringenina también es sustrato



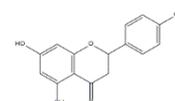
de la F3'H y de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) para generar como producto eriodictiol y aromadetrina, respectivamente. La F3H al igual que la FNS es una enzima 2-ODG. Por otra parte, la aromadetrina es sustrato del flavonol sintasa 1 (FLS1) enzima 2-ODG y del flavonoide 3'5'-dihidroxilasa (F3'5'H), generando quercetina y ampelopsina, respectivamente. Así mismo la quercetina es sustrato de la F3'5'H y la ampelopsina es sustrato de la FLS1 para la generación de la miricetina (Amor y col., 2010; Crozier y col., 2009; Gutiérrez del Río Menéndez, 2015; Marín y col., 2017; Park y col., 2011).



**Figura 1.5.** Resumen de la vía biosintética de fenilpropanoide. Abreviaciones de enzimas: CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa.

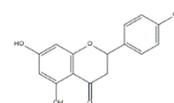
## 1.6. Biosíntesis de flavonoides en microorganismos

Los flavonoides son altamente productivos por sus diversas actividades biológicas para diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria y química, pero las cantidades obtenidas directamente de las plantas son muy bajas, por lo que una de las soluciones alternativas son los procesos de bioconversión microbiana (Cao y col., 2015; Lee y col., 2014). Los procesos de bioconversión que usan sistemas biológicos permiten modificaciones químicas a un determinado precursor, comúnmente por hidroxilación y/o metilación, para obtener nuevos compuestos con propiedades farmacológicas y biológicas atractivas, por lo que la bioconversión constituye una estrategia prometedora hacia compuestos biológicamente activos de interés para los sectores industriales (Cheng y col.,



2017; Kou y Chen, 2012; Velasco y col., 2009). Entre los precursores naturales, la naringenina se ha utilizado como una molécula modelo para la bioconversión hacia otros flavonoides con actividades biológicas mejoradas (Madej y col., 2014). A este respecto, una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos presentan la capacidad de hidroxilar compuestos altamente hidrofóbicos por la enzima monooxigenasa citocromo P450 (CYP450) (Hirakawa y col., 2009).

Los principales tipos de microorganismos asociados con la bioconversión de flavonoides son las levaduras del género *Saccharomyces*, bacterias como *E. coli* y hongos del género *Aspergillus*. Estos microorganismos biotransforman flavonoides enzimáticamente a través de enzimas CYP450 que son responsables de hidroxilar, reducir u oxidar a un sustrato específico (Chang y col., 2010; Chu y col., 2016). Cabe destacar que la actividad antioxidante de los flavonoides está asociada a los restos hidroxilo en el anillo B (Kasai y col., 2009), por lo que el aumento de la actividad antioxidante en los flavonoides es directamente proporcional al grado de hidroxilación (López-Lázaro, 2009; Nugroho Prasetyo y col., 2011; Roh y col., 2009; Tong y col., 2012). Kasai y col. (2009) han informado el uso de CYP450 como biocatalizador en células recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la bioconversión de naringenina en eriodictiol, el cual se encuentra presente en una gran variedad de frutas cítricas y plantas como la hierba santa (Jiménez-Atiénzar y col., 2005), siendo el limón la fuente más abundante de esta flavanona, demostrando tener una gran variedad de actividades farmacológicas y biológicas (Minato y col., 2003), además como inhibidor de la peroxidación lipídica, efecto vasodilatador y actividad antioxidante (Jiménez-Atiénzar y col., 2005; Kasai y col., 2009). También se ha reportado el uso de células completas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Rhodotorula marina* en la bioconversión de naringenina a 6-hidroxinaringenina (cartamidina) y 8-hidroxinaringenina (isocartamidina), estos compuestos han demostrado poseer mayor potencial antioxidante que la naringenina (Chang y col., 2010; Madej y col., 2014; Xu y col., 2012). Notablemente, *Y. lipolytica* tiene la capacidad de expresar los sistemas enzimáticos CYP450 y 2-ODG, una maquinaria biosintética para lograr la hidroxilación de compuestos hidrófobos como la naringenina (Coelho y col., 2010). Palmerin-Carreño y col., (2015) utilizaron células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab como biocatalizador para la bioconversión de



sesquiterpenos, en específico demostró tener la capacidad de oxidar la molécula de (+)-valenceno obteniendo como resultado (+)-nootkatona en cultivo superficial.

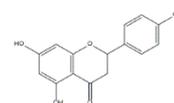
### 1.7. *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* es una de las levaduras "no convencionales" más estudiadas, estrictamente aerobia, capaz de producir metabolitos de gran importancia y posee una potente actividad secretora, lo que justifica el uso en la industria (como biocatalizador), en biología molecular y en los estudios de genética (Coelho y col., 2010). Esta es una levadura Ascomycota y es la única especie reconocida hasta ahora en el género *Yarrowia*, anteriormente era conocida como *Candida*, *Endomycopsis* o *Saccharomycopsis lipolytica* (Aloulou y col., 2007).

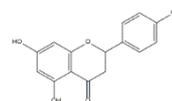
*Y. lipolytica* no es patógena para los humanos y ha sido aprobada para varios procesos industriales como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la Food and Drug Administration (FDA, USA), posee la capacidad para crecer de dos formas diferentes, como levadura o en forma de micelio, esta capacidad se denomina dimorfismo. Las condiciones de crecimiento (aireación, pH, fuentes de nitrógeno y carbono, entre otros.) y el historial genético de la cepa determinan la morfología. Algunos autores mencionan que las levaduras sufren dimorfismo debido a su mecanismo de defensa a condiciones adversas, como son los cambios de nutrientes y de temperatura (Aloulou y col., 2007; Carrillo-Sancén, 2011).

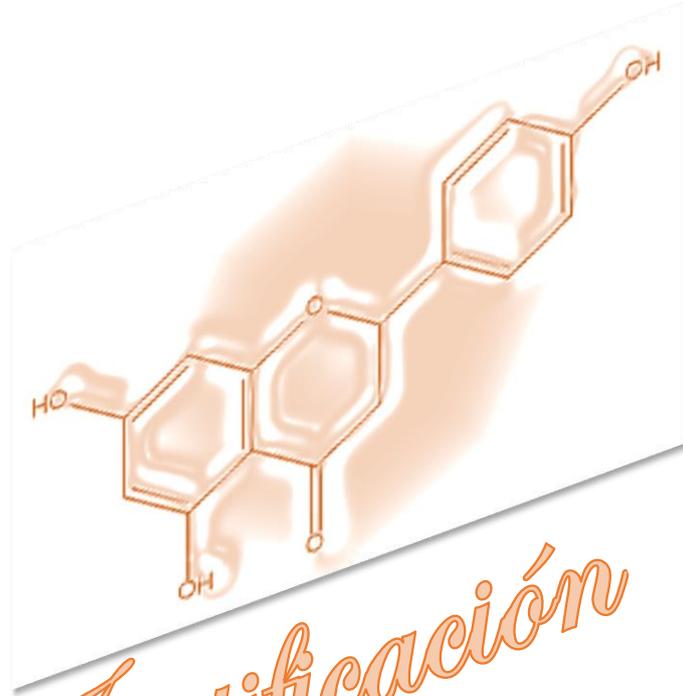
La versatilidad para expresar proteínas heterólogas con fines académicos y para posibles aplicaciones comerciales ha convertido a *Y. lipolytica* en un sistema confiable y popular. Además, posee otras características adicionales como la baja glicosilación, la alta eficiencia de secreción, el buen rendimiento del producto y la reproducibilidad de rendimiento. Tiene la actividad para degradar compuestos orgánicos, incluyendo hidrocarburos alifáticos y aromáticos, en algunos casos junto con la producción de biosurfactantes. También es capaz de producir ácido cítrico y aromas de una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo azúcares, alcanos, aceites vegetales, hidrolizados de almidón, etanol y glicerol (Coelho y col., 2010).

Durante el crecimiento de *Y. lipolytica* en n-alcanos y ácidos grasos se inducen hidrolasas de ácidos grasos y sistemas monooxigenasa P450, para poder llevar a cabo la oxidación



de n-alcanos y ácidos grasos, mediante reacciones que involucran una hidroxilación por el sistema monooxigenasa P450 o hidroxilasas (Burgardt, 2016). En estudios previos *Y. lipolytica* 2.2.ab llevo a cabo la bioconversión de la naringenina demostrando poseer el potencial de hidroxilación (Hernández-Guzmán, 2015).



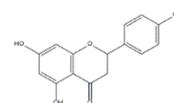


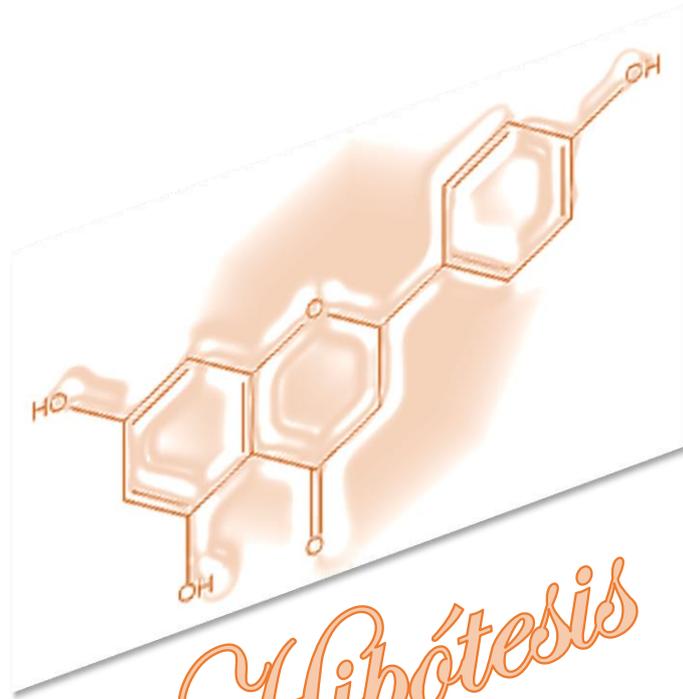
*Justificación*

## II. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos bioactivos influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos con efectos benéficos para la salud. Entre los compuestos bioactivos se encuentran los flavonoides, componentes que se relacionan con diferentes beneficios para la salud humana, principalmente por presentar actividad antioxidante. Muchas investigaciones indican que el daño oxidativo causado por la formación de oxidantes, como los radicales libres, son causantes de muchas patologías degenerativas y de algunos tipos de cáncer. La forma más efectiva de evitar el daño oxidativo producido por los radicales libres, es que los antioxidantes reaccionen con el radical libre oxidándose a su vez y convirtiéndose en un radical libre débil, con escasos o muy pocos efectos tóxicos. Existen diferentes procesos para la producción de flavonoides, incluyendo la extracción con diferentes solventes de cultivos *in situ* y cultivos *in vitro* de diferentes plantas y frutos, pero depende del costo y de la cosecha anual de estos organismos vegetales. Otro proceso de obtención es mediante la síntesis química; sin embargo, su producción cuenta con muchas etapas y condiciones extremas. Además, por lo regular siempre hay formación de mezclas racémicas, en donde el compuesto de interés biotecnológico suele pertenecer a un isómero, mientras que el otro u otros, en el mejor de los casos, es inerte o puede provocar efectos tóxicos. Esto es un problema para las diferentes industrias que utilizan compuestos bioactivos en sus formulaciones, como la farmacéutica. Por lo que, la bioconversión es una estrategia alternativa para la producción de flavonoides bioactivos que no existen en la naturaleza mediante el uso de sistemas biológicos. La bioconversión microbiana de flavonoides bioactivos no ha sido totalmente revisada, por lo que es significativo evaluar el uso de células completas para la síntesis de flavonoides y así mejorar sus diferentes actividades biológicas y farmacológicas.

En este estudio se pretende llevar a cabo la bioconversión de la flavanona, naringenina (molécula modelo), aumentando las propiedades bioactivas, como la actividad antioxidante, además de identificar los productos formados en la bioconversión utilizando células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab, el cual no ha sido reportado como biocatalizador en la producción de flavonoides.





*Hipótesis*

*y*  
*Objetivos*

### III. HIPÓTESIS

La maquinaria enzimática de *Y. lipolytica* 2.2ab permitirá la formación de compuestos con mayor valor agregado en la bioconversión de naringenina en medio superficial y en medio líquido.

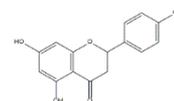
### IV. OBJETIVOS

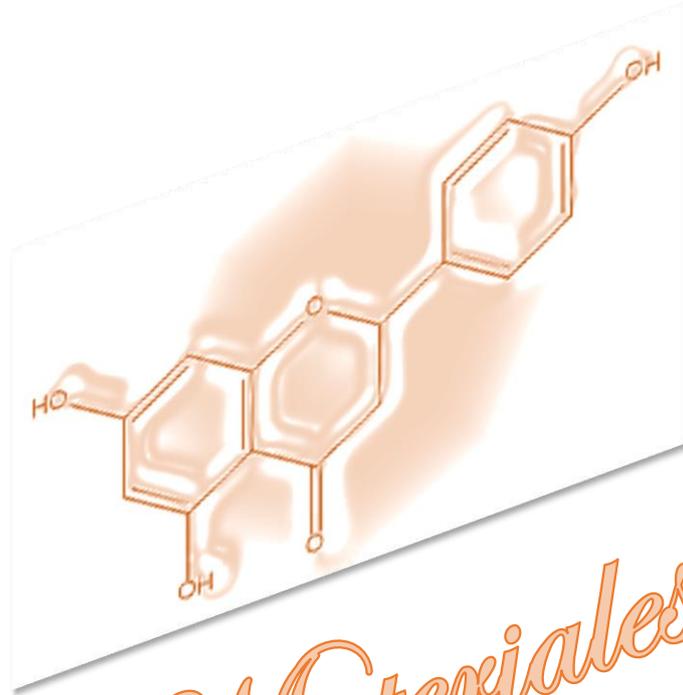
#### 4.1. Objetivo general

Evaluar la bioconversión de naringenina en medio superficial y en medio líquido utilizando células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab e identificar los productos resultantes.

#### 4.2. Objetivos particulares

- Identificar y cuantificar los productos obtenidos en la bioconversión de la naringenina
- Seleccionar el mejor sistema de producción de compuestos formados por la bioconversión de la naringenina
- Evaluar el efecto de la concentración de naringenina en ambos sistemas de producción
- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos formados





*Y Materiales*

*y*

*Y Métodos*

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.Reactivos

Los flavonoides naringenina, eriodictiol, apigenina, quercetina, luteolina, miricetina, aromadetrina y ampelopsina, los radicales libres DPPH y ABTS fueron comprados a Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. El acetato de etilo, metanol y acetonitrilo (grado HPLC) J.T. Baker<sup>®</sup>. El medio Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y el Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) Bioxon<sup>®</sup>. Se utilizó agua destilada para todos los experimentos.

### 5.2.Microorganismo

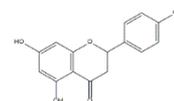
La cepa de *Y. lipolytica* 2.2ab utilizada en este estudio pertenece al cepario de la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La cepa fue sembrada por estría simple, en tubos inclinados con PDA e incubados durante 7 días a 30 °C. Al finalizar este período se recolectaron las células con 10 mL de solución salina (0.15 M) a 4°C para su conservación.



**Figura 5.1.** Cepa de *Y. lipolytica* 2.2ab utilizada en el proceso de bioconversión.

### 5.3.Conteo celular

De las células conservadas en solución salina se tomaron alícuotas para realizar tres diluciones en base 10, la primera dilución de 1:10 se obtuvo adicionando 100  $\mu$ L de células con 900  $\mu$ L de solución salina NaCl 0.15 M, se agitó la dilución para que sea homogénea, la segunda dilución 1:100 se realizó tomando 100  $\mu$ L de la dilución 1:10 y 900  $\mu$ L de NaCl 0.15 M, la tercera dilución 1:1000 se realizó de la misma manera, tomando 100  $\mu$ L de la dilución 1:100 y completando con 900  $\mu$ L de NaCl 0.15 M. Previo



a efectuar el conteo de células, se agitó cada dilución en un Vórtex (Thermolyne, 16700 Mixer), se tomó 10  $\mu\text{L}$  de muestra con una micropipeta y por capilaridad se adicionó en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Bright-Line 0.100 mm). Se efectuaron las lecturas en un microscopio (ZE155, modelo-184200), se enfocó con el objetivo 10x y se contaron las células presentes con el objetivo 40x dentro de los cuatro cuadrantes de los extremos en la cámara. Se realizó el cálculo del número de células, tomando el número total de las células dividiéndolo por los cuatro cuadrantes contados. Se multiplicó por  $10^4$  (volumen de la cámara de Neubauer) y después por el factor de dilución, el resultado se registró como el número de células contenidas en un mililitro (Palmerin-Carreño y col.,2015).

#### **5.4.Cinética de crecimiento**

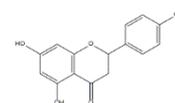
En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 100 mL de Caldo Papa Dextrosa (CPD) y Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) adicionados con 20 g  $\text{L}^{-1}$  de glucosa como fuente de carbono (Tablas 5.1-5.2), se adicionó un volumen adecuado de un inóculo de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Los matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm a una temperatura de 30 °C por 60 h. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

#### **5.5.Peso seco**

Para la determinación de peso seco se utilizaron alícuotas de 4 mL de cultivo celular. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 min (Centrifuge-5418) y se desechó el sobrenadante. Los precipitados celulares se re-suspendieron y centrifugaron nuevamente con NaCl 0.15 M, se desechó el sobrenadante. Las células se re-suspendieron en 2 mL de agua destilada y se filtraron en papel filtro previamente pesado y secado durante 24 h a 60 °C. El papel filtro fue secado en una estufa (Felisa) a 60 °C durante 24 h hasta tener peso constante, se enfriaron en un desecador y se pesaron. Los gramos de células obtenidos por mL de alícuota se reportaron como gramos de células/litro de medio, mediante la diferencia de peso de los filtros con y sin células.

#### **5.6.Ensayos de viabilidad celular**

Los ensayos de viabilidad celular durante el proceso de bioconversión se determinó midiendo la concentración de células vivas mediante la técnica del azul de metileno, como describe la técnica propuesta por Bonora y Mares (1982). Se tomaron de un cultivo las células de *Y. lipolytica* 2.2ab al tiempo correspondiente al inicio de la fase exponencial de una cinética de crecimiento para determinar el 100% de células vivas, de otro cultivo



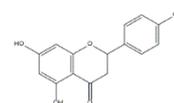
de *Y. lipolytica* 2.2ab se tomaron las células de igual manera al inicio de la fase exponencial, las cuales fueron esterilizadas para determinar el 100 % de células muertas. Posteriormente, se realizaron diluciones de las células vivas con las células muertas para obtener la curva de calibración y determinar la viabilidad celular de *Y. lipolytica* 2.2ab por espectrofotometría. La densidad óptica (DO) se determinó a 664 nm con un espectrofotómetro SHIMADZU, UV-1800. La curva de calibración para *Y. lipolytica* 2.2ab se obtuvo mediante la relación de la DO contra el porcentaje de las células muertas, usando células vivas en suspensión tratadas con azul de metileno como blanco. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

### **5.7. Producción de compuestos bioactivos en medio superficial**

Los experimentos de bioconversión se llevaron a cabo en frascos serológicos con medio de cultivo PDA y ADS, y un inóculo de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Después de 7 días de crecimiento a 30 °C, se agregó el precursor naringenina de la siguiente forma: Se adicionaron 10 mL de una solución de naringenina ( $42 \text{ mg L}^{-1}$  previamente disueltos en 1 % de etanol) cubriendo el crecimiento superficial de *Y. lipolytica* 2.2ab. Se tomaron muestras de 5 mL de la solución del medio de reacción después de 192 h de bioconversión. Las muestras se filtraron, separando así el sobrenadante de las células y se acidificaron a pH 4 con HCl 2 M y se extrajeron tres veces con acetato de etilo en una relación 1: 1, se agitaron en vórtex y se asentaron para separar las fases. La fase orgánica (acetato de etilo), fue utilizada para la identificación de compuestos (Hernández-Guzmán, 2015).

### **5.8. Producción de compuestos bioactivos en diferentes medios líquidos**

La bioconversión en medio líquido de la naringenina se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL en dos diferentes medios, Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) y en Caldo Papa Dextrosa (CPD) en un volumen final de medio de 100 mL, manteniéndolos a 150 rpm, 30 °C con un pH de 5.5 y un inóculo de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *Y. lipolytica* 2.2ab. Después de 24 y 48 h de crecimiento de *Y. lipolytica* 2.2ab en medio CDS y CPD, respectivamente, se agregó el 42 mg del precursor naringenina (previamente disuelto en 1 mL de etanol). También se llevó a cabo la bioconversión de la naringenina en buffer de fosfatos a pH 7. Las células de *Y. lipolytica* 2.2ab utilizadas para la bioconversión en buffer de fosfatos se obtuvieron del crecimiento en CDS y en CPD a la mitad de la fase



exponencial, correspondiente a las 24 y 48 h de crecimiento, respectivamente, previamente lavadas y re-suspendidas en el mismo buffer de fosfatos, posteriormente se agregaron 42 mg del precursor naringenina (previamente disuelto en 1 mL de etanol), para el proceso de bioconversión y observar si se obtenían los mismos niveles de bioconversión y producción de compuestos de mayor valor agregado. La bioconversión de la naringenina se llevó a cabo en 100 mL de buffer de fosfatos en matraces Erlenmeyer de 250 mL, manteniéndolos a 150 rpm, 30 °C y un inóculo de 3.5 y 1.5 g mL<sup>-1</sup> de *Y. lipolytica* 2.2ab aproximadamente, provenientes de los medios CDS y CPD, respectivamente, con el fin de identificar la mejor producción de flavonoides bioactivos haciendo comparación con el medio APD y el ADS. Posteriormente se tomaron muestras de 5 mL de los medios de reacción después de 192 h de bioconversión. Las muestras se filtraron, separando así el sobrenadante de las células, se acidificó el sobrenadante a pH 4 con HCl 2 M, posteriormente se realizó una extracción al sobrenadante con acetato de etilo en una relación 1: 1, esta extracción se realizó tres veces, se agitaron en vórtex y se asentaron para separar las fases. La fase orgánica (acetato de etilo), fue utilizada para la identificación de compuestos (Hernández-Guzmán, 2015).

**Tabla 5.1.** Caldo de cultivo Dextrosa Sabouraud (CDS).

Compuesto	g L <sup>-1</sup>
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5
Dextrosa	20

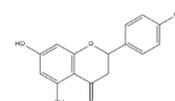
**Tabla 5.2.** Caldo de cultivo Papa Dextrosa (CPD).

Compuesto	g L <sup>-1</sup>
Almidón de papa	4
Dextrosa	20

## 5.9. Efecto de la concentración de naringenina en los sistemas de producción

### 5.9.1. Procedimiento de bioconversión en medio superficial

Los experimentos de bioconversión se realizaron en frascos serológicos de 25 mL con 10 mL de medio de cultivo PDA con un inóculo de 1x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> de *Y. lipolytica* 2.2ab. Los frascos se incubaron por 7 días, los cuales permanecieron a 30 °C. Una vez transcurridos los días de incubación la naringenina en solución fue agregada cubriendo el crecimiento superficial de la cepa. Se probaron trece concentraciones de naringenina, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.45, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 4.5 y 6 g L<sup>-1</sup>, los cultivos se incubaron a 30 °C



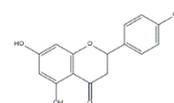
durante 8 días para el proceso de bioconversión. Se tomaron muestras de 5 mL de la solución del medio de reacción después de 192 h de bioconversión. Las muestras se filtraron, separando así el sobrenadante de las células, el sobrenadante se acidificó a pH 4 con HCl 2 M y posteriormente se extrajeron los compuestos del sobrenadante a lo que le denominamos extracto, esta extracción se llevó tres veces con acetato de etilo en una relación 1:1, se agitaron en vórtex y se dejó en reposo para permitir la separación de fases. La fase orgánica (acetato de etilo), fue utilizada para la identificación de compuestos. El control fue naringenina disuelta en medio de cultivo estéril, cada experimento se realizó por triplicado.

### 5.9.2. Procedimiento de bioconversión en medio líquido

Para los experimentos de bioconversión en medio líquido se utilizó CDS en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo (pH 5.5), inoculando  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *Y. lipolytica* 2.2ab, se incubó por 24 h a 150 rpm y 30 °C para el crecimiento de la levadura. A la mitad de la fase exponencial de *Y. lipolytica* 2.2ab fue agregada la naringenina previamente disuelta en etanol para iniciar la bioconversión, probando doce concentraciones iniciales de naringenina, 0.1, 0.2, 0.3, 0.45, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 4.5 y 6  $\text{g L}^{-1}$ . Al igual que en el proceso de bioconversión en medio superficial, los cultivos se incubaron por 8 días a 30 °C. Se tomaron muestras de 5 ml de los medios de reacción después de 192 h de bioconversión. Las muestras se filtraron, separando así el sobrenadante de las células, el sobrenadante se acidificó a pH 4 con HCl 2 M y posteriormente se extrajeron los compuestos del sobrenadante a lo que le denominamos extracto, esta extracción se llevó tres veces con acetato de etilo en una relación 1:1, se agitaron en vórtex y se dejó en reposo para permitir la separación de fases. Posteriormente se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de la fase superior (acetato de etilo) al cromatógrafo para la identificación de compuestos. El control fue naringenina en medio estéril y cada experimento se realizó por triplicado.

### 5.10. Análisis de productos por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

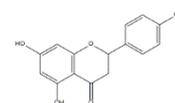
Los extractos procedentes de las bioconversiones en medio superficial como en medio líquido fueron acidificados a pH 4 con HCl 2 M, estos extractos fueron extraídos tres veces con acetato de etilo en una relación 1:1, posteriormente se observó la separación de



fases y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra de la fase superior correspondiente al acetato de etilo en el HPLC. La fase orgánica (acetato de etilo) de las bioconversiones realizada en medio superficial y medio líquido, fueron utilizadas para la cuantificación de la naringenina y la presencia de productos formados, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y mediante la técnica de estándar externo. Se utilizaron estándares comerciales de naringenina, eriodictiol, apigenina, quercetina, luteolina, miricetina, aromadetrina y ampelopsina (Sigma-Aldrich) para la identificación de los compuestos presentes en la bioconversión, de acuerdo con sus tiempos de retención característicos. El HPLC (Agilent 1100<sup>®</sup>) está equipado con un detector de arreglo de diodos (UV-VIS) y una bomba cuaternaria, la detección de longitud de onda se llevó a cabo a 258 y 290 nm. Se utilizó una columna de fase inversa C-18 (ZORBAX<sup>®</sup> Eclipse 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4.6 mm). Se utilizaron como fase móvil acetonitrilo (solvente A) y 0.1 % de ácido acético (solvente B) a una velocidad de flujo de 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ , el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$  a una temperatura de 30 °C, el gradiente de elución fue: gradiente lineal de Solvente A de 25 a 38 % por 10 minutos, elución isocrática de solvente A de 38 % por 18 min, gradiente lineal de solvente A de 38 a 25 % por 2 min y una elución isocrática de solvente A de 25 % por 6 min (Madej y col., 2014).

### **5.11. Análisis del producto por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS/MS)**

Se requirió el uso de un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución Acquity UPLC<sup>®</sup> (Waters, EE. UU.) acoplado a espectroscopia de masas-masas (UPLC / MS-MS) utilizando un módulo de ionización negativa (ESI-). La columna utilizada fue una fase inversa, Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2.1x150x1.7  $\mu\text{m}$ ) (Waters) la cual se mantuvo a 30 °C, a voltaje de entre 30-99.93 V con un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . La fase móvil utilizada fue agua acidificada al 1 % v/v (agua / ácido fórmico 7.5 mM) (Fase A) y acetonitrilo (grado masas) (Fase B) a una velocidad de flujo de 0.210 mL  $\text{min}^{-1}$ , una temperatura de la fuente de 150 °C, una temperatura de solvatación de 450 °C, con un flujo de gas del cono de 151 L  $\text{h}^{-1}$  y un flujo de nitrógeno de 796 L  $\text{h}^{-1}$ . Como cosolvente, se usó metanol con ácido fórmico al 0.1 %. EL tiempo total de la corrida fue de 20 min y una elución de la fase A en gradiente lineal del 97 al 91 % por 1.88 min, de 91 al 84 % por 3.78 min, de 84 al 50 % por 11.24 min, de 50 al 97 % durante 2.72 min y una elución isocrática del solvente A de 97 % durante 0.4 min. La cuantificación de flavonoides se



realizó en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) en MS / MS. Esto se llevó a cabo a través del conjunto de iones para detectar las transiciones de los iones padres a los iones de compuestos producidos: naringenina 272> 119 Da, apigenina 270> 117 Da, luteolina 286> 131 Da, eriodictyol 287> 135Da, aromadetrina 288> 125 Da, quercetina 302> 151 Da, ampelopsina 320> 153 Da y miricetina 318> 151 Da.

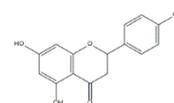
## 5.12. Actividad Antioxidante

Se midió la actividad antioxidante mediante los métodos de eliminación de radicales libres DPPH• y ABTS•. El ensayo por DPPH• (1,1-Difenil-2- picrilhidrazilo) se midió por el método propuesto por Brand-Williams y col. (1995) con modificaciones. Se preparó una solución de DPPH• en metanol (25 mg L<sup>-1</sup>). Se tomaron 3.9 mL de la solución de metanol y se le añadieron 0.1 mL de la mezcla de extracto obtenido a las diferentes concentraciones iniciales de naringenina. Se mezclaron vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. La absorbancia se midió a 517 nm con un espectrofotómetro UV-VIS (SHIMADZU®). El porcentaje de inhibición del radical DPPH• para las mezclas de extracto fue evaluada de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = (A_0 - A_{30}) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

donde A<sub>0</sub> es la absorbancia del radical DPPH• a tiempo cero y A<sub>30</sub> es la absorbancia del radical DPPH• después de treinta minutos de incubación.

Mediante la técnica propuesta por Kim y col. (2003) con algunas modificaciones se realizó el ensayo de eliminación del radical ABTS• (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Se preparó una solución de ABTS• 7 mM y una solución de persulfato de potasio 2.45 mM. Se mezclaron en partes iguales estas soluciones y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente de 12 a 16 h para la formación del radical ABTS•. Una vez pasado de 12 a 16 h, la solución de ABTS• se diluye en etanol para obtener una absorbancia de 0.8 (± 0.02) a 734 nm. Para el análisis de las muestras se tomaron 100 µL de la mezcla de extracto a diferentes concentraciones iniciales de naringenina y se añadieron 1.9 mL de la solución del radical ABTS•. Las mediciones se realizaron por triplicado y se utilizó naringenina como control. El porcentaje de inhibición del radical ABTS• se calculó de la forma descrita que para el radical de DPPH•, utilizando la ecuación 1 para determinar el % de inhibición del radical ABTS•.

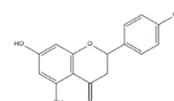


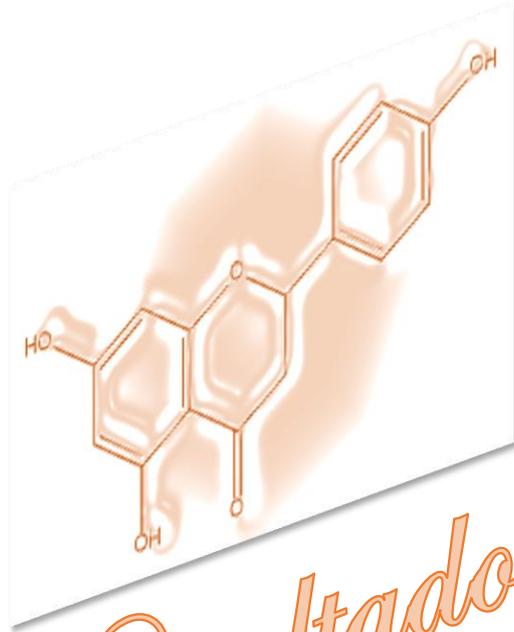
### 5.13. Flavonoides Totales

Se tomaron 0.5 mL de extracto y se introdujeron en un matraz de 10 mL, se le añadieron 0.3 mL de NaNO<sub>2</sub>, después de 5 min se adicionó 0.6 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10 % p/v, se dejó reposar 6 min y se agregaron 2 mL de NaOH 1 M; finalmente se aforó con agua destilada. La absorbancia se determinó a 510 nm y se realizó una curva patrón utilizando el estándar de naringenina para determinar la concentración de flavonoides en las muestras (Zhishen y col., 1999).

### 5.14. Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos del efecto de la concentración de la naringenina en los medios superficial y líquido se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa en la formación de compuestos y la actividad antioxidante; se realizó un análisis factorial utilizando el paquete estadístico NCSS 2012, se aplicó un ANOVA y la prueba de Tuckey con  $\alpha \leq 0.05$  para observar diferencias significativas.

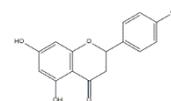




*Resultados*

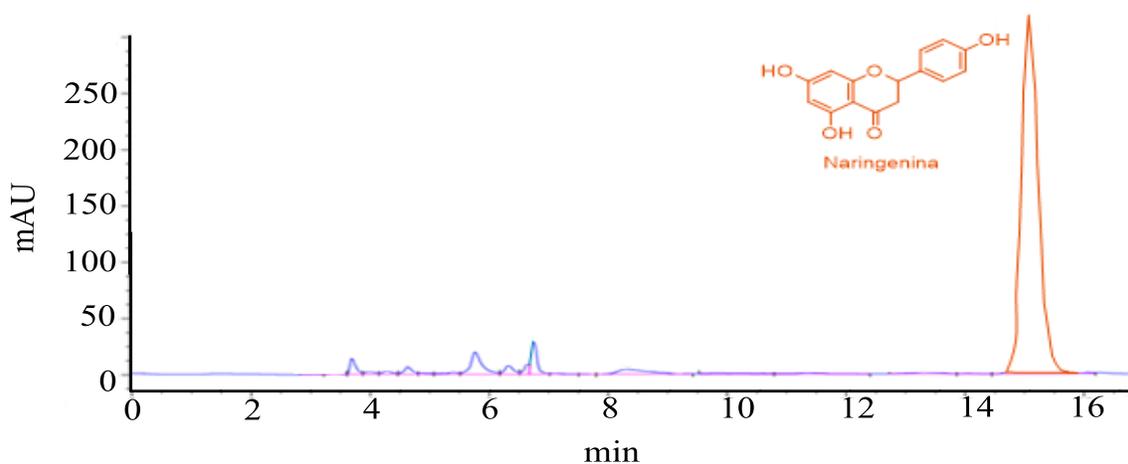
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los fitoquímicos como los flavonoides se caracterizan por ser compuestos bioactivos, los cuales han adquirido gran trascendencia en la actualidad debido a su enorme diversidad de efectos benéficos para la salud al ser consumidos en la dieta. Los organismos vegetales son constituyentes frecuentes del régimen alimenticio los cuales evidencian propiedades nutritivas y efectos terapéuticos ligado al contenido de fitoquímicos. Estos compuestos bioactivos se han comercializado como nutraceuticos, los cuales son suplementos dietéticos que brindan efectos benéficos a la salud. Los flavonoides pueden ser ingeridos mediante diversas formas farmacéuticas, como emulsiones, píldoras, comprimidos, cápsulas, etc. Las plantas son la materia prima más importante para la extracción de flavonoides los cuales son de especial interés en la industria farmacéutica ya que son una fuente potencial para la obtención de fármacos inocuos y efectivos para el tratamiento de diversas enfermedades crónico degenerativas (Drago-Serrano y col., 2006). En la industria alimenticia se utilizan aditivos alimenticios que se agregan a un alimento industrializado para brindarles solidez fisicoquímica, estabilidad contra oxidación, incremento en la solubilidad y características sensoriales deseables. Los aditivos alimenticios como las ciclodextrinas pueden ser aplicados como protector a flavonoides que poseen baja solubilidad, evitando su probable degradación en el tracto intestinal y manteniendo la biodisponibilidad de estos compuestos, para que logren desempeñar su mayor efecto biológico en el intestino grueso (Estrada-Sierra, 2015). La molécula 4',5,7-trihydroxy-flavanona mejor conocida como naringenina es un flavonoide perteneciente al grupo de las flavanonas, el cual, posee gran variedad de actividades biológicas (antiinflamatoria, vasodilatadora, antioxidante, etc.) de interés para la industria farmacéutica y alimentaria, también ostenta cierta importancia en el campo de la biosíntesis, ya que es precursor directo en la formación de otros compuestos con mayor valor agregado como la apigenina y el eriodictiol entre otros (Rubio y col., 2011).



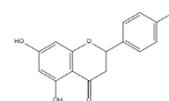
## 6.1. Producción de compuestos bioactivos en medio superficial

En primera instancia se realizó el proceso de bioconversión utilizando como precursor una solución de naringenina ( $42 \text{ mg L}^{-1}$ ), cubriendo el crecimiento superficial de los medios PDA y ADS de *Y. lipolytica* 2.2. ab, el cual mostró potencial de bioconversión de naringenina a sus correspondientes compuestos hidroxilados y deshidrogenados en el medio PDA en un tiempo máximo de 192 h. Los productos fueron extraídos con acetato de etilo y analizados por HPLC. La Figura 6.1 se muestran diferentes señales con respectivos tiempos de retención y áreas. El pico con mayor área corresponde a la naringenina, el tiempo de retención (tr) concuerda con el estándar comercial el cual fue de 15.186 min (Figura A1. Anexo).

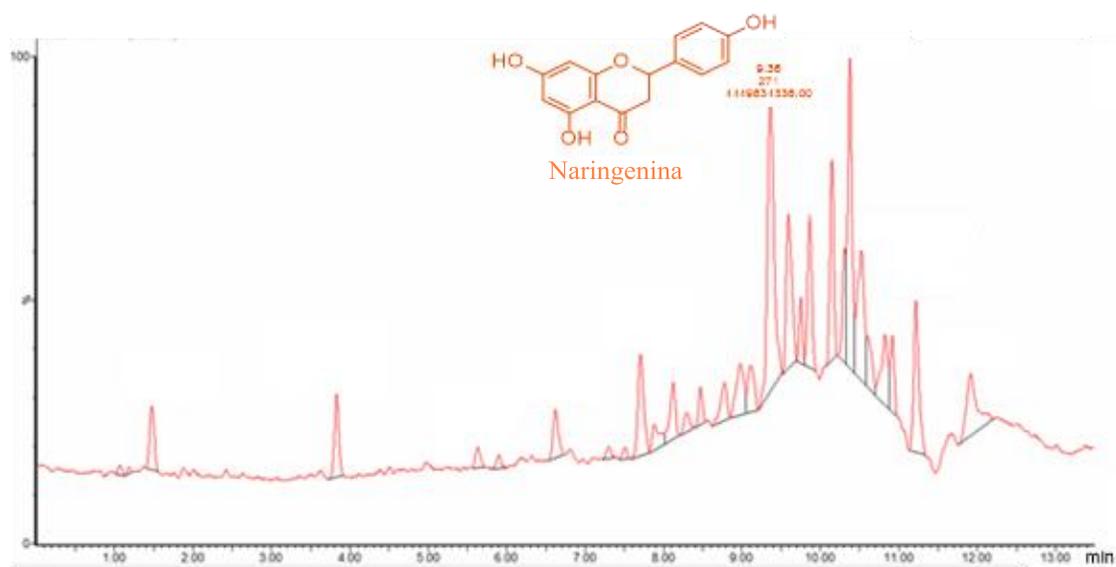


**Figura 6.1.** Cromatograma HPLC correspondiente a la bioconversión de naringenina por *Yarrowia lipolytica* 2.2ab 192 h de cultivo en PDA posterior a la adición de naringenina como precursor.

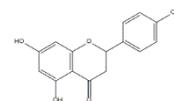
Una vez que *Y. lipolytica* 2.2ab mostró potencial de bioconversión, se requirió el uso del UPLC-MS/MS para la identificación de los compuestos. En la Figura 6.2 se observan las diferentes señales obtenidas del UPLC-MS/MS, con el método MRM (Monitorización de Reacción Múltiple), detectándose varios picos a diferente tiempo de retención (tr), masa y patrón de fragmentación los cuales corresponden con los estándares comerciales. En la Figura A2 (Anexo), se muestran los cromatogramas de naringenina y sus correspondientes compuestos enriquecidos, apigenina, luteolina, eriodictiol, floretina y catequina. Los patrones de fragmentación (m/z) obtenidos por el análisis MRM fueron 151.04 y 119.06 para



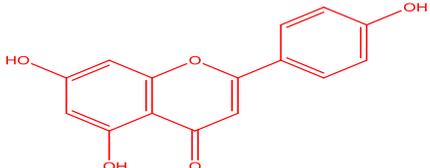
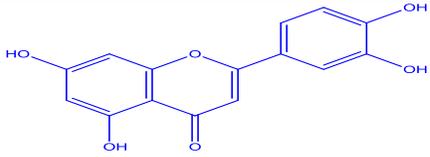
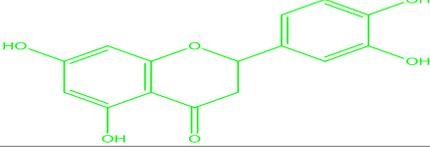
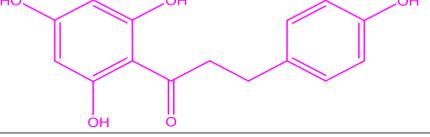
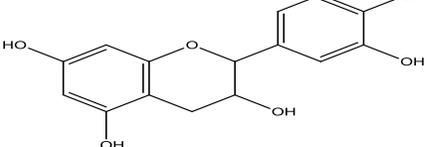
el peso de la naringenina y su tr fue de 9.38 min, el resto de los compuestos identificados se presentan en la Tabla 6.1 con los patrones de fragmentación característicos (m/z), estructura, peso molecular y tr. Los medios de cultivo con *Y. lipolytica* 2.2ab y sin la adición de naringenina como precursor se utilizaron como control (Figura A3). En estudios previos *Y. lipolytica* 2.2ab demostró tener la capacidad de oxidar la molécula de (+)-valenceno a (+)-nootkatona. También ha demostrado hidroxilar a la naringenina, sin embargo, los compuestos no fueron identificados, y a diferencia de este estudio previo, en este trabajo los compuestos hidroxilados fueron ampliamente identificados durante el proceso de bioconversión (Hernández-Guzmán, 2015; Palmerin-Carreño y col., 2015).



**Figura 6.2.** Cromatograma HPLC-MS/MS correspondiente a la bioconversión de **naringenina** por *Yarrowia lipolytica* 2.2ab 192 h de cultivo posterior a la adición de naringenina como precursor.



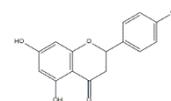
**Tabla 6.1.** Productos identificados a partir de la bioconversión de la naringenina en medio superficial (PDA).

Compuesto	Estructura	Fórmula y Peso Molecular	Tiempo de retención (tr)	Patrones de fragmentación (m/z)
Apigenina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> 270 g/mol	9.25 min	271, 211, 164, 151, 148, 133, 117
Luteolina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> 286 g/mol	8.71 min	285, 151, 133
Eriodictiol		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 288 g/mol	8.75 min	287, 151, 135, 119, 175
Floretina		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> 274 g/mol	9.37 min	273, 167, 124, 113
Catequina		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> 290 g/mol	4.5 min	289, 125

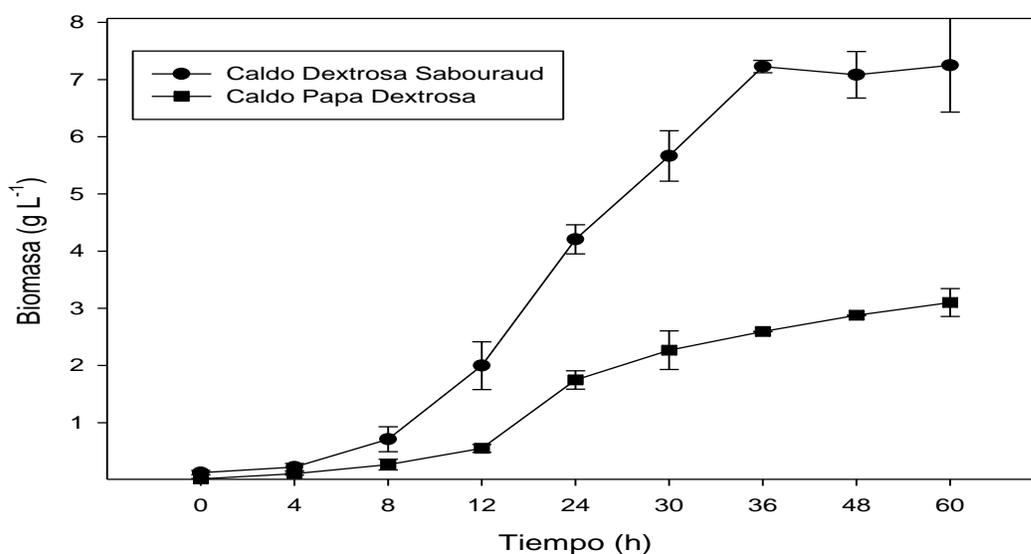
## 6.2. Producción de compuestos bioactivos en medio líquido

### 6.2.1. Cinéticas de crecimiento de *Y. lipolytica* 2.2ab en medio líquido

Se observó que *Y. lipolytica* 2.2ab tiene el sistema enzimático requerido para llevar a cabo la bioconversión de la naringenina a compuestos hidroxilados, los cuales son compuestos de mayor valor agregado debido a que aumentan sus propiedades biológicas, por lo que, se prosiguió a la bioconversión en medio líquido, utilizando dos diferentes medios (CPD y CDS) con el fin de comprobar cuál es el mejor sistema de producción de compuestos hidroxilados. El incremento de la actividad antioxidante en los flavonoides es directamente proporcional al grado de hidroxilación (Kitamura y col., 2013). Las cinéticas



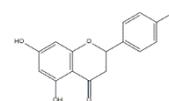
de crecimiento se presentan en la Figura 6.3 obteniendo como resultado el aumento de biomasa de *Y. lipolytica* 2.2ab, este crecimiento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer en ambos caldos, manteniéndolo a 150 rpm, 30 °C con un pH inicial de 5.5. En esta Figura (6.3), se observa que al inicio una fase lag o de adaptación corta, aproximadamente de 4 h, posteriormente inicia la fase exponencial de crecimiento con una pendiente pronunciada en el medio DSB, por lo que el cultivo se encuentra consumiendo la fuente de carbono, la concentración de sustrato fue de 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa produciendo 7.25 g L<sup>-1</sup> de biomasa seca. La cinética obtenida a partir del medio CPD se alcanza una producción de 3.1 g L<sup>-1</sup> de biomasa a partir de los 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa que contiene el medio.



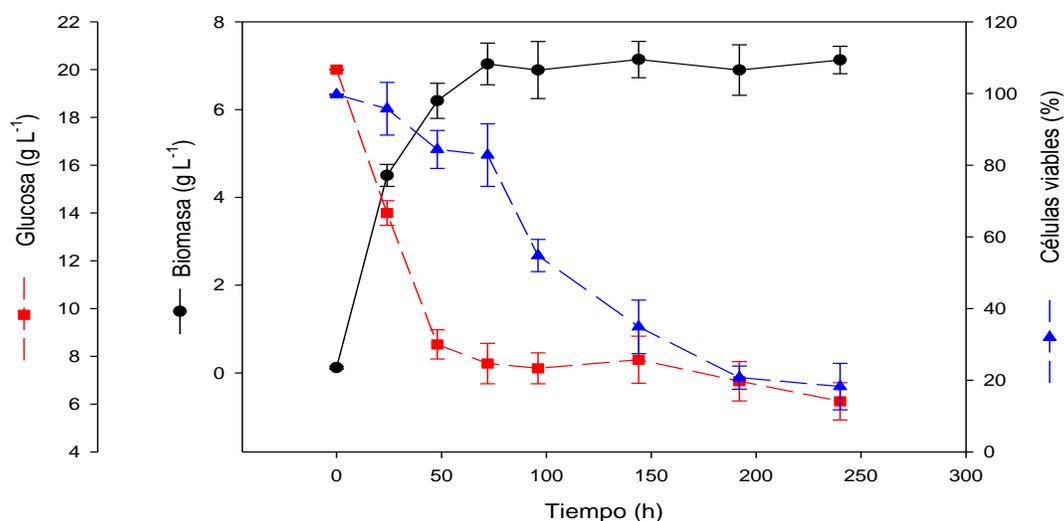
**Figura 6.3.** Cinética de crecimiento de *Y. lipolytica* 2.2 ab en caldo papa dextrosa y caldo dextrosa sabouraud.

### 6.2.2. Bioconversión de la naringenina en medio líquido

Después de analizar las cinéticas de crecimiento, se procedió a la bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab en medio líquido. La Figura 6.4 presenta el consumo de glucosa, la cinética de crecimiento y la viabilidad celular de *Y. lipolytica* 2.2ab durante el proceso de bioconversión en medio CDS. El rendimiento de biomasa fue de 0.52 ( $Y_{x/s}$ ) con un consumo de glucosa de 13.88 g L<sup>-1</sup>, una viabilidad de 18.22 % y una máxima producción de biomasa seca de 7.13 g L<sup>-1</sup> después de 192 h de bioconversión, el cual inició después de

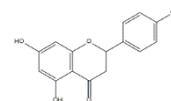


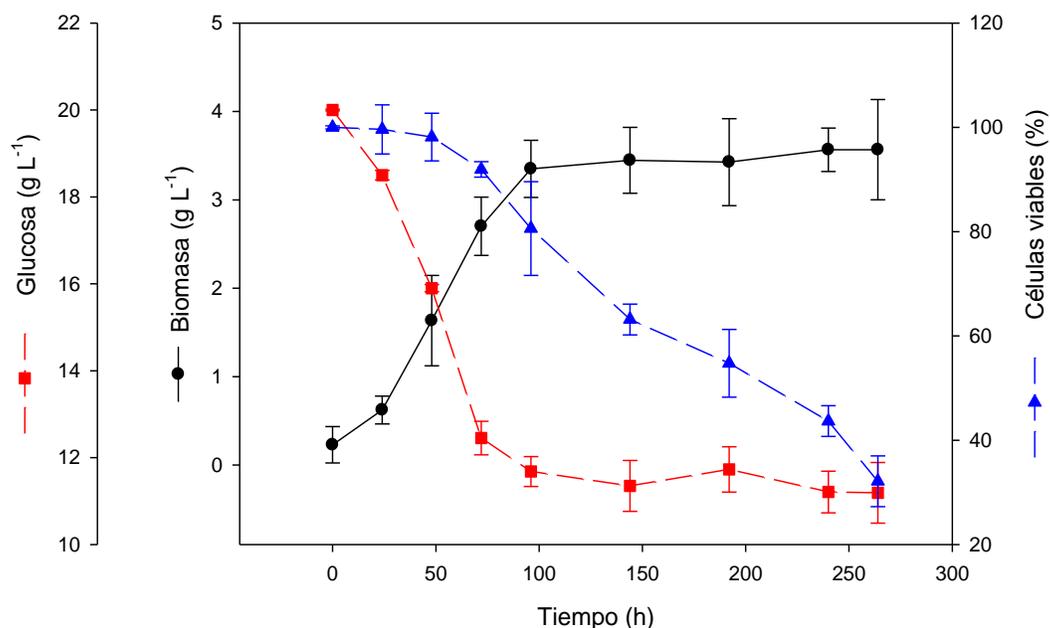
24 h del inóculo de *Y. lipolytica* 2.2ab, justo a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, la concentración de naringenina fue de 42 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 6.4.** Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y viabilidad para *Y. lipolytica* 2.2 ab en CDS.

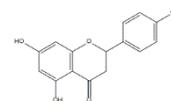
La cinética de crecimiento de *Y. lipolytica* 2.2ab en medio CPD se presenta en la Figura 6.5 en donde se obtuvo un rendimiento de biomasa de 0.40 con un consumo de glucosa de 8.81 g L<sup>-1</sup>, una viabilidad de 32.14 % y una máxima producción de biomasa seca de 3.56 g L<sup>-1</sup> después de 192 h del proceso de bioconversión. Para llevar a cabo la bioconversión se realizó la adición del precursor a la mitad de la fase exponencial, correspondiente a las 24 y 48 h de crecimiento para los medios CDS y CPD, respectivamente. Después de 24 h de haber sido agregado el precursor se observa la muerte celular en ambos medios, hasta llegar al 18.22 y 32.14 % de células vivas después de 192 h del proceso de bioconversión para el medio CDS y CPD, respectivamente. Las plantas heridas secretan flavonoides que actúan como fitoalexinas para defenderse de posibles ataques, presentando una barrera química de defensa contra hongos, bacterias y virus (Gimeno Creus, 2004; Hernández-Guzmán, 2015).

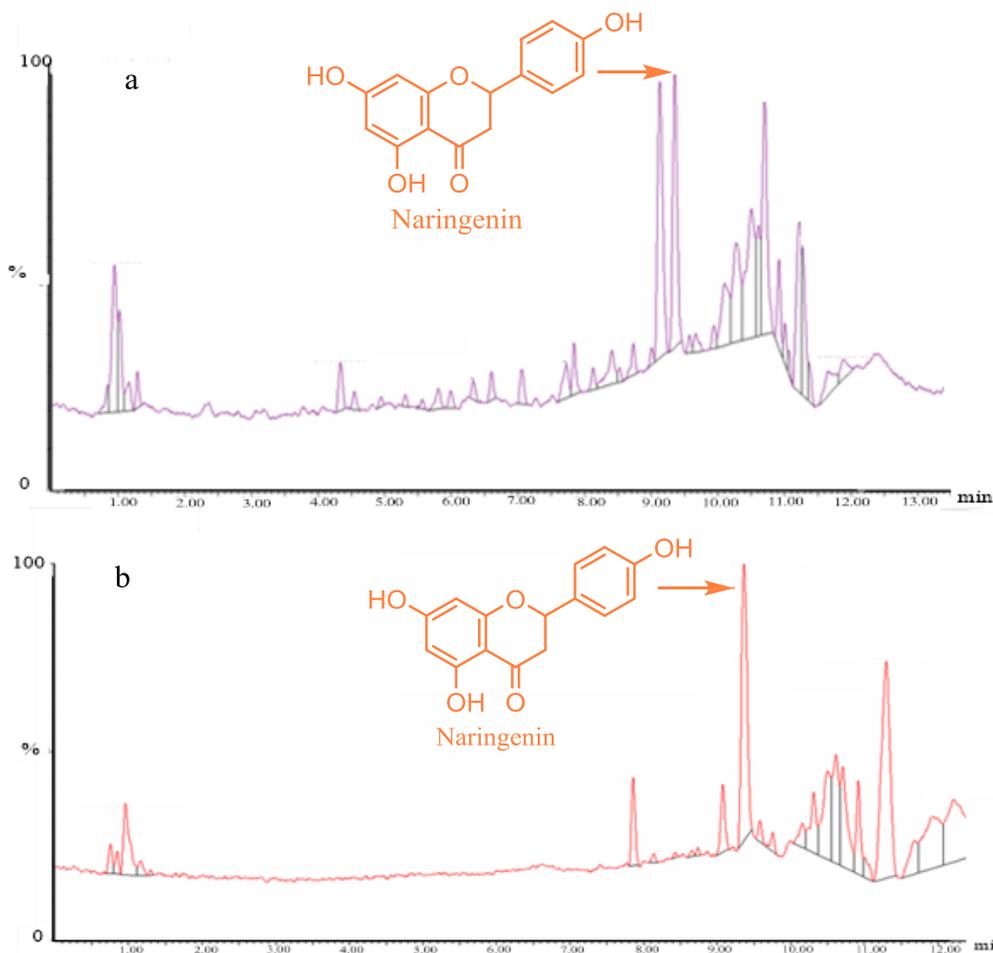




**Figura 6.5.** Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y viabilidad para *Y. lipolytica* 2.2ab en CPD.

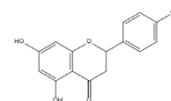
Una vez terminado el proceso de bioconversión (192 h) en ambos medios, se procedió a filtrar estos medios para retirar las células de *Y. lipolytica* 2.2ab y el sobrenadante se le denominó extracto. Posteriormente se realizó la extracción de compuestos producidos a estos extractos con acetato de etilo y se analizaron mediante UPLC-MS/MS con el método MRM (Multiple Reaction Monitoring). La Figura 6.6a presenta picos a diferentes tr, masa y patrones de fragmentación, los cuales corresponden con los estándares comerciales (Figura A2, Anexo). Como se mencionó anteriormente, la bioconversión también se llevó en medio CPD y en la Figura 6.6b podemos observar el perfil cromatográfico del UPLC-MS/MS de la bioconversión de la naringenina utilizando este medio. Se observan señales a diferente tr, peso molecular y áreas, que coinciden con las características de los estándares comerciales (Figura A2, Anexo). Al igual que la bioconversión en medio superficial el análisis por MRM se observaron patrones de fragmentación de la naringenina, los cuales fueron 151.04 y 119.06 y un tr 9.38 min.



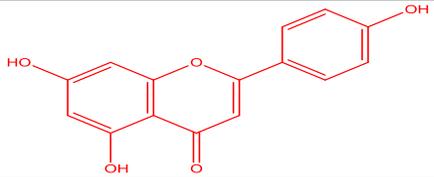
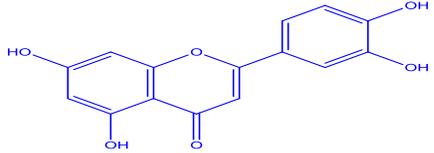
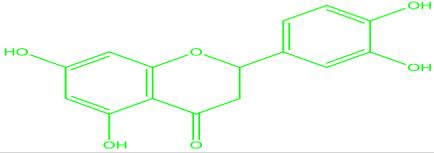
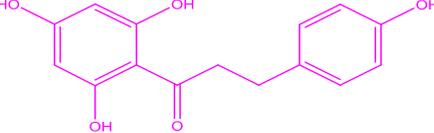
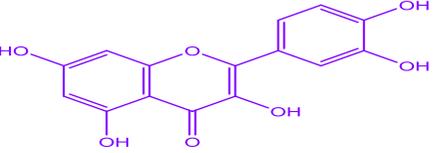


**Figura 6.6.** Cromatograma UPLC-MS/MS tras análisis MRM que muestra los picos  $m/z$  correspondiente a **naringenina** y **otros compuestos** producidos por la bioconversión en los medios a) CDS y b) CPD.

La Tabla 6.2 presenta los compuestos que fueron identificados como productos por el UPLC-MS/MS en la bioconversión de la naringenina en medio CDS y CPD. Los compuestos formados en su mayoría son los mismos que se identificaron en la bioconversión en medio superficial, la diferencia en esta bioconversión en medio líquido fue la identificación del compuesto denominado quercetina y la ausencia de la catequina para la bioconversión en medio CDS y para la bioconversión en medio CPD los compuestos identificados fueron la apigenina, eriodictiol y floretina.



**Tabla 6.2.** Productos en la bioconversión de la naringenina en caldo dextrosa sabouraud y en caldo papa dextrosa.

Compuesto	Estructura	Fórmula y Peso Molecular	Tiempo de retención (tr)	Patrones de fragmentación (m/z)
Apigenina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> 270 g/mol	9.25 min	271, 211, 164, 151, 148, 133, 117
Luteolina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> 286 g/mol	8.71 min	285, 151, 133
Eriodictiol		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 288 g/mol	8.75 min	287, 151, 135, 119, 175
Floretina		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> 274 g/mol	9.37 min	273, 167, 124, 113
Quercetina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> 302 g/mol	9.37 min	301, 271, 179, 151, 107

Un hecho completamente satisfactorio fue la detección de compuestos hidroxilados (compuestos de mayor valor agregado) como productos de la bioconversión de la naringenina en medio líquido. Una vez que se logró detectar la presencia de estos compuestos se procedió a realizar la bioconversión de la naringenina en buffer de fosfatos a pH 7, en donde las células de *Y. lipolytica* 2.2ab provenían de cultivos en CDS y en CPD a la mitad de la fase exponencial, correspondiente a las 24 y 48 h de crecimiento, respectivamente, las cuales fueron lavadas con buffer y re-suspendidas en el mismo, posteriormente se añadió el precursor naringenina para el proceso de bioconversión y observar si se mantenían los mismos niveles de bioconversión y producción de compuestos de mayor valor agregado. La

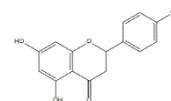
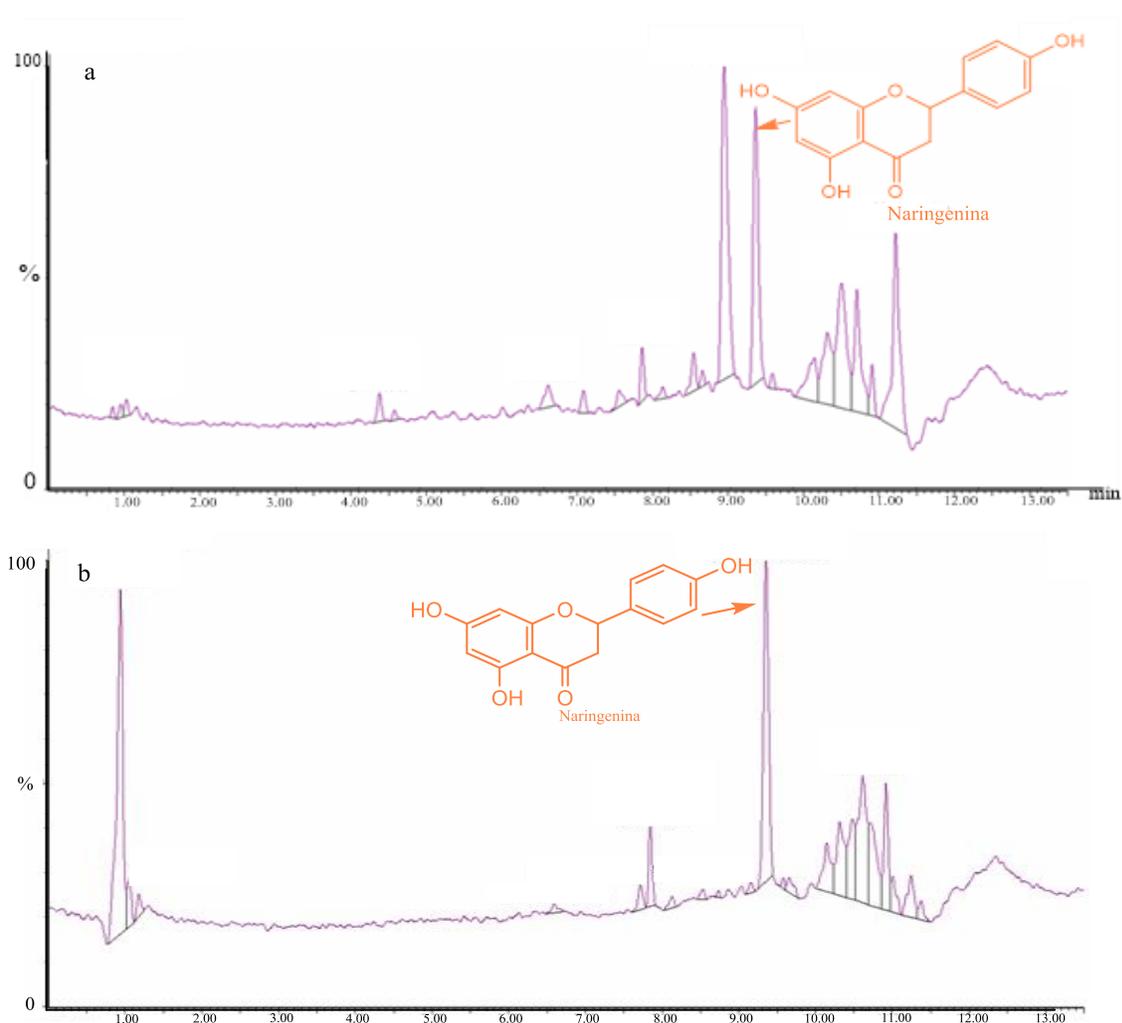
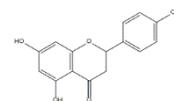


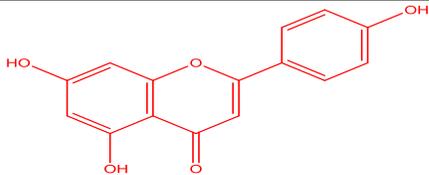
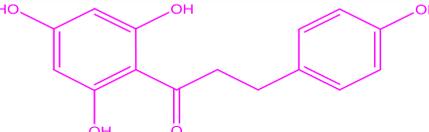
Figura 6.7 presenta el perfil cromatográfico UPLC-MS/MS con el método MRM, detectándose picos, m/z y tr de diferentes compuestos; y a diferencia de la bioconversión con el medio CDS y CPD no se observaron en demasía las señales de posibles productos. La Tabla 6.3 presenta los compuestos identificados como productos de esta bioconversión los cuales fueron apigenina y fletina. La naringenina ha sido enriquecida con compuestos fenólicos hidroxilados mediante el uso de lacasas en soluciones buffer de fosfatos y en buffer acetato de amonio como medio de bioconversión (Prasetyo y col., 2011). Roh y col., (2009) llevaron a cabo la hidroxilación de isoflavonoides por *Streptomyces avermitilis* MA-4680 en buffer de fosfatos como medio de bioconversión.



**Figura 6.7.** Cromatograma UPLC-MS/MS tras análisis MRM que muestra los picos m/z correspondiente a **naringenina** y **otros compuestos** producidos por la bioconversión en buffer de fosfatos; las células provenían de los medios a) CDS y b) CPD.



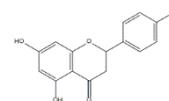
**Tabla 6.3.** Productos identificados en la bioconversión de la naringenina en buffer de fosfatos.

Compuesto	Estructura	Fórmula y Peso Molecular	Tiempo de retención (tr)	Patrones de fragmentación (m/z)
Apigenina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> 270 g/mol	9.25 min	271, 211, 164, 151, 148, 133, 117
Floretina		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> 274 g/mol	9.37 min	273, 167, 124, 113

En la Tabla 6.4 se presenta la cuantificación de los compuestos identificados como productos en los diversos medios utilizados para la bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab. Los tipos de cultivo en los que se observó mayor producción de flavonoides fueron en medio superficial y en CDS, por lo que se determinó continuar los estudios del efecto de la concentración de la naringenina en el proceso de bioconversión por *Y. lipolytica* 2.2ab en estos dos medios.

**Tabla 6.4.** Concentración de productos en los diferentes medios.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				
	CDS	CPD	Buffer Fosfatos - CDS	Buffer Fosfatos - CPD	Superficial (PDA)
Naringenina	4510 $\pm$ 0.17	7920 $\pm$ 1.93	10000 $\pm$ 0.68	6070 $\pm$ 0.21	8220 $\pm$ 0.74
Apigenina	0.661 $\pm$ 0.02	0.454 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 0.00	0.391 $\pm$ 0.03	28.5 $\pm$ 4.54
Eriodictiol	3.32 $\pm$ 0.18	4.95 $\pm$ 0.03	---	---	135 $\pm$ 8.57
Luteolina	0.36 $\pm$ 0.01	---	---	---	0.724 $\pm$ 0.09
Floretina	1.33 $\pm$ 0.08	0.323 $\pm$ 0.04	20 $\pm$ 3.05	2.17 $\pm$ 0.23	19.4 $\pm$ 2.67
Quercetina	21.8 $\pm$ 0.28	---	---	---	---
Catequina	---	---	---	---	0.089 $\pm$ 0.00



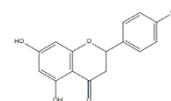
### 6.3. Efecto de la concentración de naringenina en el proceso de bioconversión

La concentración inicial de naringenina varió de 100 a 6000 mg L<sup>-1</sup> en dos tipos de cultivos, superficial (PDA) y líquido (CDS), para la producción de flavonoides por células enteras de *Y. lipolytica* 2.2ab. Las evidencias experimentales indican que el comportamiento de producción de los flavonoides es diferente entre los cultivos.

No fue posible relacionar el rendimiento de bioconversión de los flavonoides identificados (mg de productos identificados por mg de naringenina consumida) con la concentración inicial de naringenina, sin embargo, se observó que cuando aumenta la concentración de naringenina, la concentración de los productos identificados disminuye, mientras que la formación de compuestos no identificados aumenta en una relación no proporcional. Por ejemplo, se detectó un compuesto con un peso molecular de 475 g mol<sup>-1</sup> (UPLC-MS/MS), pero este nuevo compuesto no se pudo correlacionar con la biblioteca del equipo. Es importante señalar, que sólo a la concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de naringenina en cultivo líquido, todos los productos identificados estaban presentes con un rendimiento (Yp/s) de 0.319, que fue el más alto. También se observa que la naringenina residual es más alta en el medio líquido que en el medio superficial, esto podría deberse a la absorción del precursor en el agar. Para aclarar esto, se realizó un ensayo en el que se utilizó 100 mgL<sup>-1</sup> de concentración inicial de naringenina y biomasa previamente inactivada por esterilización; y se obtuvo una recuperación del 99.4 % de la naringenina añadida para el cultivo líquido, en contraste con el 79.17 % obtenido en el medio de cultivo de superficial. Con estos resultados obtenidos concluimos que la naringenina y los compuestos producidos son absorbidos por el medio superficial. La biomasa inactivada utilizada fue de 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> y aproximadamente 7 g L<sup>-1</sup> para los medios superficial y líquido, respectivamente.

#### 6.3.1. Efecto de la concentración de naringenina en medio superficial.

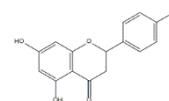
En esta sección se evaluó el efecto de la concentración inicial de naringenina en la bioconversión en medio superficial. Las Tablas 6.5-6.6 muestran los compuestos obtenidos de la bioconversión de naringenina en el cultivo superficial. Asimismo, la Figura 6.9 muestra el análisis UPLC-ESI-MS/MS de los flavonoides obtenidos. Las reacciones de biotransformación



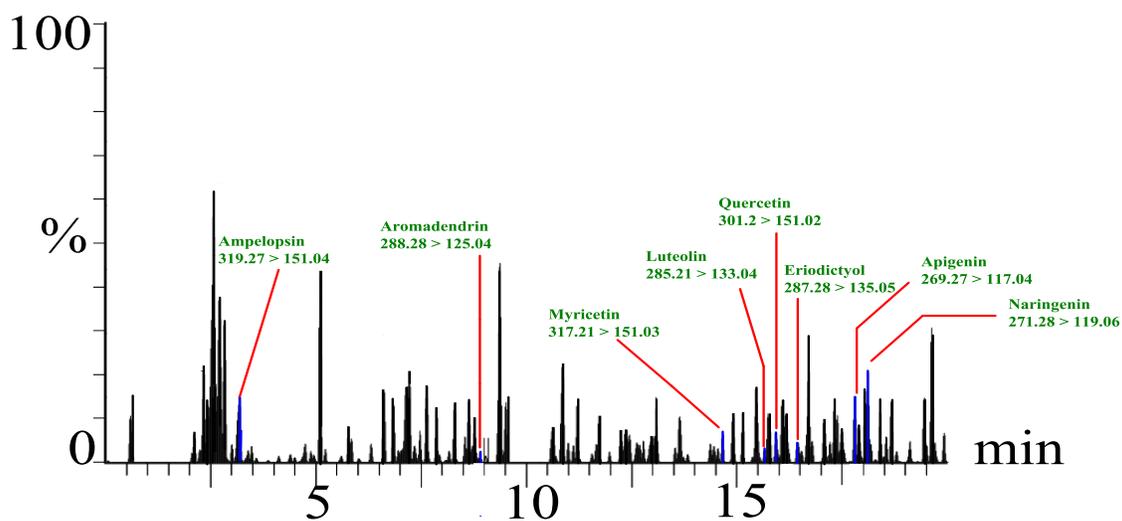
de flavonoides por *Y. lipolytica* 2.2ab incluyen reacciones de deshidrogenación e hidroxilación como las principales modificaciones a la molécula de naringenina nativa. La transformación microbiana de los flavonoides es ampliamente informada por varios mecanismos, entre los que destacan la formación de enlaces carbono-carbono, metilación e hidroxilación (Das y Rosazza, 2006). Con respecto a los flavonoides biosintetizados en este trabajo, la molécula de ampelopsina no se ha reportado previamente como producto de esta bioconversión de naringenina. En trabajos relacionados, muy pocos flavonoides se describen como productos por bioconversión utilizando células microbianas recombinantes en medio líquido, entre ellas la apigenina, luteolina, eriodictiol, aromadetrina y recientemente, quercetina y miricetina (Lee y col., 2014; Marín y col., 2018; Minato y col., 2003; Ribeiro y Ribeiro, 2008; Velasco y col., 2009). De acuerdo con el análisis de variancia (ANOVA) y prueba F no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la formación de los compuestos identificados en las diferentes concentraciones iniciales de naringenina, por lo que la obtención de los compuestos identificados demostró ser independiente de la concentración inicial de naringenina utilizada. (Tabla A1, Anexo). Cabe destacar que, entre las trece concentraciones estudiadas en este trabajo, las cuales se observan en la Tabla 6.5, la concentración de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  en medio superficial presentó las moléculas más identificadas y cuantificadas, obteniendo  $11.3 \text{ mg L}^{-1}$  de flavonoides bioactivos, que representa  $0.0377 \text{ mg}$  de producto por  $\text{mg}$  de naringenina.

### 6.3.2. Efecto de la concentración de naringenina en medio líquido.

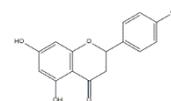
Se evaluó el efecto de la concentración inicial de naringenina en cultivo líquido obteniendo siete compuestos diferentes de la bioconversión (Tablas 6.6-6.7 y Figura 6.10). Al igual que en el medio superficial, los compuestos se identificaron por cromatografía UPLC-MS/MS en monitoreo de reacción múltiple (MRM) en módulo de ionización negativo (ESI-). La Figura 6.8 presenta análisis UPLC-MS/MS de flavonoides obtenidos por *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo líquido. De acuerdo con el análisis de variancia (ANOVA) y prueba F no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la formación de los compuestos identificados en las diferentes concentraciones iniciales de naringenina. Con la estadística descriptiva la apigenina fue el compuesto identificado que se obtuvo en mayor proporción en las diferentes



concentraciones iniciales (Tabla A2, Anexo). En este cultivo líquido con 100 mg L<sup>-1</sup> de naringenina inicial, la cantidad de flavonoides bioactivos producidos fue de 26.43 mg, obteniendo así 0.2643 mg de producto por mg de naringenina. En un estudio relacionado, Pérez-Nájera y col. (2013) extrajeron flavonoides de una parte de las cáscaras de lima, obteniendo 0.0143 mg de flavonoides (equivalentes de quercetina) por mg de materia seca. Estos autores afirmaron que esta cantidad es alta ya que los flavonoides están presentes principalmente en la cáscara y el bagazo. Por otro lado, Fajardo-Romero y col. (2016) cuantificaron flavonoides de la cubierta exterior de la cebolla roja, obteniendo 0.0046 mg de flavonoides (equivalentes de quercetina) por mg de materia seca. En ambos casos se cuantificaron los flavonoides totales (glicosilados inactivos y desglicosilados). En este estudio, la producción de flavonoides aumentó hasta 57 veces en medio líquido y 8.19 veces en medio superficial. El presente trabajo demuestra que la bioconversión puede superar las restricciones de las extracciones de fuentes vegetales de estos compuestos, y además (Cao y col., 2015; Lee y col., 2014), los flavonoides están libres de glicosilación y de uniones complejas con otros compuestos fenólicos (Marín y col., 2018).

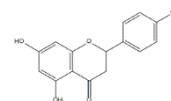


**Figura 6.8.** Análisis UPLC-ESI-MS/MS de flavonoides obtenidos por *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo líquido.



### 6.3.3. Producción de Apigenina

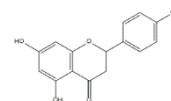
Esta flavona se produce como resultado de la reacción oxidativa catalizada por una dioxigenasa dependiente de la 2-oxoglutarato (2-ODG) con actividad flavona sintasa (FNS) en la naringenina precursora que causa la formación de un enlace doble carbono-carbono (Marín y col., 2017). Es interesante observar que las tasas de formación de apigenina biosintetizada por *Y. lipolytica* 2.2ab fueron  $2.89 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$  y  $21.68 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$  en medio superficial y líquido, respectivamente. Esto es trascendental teniendo en cuenta las actividades quimiopreventivas, antiinflamatorias y antioxidantes asociadas a este metabolito (Tong y col., 2012). En un trabajo relacionado, Park y col. (2010) llevaron a cabo la bioconversión de  $136 \text{ mg L}^{-1}$  de naringenina a apigenina con células recombinantes de *Streptomyces venezuelae* obteniendo  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de esta flavona, los autores aumentaron la producción de apigenina a  $15.3 \text{ mg L}^{-1}$  usando estas células recombinantes de *S. venezuelae* suplementadas con  $1.2 \text{ mM}$  de ácido 4-cumárico y  $2 \text{ g L}^{-1}$  de malonato de sodio mediante la introducción de *matB* y *matC* que codifica la malonil-CoA sintetasa, que oxida el precursor formando un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Park y col., 2011). Recientemente, Marín y col. (2017) informaron la producción de apigenina y naringenina por células de *Streptomyces albus* genéticamente modificadas y usando como precursor  $1.2 \text{ mM}$  de ácido 4-cumárico y de  $13.5 \text{ mM}$  malonato de sodio, las concentraciones de apigenina y naringenina fueron  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.014 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Estos autores aumentaron la producción de apigenina al agregar naringenina a una concentración de  $0.1 \text{ mM}$  ( $27.23 \text{ mg L}^{-1}$ ), obteniendo  $0.384 \text{ mg L}^{-1}$  de apigenina. Cabe destacar que la obtención de apigenina en esta tesis tanto en medio líquido como en medio superficial para algunos experimentos, fue mayor en comparación con los resultados previamente reportados. La Figura 6.9 muestra la posible vía durante la producción de flavonoides en el cultivo de superficial obtenido a partir de una concentración inicial de naringenina de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , lo que indica que las enzimas del aparato enzimático de *Y. lipolytica* 2.2ab podrían desempeñar un papel importante en la bioconversión. La naringenina es un sustrato de la enzima 2-ODG con actividad de FNS hacia la apigenina para la formación de un doble enlace entre el carbono 2 y 3 de la naringenina. La acción de esta enzima oxidoreductasa con actividad de FNS es buena en *Y.*

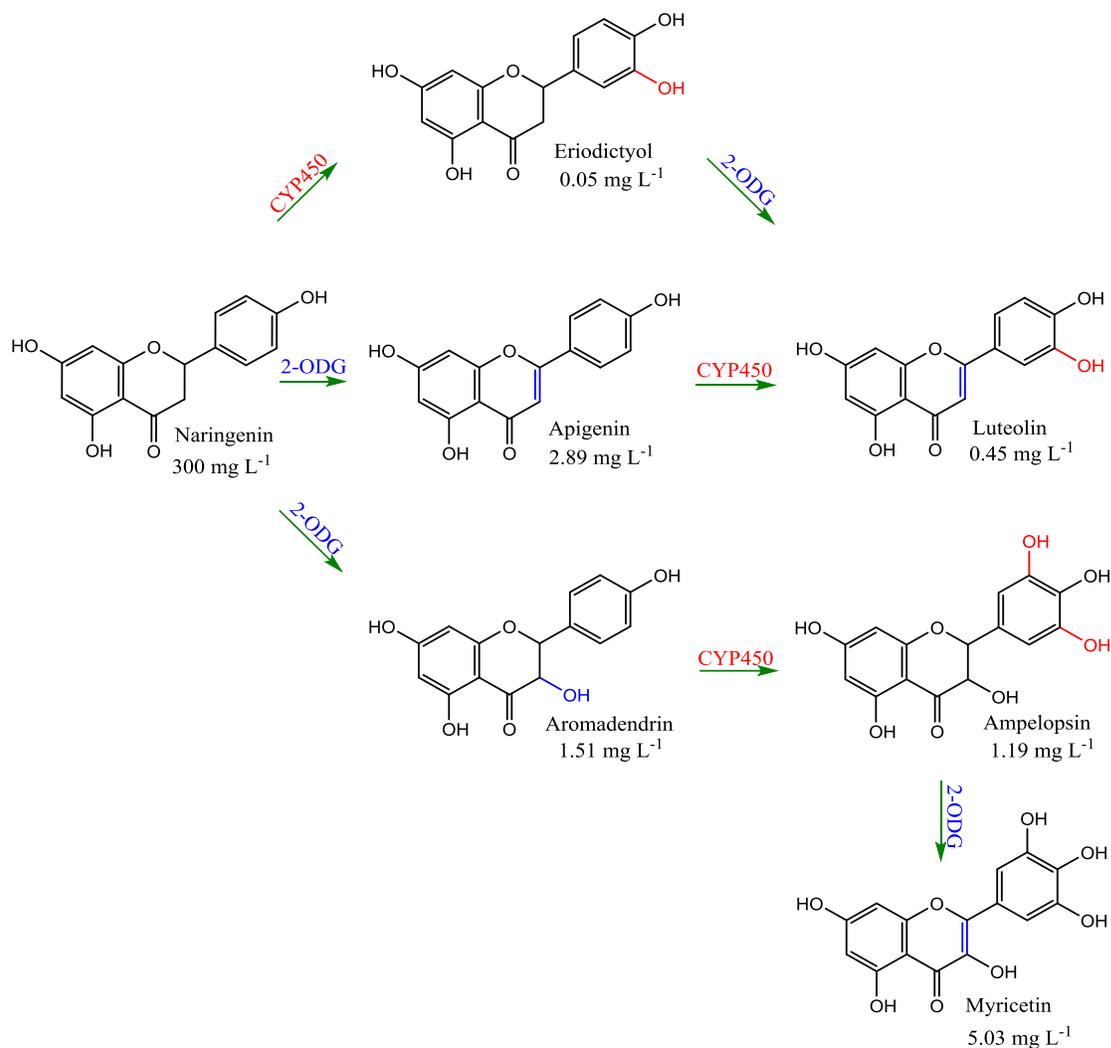


*lipolytica* 2.2ab porque se detecta una mayor cantidad de apigenina que la de su precursor en ambos medios.

**Tabla 6.5.** Concentración de productos de la bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab en medio superficial.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )							
Naringenina inicial	Apigenina	Eriodictiol	Miricetina	Aromadetrina	Ampelopsina	Naringenina residual	Y <sub>P/S</sub>
100	2.97±0.09	0.00±0.00	1.27±0.00	1.49±0.00	2.10±0.01	0.90±0.07	0.079
150	3.80±0.85	0.00±0.00	4.23±0.17	0.58±0.00	2.28±0.22	1.30±0.45	0.074
200	2.33±0.18	0.00±0.00	4.13±0.64	0.55±0.05	1.60±0.36	0.71±0.11	0.032
300	2.89±0.11	0.05±0.00	5.03±1.10	1.51±0.04	1.19± 0.90	0.86± 0.05	0.028
450	2.86±0.07	0.05±0.00	4.00± 0.09	1.60± 0.23	1.15± 0.11	0.82±0.00	0.016
600	3.00±0.16	0.00±0.00	4.18±0.19	1.46±0.00	1.10± 0.09	0.82±0.00	0.012
800	10.40±4.40	0.00±0.00	3.90±0.70	1.48±0.10	1.28±0.25	5.33±2.19	0.009
1000	3.04±0.04	0.04±0.00	4.36±0.11	1.46±0.00	1.09±0.08	0.83±0.02	0.007
1500	3.03±0.22	0.14±0.00	4.38±0.13	1.47±0.00	2.10±0.22	0.89±0.09	0.006
2000	2.41±0.16	0.14±0.00	4.30±0.19	1.45±0.00	1.28±0.29	0.82±0.00	0.004
3000	3.13±0.36	0.00±0.00	4.31±0.12	1.46±0.00	1.45±0.25	1.02±0.01	0.003
4500	3.46±0.44	0.00±0.00	1.54±0.03	1.49±0.03	1.30±0.23	0.99±0.13	0.001
6000	4.50±0.47	0.00±0.00	0.00±0.00	1.44±0.07	1.41±0.06	1.40±0.32	0.001

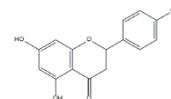




**Figura 6.9.** Vía biosintética de flavonoides sugerida para *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo superficial. Dos enzimas son responsables de la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab, CYP450 (monoxigenasa citocromo P450) y 2-ODG (dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato).

#### 6.3.4. Producción de Eriodictiol

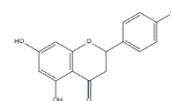
Esta molécula pertenece al grupo de las flavanonas como la forma hidroxilada de la naringenina biocatalizada por CYP450 con actividad F3'H que hidroxila el carbono 3' del precursor. La producción de eriodictiol fue de  $0.05 \pm 0.00$  mg L<sup>-1</sup> y  $0.29 \pm 0.02$  mg L<sup>-1</sup> en medio superficial y en medio líquido, respectivamente. Informes anteriores indican que las células recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* promovieron la bioconversión de naringenina a eriodictiol por el complejo enzimático CYP450 (Chung y col., 2011; Kasai y



col., 2009; Zhu y col., 2014). La producción de eriodictiol en este trabajo es ligeramente superior a la reportada en otras publicaciones, por ejemplo, se informó que la producción de eriodictiol a una concentración de 0.002 mg L<sup>-1</sup> usando células recombinantes de *S. albus* como biocatalizador (Marín y col., 2017). En un trabajo relacionado por Chu y col. (2016), las células enteras de *Bacillus megaterium* dio como resultado 13.53 mg L<sup>-1</sup> de eriodictiol. Sin embargo, a pesar de una tasa de crecimiento celular estable por encima de 100 µM (27.23 mg L<sup>-1</sup>) de naringenina, la conversión disminuyó, lo que se atribuyó a una inhibición de la reacción de hidroxilación. Palmerin-Carreño y col. (2015) también observaron la inhibición del sustrato y del producto de *Y. lipolytica* 2.2ab durante la bioconversión de (+)-valenceno a (+)-nootkatona. Curiosamente, la producción de eriodictiol no ha sido reportada previamente por *Y. lipolytica* en medio superficial como en medio líquido, a pesar de la baja concentración que se obtuvo en este estudio. En cultivo líquido, la evidencia experimental sugiere que la actividad de FNS es más eficiente que la de F3'H debido a una mayor concentración de apigenina que de eriodictiol.

### 6.3.5. Producción de Luteolina

Las tasas de formación de luteolina biosintetizada por *Y. lipolytica* 2.2ab fueron 0.45 mg L<sup>-1</sup> y 0.14 mg L<sup>-1</sup> en medio superficial y líquido, respectivamente (Tabla 6.6). Esta flavona sólo fue detectada en la bioconversión por *Y. lipolytica* 2.2ab a una concentración inicial de 100 mg L<sup>-1</sup> en medio líquido y 300 mg L<sup>-1</sup> en medio superficial. Marín y col. (2017) informaron una producción de 0.09 mg L<sup>-1</sup> de luteolina por células de *S. albus* genéticamente modificadas, lo que sugiere que esta flavona se forma a partir de la apigenina como sustrato de la enzima CYP450 con actividad F3'H que cataliza la reacción de hidroxilación en el carbono 3' hacia la luteolina. La Figura 6.10 representa la ruta biosintética sugerida para la producción de flavonoides por *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo líquido usando 100 mg L<sup>-1</sup> de naringenina inicial. La luteolina podría producirse con su precursor la apigenina y por la acción de la enzima CYP450 con actividad F3'H, además, también podría producirse a partir del precursor eriodictiol y por la actividad de la enzima FNS.

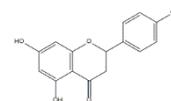


**Tabla 6.6.** Concentración de luteolina y quercetina de la bioconversión de naringenina por *Yarrowia lipolytica* 2.2ab en cultivo superficial y líquido.

Concentración inicial de naringenina (mg L <sup>-1</sup> )	Tipo de cultivo	Flavonoides producidos (mg L <sup>-1</sup> )	
		Luteolina	Quercetina
100	Líquido	0.14 ± 0.00	0.60 ± 0.00
300	Superficial	0.45 ± 0.00	---

### 6.3.6. Producción de Aromadetrina

De los compuestos identificados en ambos tipos de cultivos, hay tres posibles productos directos de naringenina; dos de ellas hidroxiladas, la aromadetrina y el eriodictiol, y el tercer compuesto es la deshidrogenada apigenina. Para el primero, la naringenina sirve como sustrato de la actividad F3H de la 2-ODG hidroxilando el carbono 3 para obtener aromadetrina. La aromadetrina, también llamada dihidrokaempferol, es una 3-hidroxi flavonona presente en las frutas cítricas que presenta mayor actividad antioxidante a medida que aumenta el grado de hidroxilación de los flavonoides (Prasetyo y col., 2011). Las tasas de formación de aromadetrina biosintetizada por *Y. lipolytica* 2.2ab fueron de 1.51 ± 0.04 mg L<sup>-1</sup> y 0.61 ± 0.16 mg L<sup>-1</sup> en medio superficial y líquido, respectivamente. En un trabajo similar, Amor y col. (2010) utilizaron una cepa recombinante de *E. coli* que expresa el gen de hidroxilación de flavonoides en plantas obtuvieron 35 mg L<sup>-1</sup> de aromadetrina a partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de naringenina en una sola etapa de hidroxilación del flavonoide. También se informó la producción de este flavanonol por células recombinantes de *S. albus* y *S. coelicolor*, obteniendo una concentración por debajo de 0.03 mg L<sup>-1</sup> y 0.028 ± 0.003 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Marín y col., 2018). Cabe destacar que por primera vez se reporta la producción de aromadetrina por células completas de *Y. lipolytica* en medio superficial.

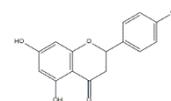


### 6.3.7. Producción de Quercetina

Este flavanol se detectó a una concentración de 0.60 mg L<sup>-1</sup>. Cabe destacar que la formación de quercetina solo se cuantificó a 100 mg L<sup>-1</sup> de naringenina inicial en medio líquido (Tabla 6.6). La quercetina tiene actividad antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria (Trueba, 2003). Este metabolito se puede obtener a partir de la aromadetrina por la actividad F3'H de la CYP450 y posteriormente por la actividad FLS1 de la 2-ODG, hidroxilando el anillo B y formando un doble enlace en el anillo C. Las células genéticamente modificadas de *E. coli* produjeron quercetina (0.18 mg L<sup>-1</sup>) de naringenina (Leonard y col., 2006). En otro trabajo, Trantas y col. (2009) realizaron la bioconversión de 136 mg L<sup>-1</sup> de naringenina obteniendo 0.38 mg L<sup>-1</sup> de quercetina por células recombinantes de *S. cerevisiae*. Recientemente, la producción de quercetina por células genéticamente modificadas de *S. albus* y *S. coelicolor* fue de 0.102 ± 0.008 mg L<sup>-1</sup> y 0.030 ± 0.002 mg L<sup>-1</sup> de este flavanol, respectivamente (Marín y col., 2018). En el presente trabajo, la producción de quercetina por *Y. lipolytica* 2.2ab fue ligeramente mayor en comparación con estas células genéticamente modificadas.

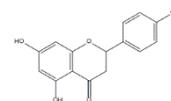
### 6.3.8. Producción de Ampelopsina

La tasa de formación de ampelopsina, también llamada ampeloptina o dihidromiricetina, biosintetizada por *Y. lipolytica* 2.2ab fue de 1.19 ± 0.90 mg L<sup>-1</sup> y 1.45 ± 0.15 mg L<sup>-1</sup> en medio superficial y líquido, respectivamente. Cabe destacar que la producción de ampelopsina por células enteras no se ha informado previamente y, en general, este flavanonol se obtiene mediante extractos purificados de plantas como *Hovenia dulcis*, *Ampelopsis megalophylla*, *Ampelopsis cantoniesis*, *Ampelopsis chaffanjoni*, *Ampelopsis sinica*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Ampelopsis brevipedunculata* y *Ampelopsis grossedentata* (Cheng y col., 2017; X. Kou y col., 2017; Kou y Chen, 2012; Pinto y col., 2017). Este compuesto se puede obtener mediante la actividad F3'5'H de la CYP450 usando aromadetrina como precursor. Según la literatura, la ampelopsina no se ha informado como producto del proceso de bioconversión con células enteras.



### 6.3.9. Producción de Miricetina

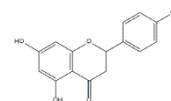
La ampelopsina es sustrato de la enzima 2-ODG con actividad FLS1 formando así un doble enlace en el anillo C, provocando que este flavanonol sea precursor del producto final miricetina, el cual es un flavonoide común derivado de plantas que exhibe una amplia gama de fuertes propiedades biológicas incluyendo actividades antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos y antiinflamatorios (Semwal y col., 2016). La miricetina también puede formarse tomando quercetina como precursor por la actividad F3'5'H de la CYP450 hidroxilando el carbono 5' de este flavanol. De acuerdo con nuestra ruta propuesta, la miricetina es el compuesto final de la ruta biosintética; por lo tanto, se destaca un efecto del tipo de cultivo para obtener los diferentes compuestos. Las tasas de formación de miricetina biosintetizada por *Y. lipolytica* 2.2ab utilizando una concentración de naringenina inicial de 100 mg L<sup>-1</sup> y 300 mg L<sup>-1</sup> fueron de 5.03 ± 1.10 mg L<sup>-1</sup> y 1.48 ± 0.03 mg L<sup>-1</sup> en medio superficial y líquido, respectivamente. Otro estudio relacionado indicó que las células de *E. coli* recombinantes llevaron a cabo la bioconversión de naringenina y eriodictiol obteniendo 0.01 mg L<sup>-1</sup> de miricetina (Leonard y col., 2006). Además, las células genéticamente modificadas de *S. albus* y *S. coelicolor* llevaron a cabo la bioconversión de naringenina (86.69 mg L<sup>-1</sup>) a miricetina obteniendo 0.04 ± 0.006 mg L<sup>-1</sup> y menos de 0.03 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Marín y col., 2018). Nuevamente, la producción de miricetina por *Y. lipolytica* 2.2ab en este estudio es mayor en comparación con las células genéticamente modificada



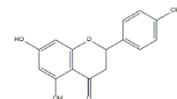
**Tabla 6.7.** Concentración de productos de la bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab en medio líquido.

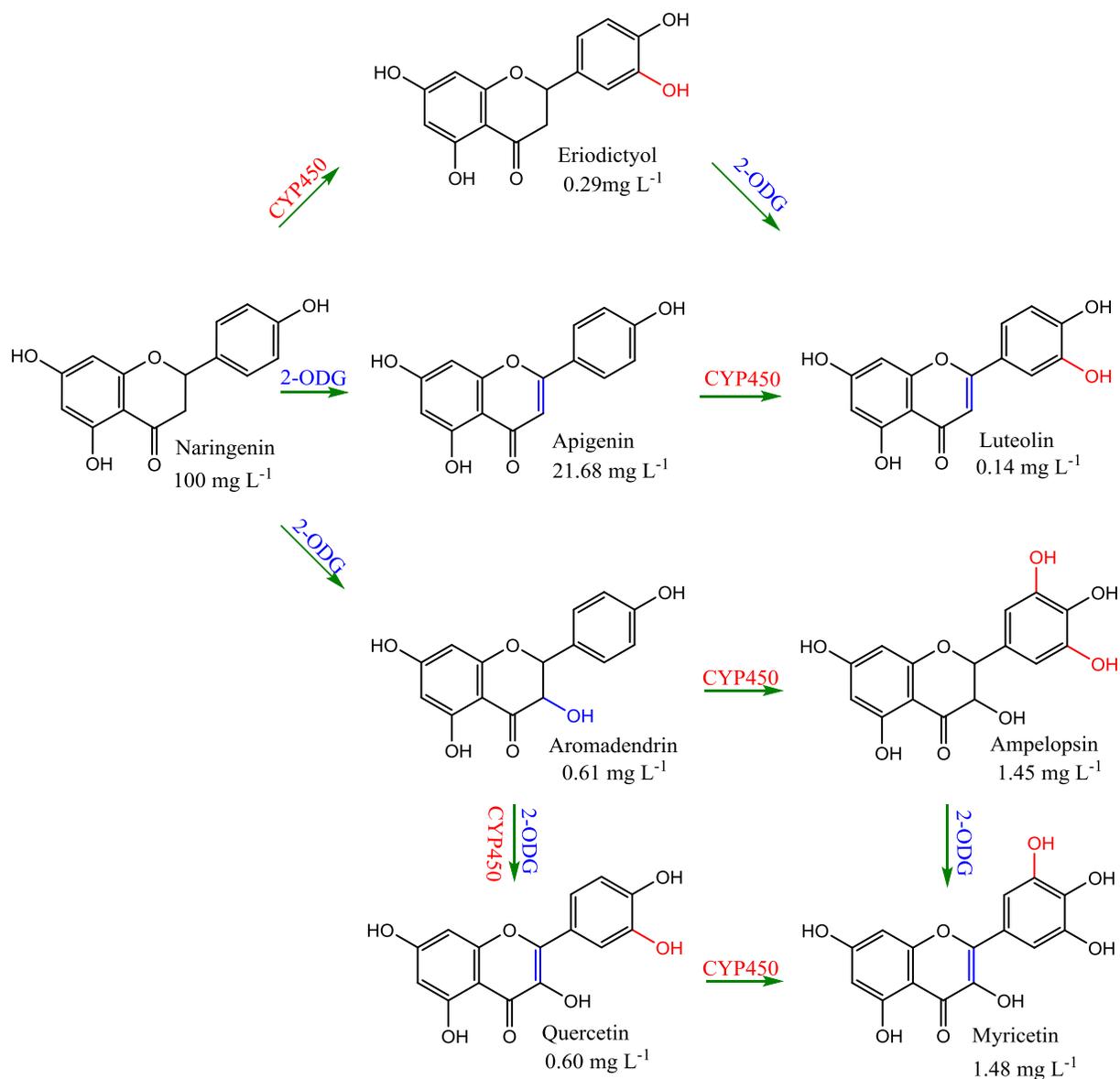
Concentración (mg L <sup>-1</sup> )							
Naringenina inicial	Apigenina	Eriodictiol	Miricetina	Aromadetrina	Ampelopsina	Naringenina residual (mg L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>
100	21.68±0.00	0.29±0.02	1.48±0.03	0.61±0.16	1.45±0.15	17.03±5.40	0.319
150	23.65±12.28	2.17±0.04	1.40±0.03	1.48±0.00	1.70±0.25	11.37±0.63	0.225
200	15.38±4.45	2.16±0.00	3.14±0.05	0.52±0.00	1.69±0.24	9.95±2.33	0.122
300	25.06±3.67	0.06±0.00	3.50±0.07	1.61±0.12	2.47±0.15	17.20±4.10	0.119
450	20.65±5.07	0.04±0.00	3.170±09	1.50±0.01	3.60±0.90	15.34±2.94	0.068
600	21.89±4.23	0.00±0.00	1.53±0.03	1.47±0.03	2.85±0.38	13.77±1.11	0.048
800	33.80±6.02	0.05±0.00	1.45±0.11	1.53±0.09	4.63±0.36	22.49±4.87	0.053
1000	28.76±3.05	0.07±0.00	1.46±0.01	1.47±0.02	4.07±0.68	18.13±1.67	0.037
1500	24.21±5.79	0.05±0.00	1.44±0.00	1.50±0.06	5.89± 0.05	16.22±2.44	0.022
2000	19.74±3.83	0.04±0.00	1.42±0.01	1.46±0.00	6.47±0.376	12.64±3.71	0.015
3000	20.18±0.91	0.05±0.00	1.50±0.05	1.50±0.07	9.21±1.52	13.20±0.70	0.011
4500	33.08±8.76	0.05±0.00	1.55±0.05	1.63±0.02	11.15±0.70	13.85±2.71	0.011
6000	38.00±4.95	0.00±0.00	1.49±0.12	1.50±0.05	11.55±0.86	21.96±4.40	0.009

Las vías biosintéticas (Figura 6.9-6.10) para producir estos metabolitos a partir de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab coincide con las vías que se producen en las plantas (Crozier y col., 2009). Allí, el complejo CYP450 y la 2-ODG contienen el sistema enzimático responsable de la síntesis de flavonoides (Araújo y col., 2014; González-Mendoza, 2007). Las vías biosintéticas para *Y. lipolytica* 2.2ab se proponen utilizando la estructura molecular de los flavonoides obtenidos y los datos bibliográficos de posibles enzimas involucradas en

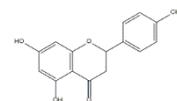


las reacciones de deshidrogenación e hidroxilación (Crozier y col., 2009). Además de las flavonoides hidroxilasas, existen la flavona sintasa y la flavanol sintasa 1 reportadas en plantas, algunas cepas de *Y. lipolytica* muestran actividades interesantes para monooxigenasas y dioxigenasas con importantes aplicaciones industriales (Bordewick y col., 2018). Vale la pena señalar que no hay informes sobre la producción de flavonoides y la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* utilizando cultivos superficial y líquido. Este trabajo también obtiene una alta producción de apigenina que de eriodictiol y aromadetrina, lo que sugiere que la enzima 2-ODG con actividad FNS es más eficiente que la CYP450 con actividad F3'H y F3'5'H en cultivo líquido. Esto concuerda con Marín y col. (2017) donde la enzima F3'H en *S. albus* no convirtió completamente la naringenina en eriodictiol y la apigenina en luteolina, lo que confirma que la enzima FNS es más eficiente que la F3'H debido a una mayor concentración de apigenina que el eriodictiol.



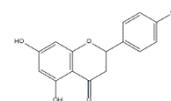


**Figura 6.10.** Vía biosintética de flavonoides sugerida para *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo líquido. Dos enzimas son responsables de la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab, CYP450 (monooxigenasa citocromo P450) y 2-ODG (dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato).

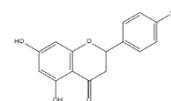


#### 6.4. Actividad antioxidante

Los flavonoides tienen una amplia variedad de actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antiviral, antialérgico, vasodilatadora, pero se caracterizan principalmente por su alta capacidad antioxidante (Das y Rosazza, 2006; Karabin y col., 2014; Madej y col., 2014; Markovic, 2007; Olsen y col., 2010; Ribeiro y col., 2008). La Tabla 6.10 muestra las mediciones de actividad antioxidante como porcentajes de inhibición de radicales sintéticos DPPH• y ABTS• de los extractos obtenidos en ambos tipos de cultivo. Los extractos mostraron una mayor actividad antioxidante que la solución de naringenina correspondiente utilizada como control. Algunos porcentajes de inhibición son similares a los del ácido ascórbico (vitamina C) (Chung y col., 2011; Zhu y col., 2014), presentando un porcentaje de inhibición del 92.8 % del radical DPPH• usando 2500 mg L<sup>-1</sup> (Osadebe y col., 2012). La actividad antioxidante obtenida después de la bioconversión en este estudio usando 100 mg L<sup>-1</sup> de naringenina en medio líquido fue 77.38 % y 40.12 % de inhibición de los radicales ABTS• y DPPH•, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Pérez-Nájera y col. (2013) para compuestos fenólicos extraídos de cáscaras de lima. En otro trabajo interesante, Habtemariam, (1997) realizó los ensayos de actividad antioxidante de una variedad extendida de flavonoides, demostrando que el eriodictiol es el flavonoide con el mayor poder antioxidante seguido de quercetina, miricetina, luteolina, apigenina y naringenina. El contenido total de flavonoides (Tabla 6.8) se cuantificó en los extractos para determinar la relación con la actividad antioxidante. Estos extractos obtenidos de la bioconversión mostraron un alto contenido de flavonoides totales que se correlaciona bien con los datos de los ensayos ABTS y DPPH. Esto concuerda con la publicación de Dangrit y Sompornpailin (2018) donde el alto contenido de flavonoides se correlaciona con una alta eliminación de radicales libres. En primera instancia de este trabajo, el porcentaje de inhibición de ABTS• es mayor que el de DPPH• y se presenta una relación ligeramente mayor entre el contenido de flavonoides y el porcentaje de inhibición de ABTS•, que muestra una diferencia significativa en los porcentajes de inhibición de ABTS• y DPPH• en ambos medios. Estudios previos mostraron discrepancias entre la actividad antioxidante reportada determinada por pruebas in vitro (Frejnagel, 2007). Bondet y col. (1997) mencionan que existe una reversibilidad en la reacción de DPPH• con compuestos fenólicos que causaría

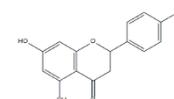


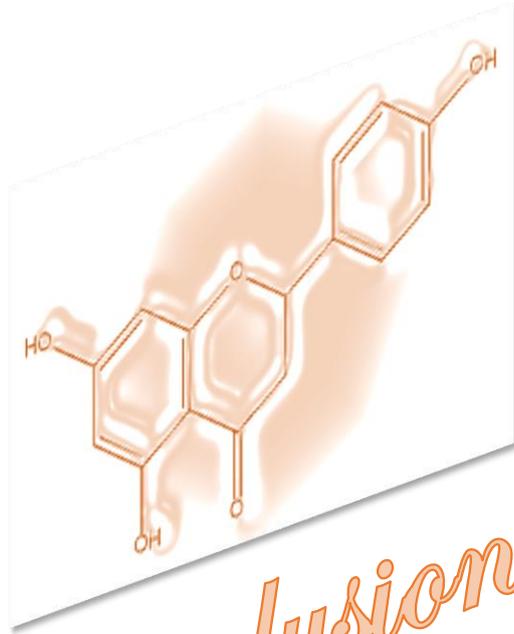
una disminución en la actividad antioxidante, lo que explica las diferencias entre los datos reportados. Además, el ABTS• muestra baja selectividad, reaccionando con cualquier compuesto aromático hidroxilado independientemente de su potencial antioxidante Pérez-Nájera y col. (2013). En el presente trabajo, los extractos con una concentración inicial de naringenina de 300 mg L<sup>-1</sup> en cultivo superficial mostraron una actividad de eliminación del radical DPPH• 9.67 veces mayor que la del precursor naringenina, y la eliminación del radical ABTS• fue de 1.13 veces. Vale la pena mencionar que todos los extractos contenían varios compuestos además de la naringenina residual. La estructura molecular de los flavonoides formados, determina su poder antioxidante, algunas modificaciones estructurales puede aumentar la actividad antioxidante, mientras que disminuye otros (Rice-Evans y col., 1996). En este estudio, los cambios moleculares no tuvieron efecto sobre la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados. Para el cultivo líquido, la eliminación de los radicales DPPH• y ABTS• del extracto con una concentración inicial de naringenina de 100 mg L<sup>-1</sup> fue 32.88 y 2.08 veces mayor que la de naringenina, respectivamente. La comparación de los porcentajes de inhibición de ABTS• y DPPH• mostró diferencias significativas (p <0.05) entre el cultivo superficial y líquido para la formación de compuestos con notable actividad antioxidante durante la bioconversión de naringenina (Tabla A3 y A4 del Anexo). Por lo tanto, hemos demostrado la bioconversión de naringenina en compuestos de alto valor agregado como apigenina, luteolina, quercetina, miricetina, aromadetrina, ampelopsina y eriodictiol por medio de células enteras de *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo superficial y líquido. La gran variedad de compuestos bioactivos que se generaron de la bioconversión de la naringenina son totalmente provechosos en la industria alimenticia como en la farmacéutica empleándolos como principios activos para la elaboración de diferentes formas farmacéuticas aplicables para el tratamiento de infecciones por diferentes microorganismos y enfermedades crónicas degenerativas. Además, este trabajo es un parteaguas para la producción futura por *Y. lipolytica* de muchas otras moléculas no naturales para aumentar sus propiedades biológicas.



**Tabla 6.8.** Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos.

Concentración inicial de naringenina (mg L <sup>-1</sup> )	Flavonoides totales [mg L <sup>-1</sup> ]		% inhibición				% inhibición de naringenina	
			ABTS•		DPPH•			
	Tipo de cultivo							
	Superficial	Líquido	Superficial	Líquido	Superficial	Líquido	ABTS•	DPPH•
100	53.33±7.63	65±7.07	46.93±1.04	77.38±2.84	19.29±1.58	40.12±0.25	37.143±2.67	1.22±0.15
150	108.33±0.0	128.33±12.58	56.48±3.16	78.53±6.13	21.03±0.38	40.79±1.59	49.08±0.85	1.64±0.20
200	121.66±10.40	169.33±19.13	60.59±2.63	75.21±0.47	21.07±0.99	40.05±0.72	51.16±2.56	2.17±0.03
300	225±20.81	239.16±10.56	66.94±4.78	79.35±7.88	21.27±12.44	41.20±1.38	59.13±1.35	2.20±0.01
450	266.66±54.08	369.16±28.97	67.91±5.31	77.84±2.79	37.71±0.92	41.10±0.22	59.57±0.33	2.96±0.20
600	420±52.04	543.33±16.07	70.22±3.19	79.78±4.93	36.57±0.88	40.64±0.25	65.97±3.54	3.26±0.31
800	533.33±56.78	731.66±20.81	77.07±0.86	78.89±0.11	37.20±0.45	40.92±0.56	69.66±3.09	3.35±0.65
1000	860±55.07	946.66±43.10	77.284±5.08	82.65±3.37	37.70±1.47	46.59±6.49	71.23±0.44	3.61±0.16
1500	908.33±13.22	1261.67±40.10	82.85±3.70	89.53±2.38	38.04±2.00	48.95±6.46	81.07±0.86	5.81±0.17
2000	1018.33±45.09	1958.33±37.52	87.64±2.32	91.39±1.48	48.07±0.35	64.06±0.79	83.97±0.08	6.66±0.06
3000	1685±105.83	2918.30±72.85	93.66±1.65	94.71±0.88	70.85±0.69	80.66±3.12	87.36±1.63	6.88±0.79
4500	2033.33±133.16	4396.66±85.78	94.55±1.57	95.07±1.29	80.88±1.22	81.17±2.35	89.37±0.53	7.00±1.18
6000	2691.66±111.39	5683.33±125.83	95.52±1.48	96.72±0.30	82.05±0.36	89.35±0.54	90.71±0.01	7.48±1.48





*Conclusiones*

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la conversión de naringenina con células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab mostraron potencial para aplicarse en biosíntesis de compuestos bioactivos, ya que, la naringenina es un precursor directo en la formación por bioconversión de otros compuestos con mayor valor agregado. Mediante reacciones de hidroxilación y deshidrogenación de naringenina.

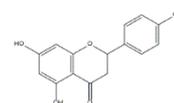
El medio PDA mostró en primera instancia que de los dos medios superficiales empleados *Y. lipolytica* 2.2ab posee potencial de bioconversión de la naringenina, en donde la levadura llevó a cabo las reacciones de modificación a la naringenina en un tiempo máximo de 192 h para obtener diferentes productos como la apigenina, luteolina, eriodictiol, floretina y catequina.

De los productos obtenidos durante la bioconversión de naringenina ( $42 \text{ mg L}^{-1}$ ) con *Y. lipolytica* 2.2ab en medio CDS se pudo identificar la presencia de los compuestos: apigenina, luteolina, eriodictiol, floretina y quercetina, mientras que la bioconversión en medio CPD los compuestos identificados fueron la apigenina, eriodictiol y floretina. La bioconversión de la naringenina en buffer de fosfatos en donde las células de *Y. lipolytica* 2.2ab provenían de los medios CDS y CPD, se identificaron dos compuestos como productos: apigenina y floretina.

Los tipos de cultivo en los que se observó mayor producción de flavonoides fueron en medio Superficial y en Caldo Dextrosa Sabouraud, por lo que se determinó continuar los estudios del efecto de la concentración de la naringenina en el proceso de bioconversión por *Y. lipolytica* 2.2ab en estos dos medios, en donde las concentraciones de cada producto dependieron del tipo de cultivo y la concentración inicial de naringenina.

En el cultivo superficial se identificaron seis compuestos diferentes: apigenina, luteolina, eriodictiol, aromadetrina, miricetina y ampelopsina; y en el cultivo líquido se identificaron siete compuestos diferentes: apigenina, luteolina, eriodictiol, aromadetrina, miricetina, ampelopsina y quercetina.

A una concentración inicial de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de naringenina en cultivo líquido, todos los productos identificados y cuantificados estaban presentes con un rendimiento ( $Y_p/s$ ) de 0.319, el cual fue el más alto. En este cultivo líquido la cantidad de flavonoides bioactivos producidos fue de 26.43 mg, obteniendo así 0.2643 mg de producto por mg de naringenina. Y en cultivo superficial a la concentración de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de naringenina se

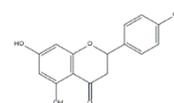


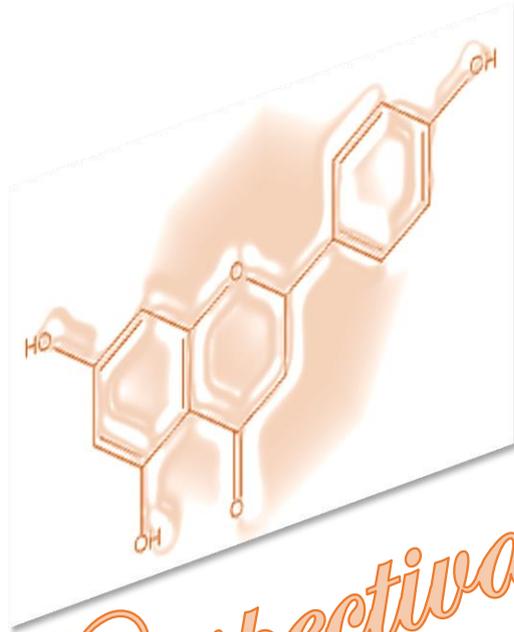
observó la mayor cantidad de flavonoides bioactivos producidos identificados y cuantificados, obteniendo  $11.3 \text{ mg L}^{-1}$  de flavonoides bioactivos, que representa  $0.0377 \text{ mg}$  de producto por  $\text{mg}$  de naringenina.

La obtención de flavonoides mediante la bioconversión de naringenina puede superar las restricciones de las extracciones de fuentes vegetales de estos compuestos, además, los flavonoides están libres de glicosilación y de uniones complejas con otros compuestos fenólicos. De los compuestos obtenidos en esta bioconversión la ampelopsina es el compuesto que no se ha informado previamente como producto de bioconversión utilizando células enteras. Por otro lado, el análisis de los compuestos obtenidos permitió proponer posibles rutas de síntesis en ambos cultivos.

Los extractos mostraron una mayor actividad antioxidante que la solución de naringenina correspondiente utilizada como control. Algunos porcentajes de inhibición son similares a los de la vitamina C. El extracto con una concentración inicial de naringenina de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  en cultivo superficial mostraron una actividad de eliminación del radical  $\text{DPPH}^\bullet$  9.67 veces mayor que la del precursor naringenina, y la eliminación del radical  $\text{ABTS}^\bullet$  fue de 1.13 veces. Para el cultivo líquido, la eliminación de los radicales  $\text{DPPH}^\bullet$  y  $\text{ABTS}^\bullet$  del extracto con una concentración inicial de naringenina de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  fue 32.88 y 2.08 veces mayor que la de naringenina, respectivamente.

En la bioconversión de la naringenina se generaron una gran variedad de compuestos bioactivos que son totalmente provechosos en la industria alimenticia como en la farmacéutica empleándolos como principios activos para la elaboración de diferentes formas farmacéuticas aplicables para el tratamiento de infecciones por diferentes microorganismos y enfermedades crónicas degenerativas. Además, este trabajo es un parteaguas para la producción futura de muchas otras moléculas no naturales.





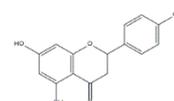
*Perspectivas*

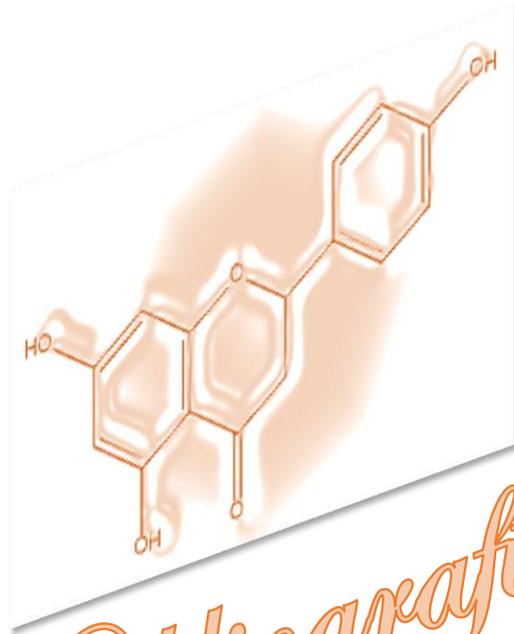
## VIII. PERSPECTIVAS

Realizar el aislamiento y purificación de los compuestos no identificados por el UPLC-MS/MS mediante cromatografía preparativa en columna y HPLC; e identificar las estructuras moleculares por medio de la técnica analítica de resonancia magnética nuclear (RMN).

Para llevar a cabo el proceso de bioconversión a un sistema escalado y optimizado es necesario incluir variantes, para lograr definir las condiciones de operación, las cuales evidentemente influyen en el proceso como el pH, temperatura y la concentración del oxígeno.

Llevar a cabo la producción biotecnológica de flavonoides a través de vías biosintéticas de plantas que puedan ser reconstruidas para la expresión heteróloga en *Y. lipolytica* empleando otros precursores de interés con menor actividad antioxidante que permitan la formación de compuestos importantes en la industria, principalmente en la farmacéutica.

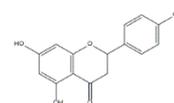




# *Bibliografika*

## IX. BIBLIOGRAFÍA

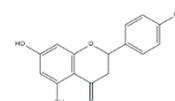
- Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Puccinelli, D., Mouz, N., Leclaire, J., Leblond, Y. y Carrière, F. (2007). Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(2), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.12.006>
- Álvarez, E. y Cambeiro, O. (2003). Actividad biológica de los flavonoides ( I ). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130–140.
- Amor, I. L.-B., Salem, N., Guedon, E., Engasser, J.-M., Chekir-Ghedrira, L. y Ghouli, M. (2010). Preliminary investigation of naringenin hydroxylation with recombinant *E. coli* expressing plant flavonoid hydroxylation gene. *Natural Product Communications*, 5(5), 777–782. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521546>
- Araújo, W. L., Martins, A. O., Fernie, A. R. y Tohge, T. (2014). 2-oxoglutarate: Linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 5(552), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00552>
- Arias, L. D., Montañón D, L. N., Velasco S, M. A. y Martínez G, J. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Tecnura*, 22(57), 55–68. <https://doi.org/10.14483/22487638.12178>
- Bondet, V., Brand-Williams, W. y Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- Bonora, A. y Mares, D. (1982). A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms. *Current Microbiology*, 7(4), 217–221. <https://doi.org/10.1007/BF01568802>
- Bordewick, S., Beier, A., Balke, K. y Bornscheuer, U. T. (2018). Baeyer-Villiger monooxygenases from *Yarrowia lipolytica* catalyze preferentially sulfoxidations. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.09.008>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Burgardt, N. I. (2016). *Caracterización bioquímica y biofísica de la proteína transportadora de esteroides de la levadura Yarrowia lipolytica* [Tesis de posgrado, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina]. <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/184>
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A. R. y Xiao, J. (2015). Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(1), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>
- Carrillo-Sancén, G. (2011). *Producción de lipasas por Yarrowia lipolytica en*



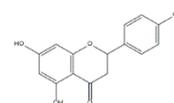
*fermentación en medio sólido* [Tesis de maestría , Universidad Autónoma Metropolitana].

<http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesiuami.izt.uam.mx:UAMI15495>

- Chalé, F. H., Ancona, D. B. y Campos, M. R. S. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutricion Hospitalaria*, 29(1), 10–20. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>
- Chang, T.-S., Lin, M.-Y. y Lin, H.-J. (2010). Identifying 8-hydroxynaringenin as a suicide substrate of mushroom tyrosinase. *Journal of Cosmetic Science*, 61(3), 205–210. [https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00619\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00619_1.x)
- Cheng, P., Gui, C., Huang, J., Xia, Y., Fang, Y., Da, G. y Zhang, X. (2017). Molecular mechanisms of ampelopsin from *Ampelopsis megalophylla* induces apoptosis in HeLa cells. *Oncology Letters*, 14(3), 2691–2698. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6520>
- Chu, L. L., Pandey, R. P., Jung, N., Jung, H. J., Kim, E.-H. y Sohng, J. K. (2016). Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. *Microbial Cell Factories*, 15(135), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0533-4>
- Chung, D. M., Chung, Y. C., Maeng, P. J. y Chun, H. K. (2011). Regioselective deglycosylation of onion quercetin glucosides by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 33(4), 783–786. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0501-8>
- Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F. y Belo, I. (2010). *Yarrowia lipolytica* : an industrial workhorse. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 930–944.
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F. y Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Corrales MSc, L. C. y Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213–225. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
- Crozier, A., Jaganath, I. B. y Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Dabrowska, C. C. y Moya, M. S. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Madrid: Sanidad y Ediciones*, 2–34. [http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS\\_Y\\_ANTIOX\\_EL\\_MEDICO.pdf?botsearch](http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf?botsearch)
- Dangrit, D. y Sompornpailin, K. (2018). Antioxidant Activities of Transgenic Flower Over-Expressing FLS and TT8 Involving in Flavonoid Biosynthesis. *Applied Mechanics and Materials*, 879, 78–82. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.879.78>

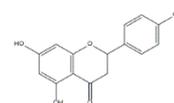


- Das, S. y Rosazza, J. P. N. (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products*, 69(3), 499–508. <https://doi.org/10.1021/np0504659>
- Drago-Serrano, M., López-López, M. y Sainz-Espuñes, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(4), 58–68.
- Eggersdorfer, M. y Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T. y Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2986–3008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014>
- Estrada-Sierra, N. A. (2015). *Exploración de las interacciones fisicoquímicas de los flavonoides-matriz en un producto de lima (Citrus limetta) y/o naranja agria (Citrus aurantium) y su efecto en las propiedades hipoglucemiantes e hipocolesterolémicas en modelo animal* [Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.]. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58159>
- Fajardo-Romero, A. (2016). Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*). *UGCiencia*, 22(1), 119–126. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.599>
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P. y Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(222), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A. y Bei, R. (2015). In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9236–9282. <https://doi.org/10.3390/ijms16059236>
- Fernández-Rebaza, G. A. (2018). *Efecto citotóxico, antitumoral, antioxidante in vitro y antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de Hesperomeles cuneata Lindl. Y estructura química de sus flavonoides* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/8642>
- Frejnagel, S. (2007). Comparison of polyphenolic composition of extracts from honeysuckle, chokeberries and green tea - a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57(1), 83–86.
- Fuentes Lara, L. O. y Benavides Mendoza, A. (2004). *Alimentos funcionales* (1ra Edición). Departamento Editorial y Servicios de Apoyo de la Universidad Agraria Antonio Narro. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v7i0.872>
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U. y Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12(8), 1641–1673.

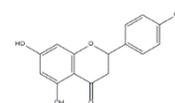


<https://doi.org/10.3390/12081641>

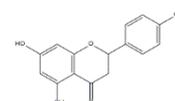
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. *Ambito Farmacéutico Nutrición*, 23(6), 80–84.
- Gómez-Gálvez, J. J. (2018). *Producción y calidad nutracéutica del melón injertado y cultivado con diferentes tensiones de humedad* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45393>
- González-Mendoza, D. (2007). El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(4), 177–183.
- González-Vallinas, M., González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A. y Ramírez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: A complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71(9), 585–599. <https://doi.org/10.1111/nure.12051>
- Gutiérrez-Salinas, J., Mondragón-Terán, P., García-Ortíz, L., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S. y Núñez-Ramos, N. R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 19(4), 446–454.
- Gutiérrez del Río Menéndez, I. (2015). *Desarrollo de plataformas bacterianas para la biosíntesis de polifenoles*. [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo].
- Habtemariam, S. (1997). Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- in L-929 tumor cells. *Journal of Natural Products*, 60(8), 775–778. <https://doi.org/10.1021/np960581z>
- Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D. y Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.002>
- Hernández-Guzmán, C. (2015). *Bioconversión de flavonoides cítricos utilizando células microbianas enteras* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Hirakawa, K., Kobayashi, S., Inoue, T., Endoh-Yamagami, S., Fukuda, R. y Ohta, A. (2009). Yas3p, an op11 family transcription factor, regulates Cytochrome P450 expression in response to n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 7126–7137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806864200>
- Hollman, P. C. H. (2014). Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.04.013>
- Jiménez-Atiéndzar, M., Escribano, J., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F. y García-Carmona, F. (2005). Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(9), 866–873. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.010>



- Jiménez-García, S. N. (2015). *Producción de compuestos bioactivos en pimiento marrón (Capsicum annuum L.) con diferentes factores inductores de metabolitos secundarios en condiciones protegidas*. [Tesis de posgrado, Universidad Autónoma de Queretaro].
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L. y Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1063–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Kasai, N., Ikushiro, S. ichi, Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Ohta, M. y Sakaki, T. (2009). Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.134>
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y. y Lee, C. Y. (2003). Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
- Kitamura, E., Otomatsu, T., Maeda, C., Aoki, Y., Ota, C., Misawa, N., y Shindo, K. (2013). Production of Hydroxylated Flavonoids with Cytochrome P450 BM3 Variant F87V and Their Antioxidative Activities. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(6), 1340–1343. <https://doi.org/10.1271/bbb.130148>
- Kou, X., Fan, J. y Chen, N. (2017). Potential molecular targets of ampelopsin in prevention and treatment of cancers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1610–1616. <https://doi.org/10.2174/1871521409666170412130529>
- Kou, Xianjuan. y Chen, N. (2012). Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.08.001>
- Lee, J. H., Oh, E. T., Chun, S. C. y Keum, Y. S. (2014). Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger* and *Cunninghamella elegans*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(4), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4145-6>
- Leonard, E., Yan, Y. y Koffas, M. A. G. (2006). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 8(2), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.001>
- Liu, R. H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(3), 384S-392S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003517>
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31–59. <https://doi.org/10.2174/138955709787001712>
- López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R. y Sánchez, S. (2012). Antioxidantes,



- un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM (Impresa)*, 5(1), 48–53.
- Madej, A., Popłoński, J. y Huszcza, E. (2014). Improved oxidation of naringenin to carthamidin and isocarthamidin by *Rhodotorula marina*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(1), 67–73. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0787-4>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. y Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J Clin Nutr. The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., Gasson, M. J. y Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2056–2064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Entrialgo-Cadierno, R., Claudio, Villar, J. y Lombó, F. (2018). De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, 13(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278>
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Yagüe, P., Manteca, Á., Villar, C. J. y Lombó, F. (2017). De novo biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Frontiers in Microbiology*, 8(921), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00921>
- Markovic, J. D. (2007). Flavonoids, the Role and the Importance in Modern Investigations. *Acta Agriculturae Serbica*, XII(23), 25–36.
- Minato, K. I., Miyake, Y., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Kato, Y., Shimomura, Y. y Osawa, T. (2003). Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sciences*, 72(14), 1609–1616. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02443-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02443-8)
- Nagy, T. O., Ledolter, K. y Solar, S. (2008). Oxidation of naringenin by gamma-radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(6), 728–733. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.10.007>
- Nugroho Prasetyo, E., Nyanhongo, G. S. y Guebitz, G. M. (2011). Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 46(4), 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.017>
- Olsen, K. M., Hehn, A., Jugdé, H., Slimestad, R., Larbat, R., Bourgaud, F. y Lillo, C. (2010). Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biology*, 10(21), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-21>
- Osadebe, P. O., Okoye, F. B. C., Uzor, P. F., Nnamani, N. R., Adiele, I. E. y Obiano, N. C. (2012). Phytochemical analysis, hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchornea cordifolia* methanol leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatic



damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(4), 289–293. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60041-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60041-8)

Palmerin-Carreño, D. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Verde Calvo, J. R., Prado-Barragan, A. y Huerta-Ochoa, S. (2015). Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 788–793. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.065>

Park, S. R., Ahn, M. S., Han, A. R., Park, J. W., & Yoon, Y. J. (2011). Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(11), 1143–1146. <https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08012>

Park, S. R., Paik, J. H., Ahn, M. S., Park, J. W. y Yoon, Y. J. (2010). Biosynthesis of plant-specific flavones and flavonols in *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(9), 1295–1299. <https://doi.org/10.4014/jmb.1005.05038>

Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M. y Del-Toro-Sánchez, C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista De Ciencias Biológicas Y De La Salud*, 15(3), 18–22. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.153>

Pinto, J. T., Alvarenga, L. F., Oliveira, D. P. de, Oliveira, T. T. de, Schwan, R. F., Dias, D. R. y Queiroz, J. H. De. (2017). Elaboration and characterization of Japanese Raisin Tree (*Hovenia dulcis* Thumb.) pseudofruits fermented alcoholic beverage. *Food Science and Technology*, 37(suppl 1), 101–108. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.25616>

Ribeiro, I. A. y Ribeiro, M. H. L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 19(4), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.007>

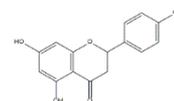
Ribeiro, I. A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H. y Ribeiro, M. H. (2008). Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52–53(1–4), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.10.011>

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

Roh, C., Seo, S. H., Choi, K. Y., Cha, M., Pandey, B. P., Kim, J. H., Park, J. S., Kim, D. H., Chang, I. S. y Kim, B. G. (2009). Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.021>

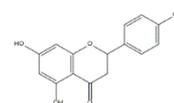
Rubio, C., Alurralde, T., Suárez, S. y Navarro, A. (2011). Producción de Naringenina por *Aspergillus niger* IB-56. *Boletín Micológico*, 26, 23–27.

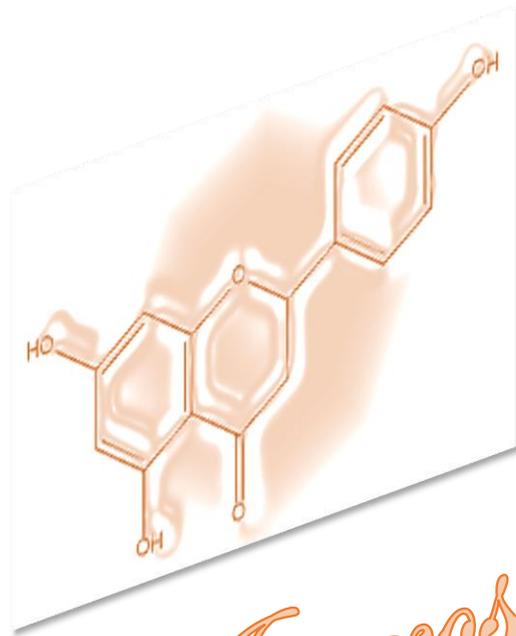
Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S. y Viljoen, A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 8(2), 1–31.



<https://doi.org/10.3390/nu8020090>

- Tong, X., Smith, K. A. y Pelling, J. C. (2012). Apigenin, a chemopreventive bioflavonoid, induces AMP-activated protein kinase activation in human keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, *51*(3), 268–279. <https://doi.org/10.1002/mc.20793>
- Tovar-Del Rio, J. (2013). *Determinación De La Actividad Antioxidante Por DPPH Y ABTS De 30 Plantas Recolectadas En La Ecoregion Cafetera* [Tesis de licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Trantas, E., Panopoulos, N. y Ververidis, F. (2009). Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, *11*(6), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.07.004>
- Trueba, G. P. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, *22*(1), 48–57.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Velasco B., R., Montenegro M., D. L., Vélez S., J. F., García P., C. M. y Durango R., D. L. (2009). Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *Botryodiplodia* y *Colletotrichum*. *Rev Soc Quím Perú*, *75*(1), 94–111. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=43446077&lang=es&site=ehost-live>
- Xu, J., Yang, L., Zhao, S. J., Wang, Z. T. y Hu, Z. B. (2012). An efficient way from naringenin to carthamidine and isocarthamidine by *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1803–1806. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0934-9>
- Zhang, J. (2007). Flavonoids in Grapefruit and Commercial Grapefruit Juices: Concentration, Distribution, and Potential Health Benefits. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, *120*, 288–294.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. y Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*, 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J. y Chen, J. (2014). Efficient synthesis of eriodictyol from l-tyrosine in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 3072–3080. <https://doi.org/10.1128/AEM.03986-13>





*Anescos*

## X. ANEXOS

### 10.1. Abreviaturas

**ABTS** = Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico

**AlCl<sub>3</sub>** = Cloruro de Aluminio

**ANOVA** = Análisis de Varianza

**A<sub>0</sub>** = Absorbancia al minuto cero

**A<sub>30</sub>** = Absorbancia al minuto treinta

**CHI** = Chalcona Isomerasa

**CHS** = Chalcona Sintasa

**CYP450** = citocromo P450

**Da** = Dalton

**DO** = Densidad Óptica

**DPPH** = 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo

**DSA** = Agar Dextrosa Sabouraud

**DSB** = Caldo Dextrosa Sabouraud

**ESI** = Ionización con Electrospray

**FLS1** = Flavonol Sintasa 1

**FNS** = Flavona Sintasa

**F3H** = Flavanona 3-Hidroxilasa

**F3'H** = Flavonoide 3'-Hidroxilasa

**F3'5'H** = Flavonoide 3'5'-Dihidroxilasa

**g** = Gramos

**HCl** = Ácido Clorhídrico

**HPLC** = Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**L** = Litros

**L-Phe** = L-fenilalanina

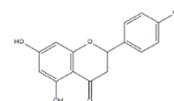
**mg** = Miligramos

**min** = Minutos

**mL** = Mililitros

**mM** = Milimolar

**m / z** = Relación masa - carga



**M** = Molar

**MRM** = Monitorización de reacción múltiple

**nm** = nanómetros

**NaCl** = Cloruro de Sodio

**NaNO<sub>2</sub>** = Nitrito de Sodio

**NaOH** = Hidróxido de Sodio

**pH** = Potencial de Hidrógeno

**rpm** = revoluciones por minuto

**PDA** = Agar Papa Dextrosa

**ROS** = Especies Reactivas de Oxígeno

**tr** = Tiempo de Retención

**UPLC** = Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución

**UPLC / MS-MS** = Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución acoplada a Masas

**UV** = Ultravioleta

**VIS** = Visible

**Yp/s** = Rendimiento del producto

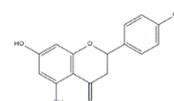
**Yx/s** = Rendimiento de biomasa

**2-ODG** = Dioxigenasa Dependiente de 2-Oxoglutarato

**°C** = Grados Celsius

**μL** = Microlitros

**μM** = Micromolar



## 10.2. Cronogramas de estándares comerciales de compuestos bioactivos

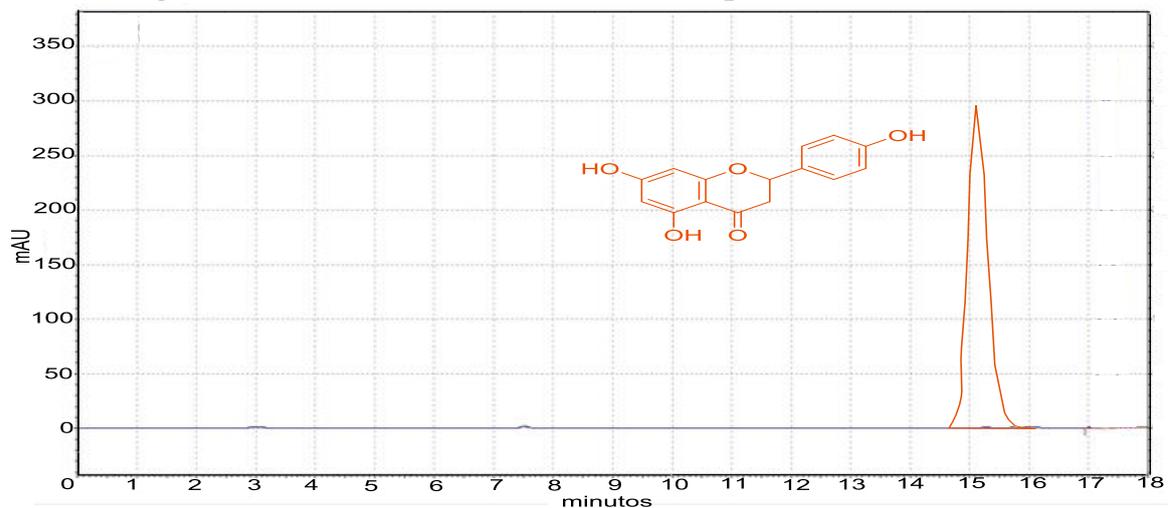


Figura A1. Estándar de naringenina.

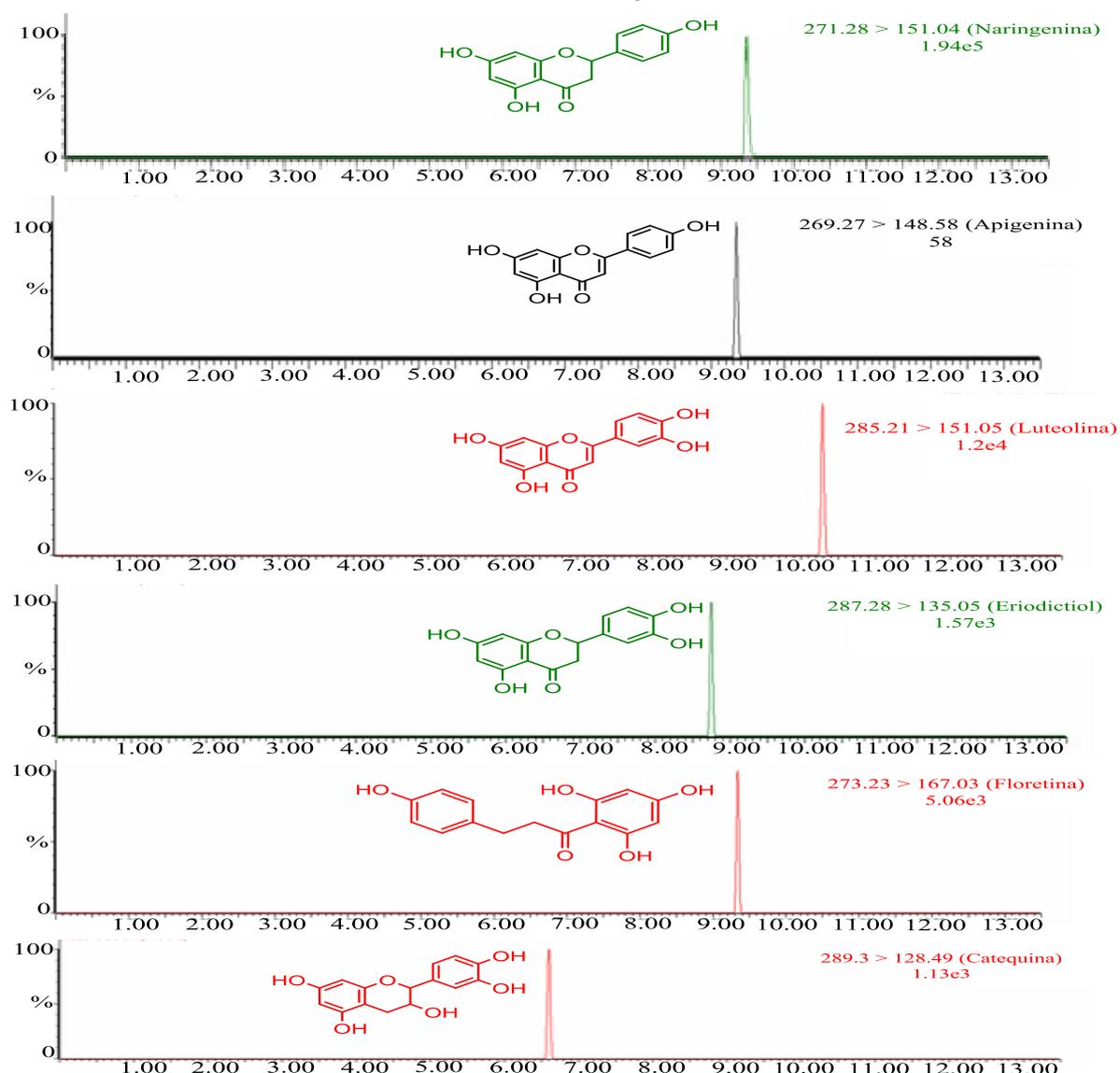
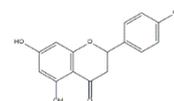
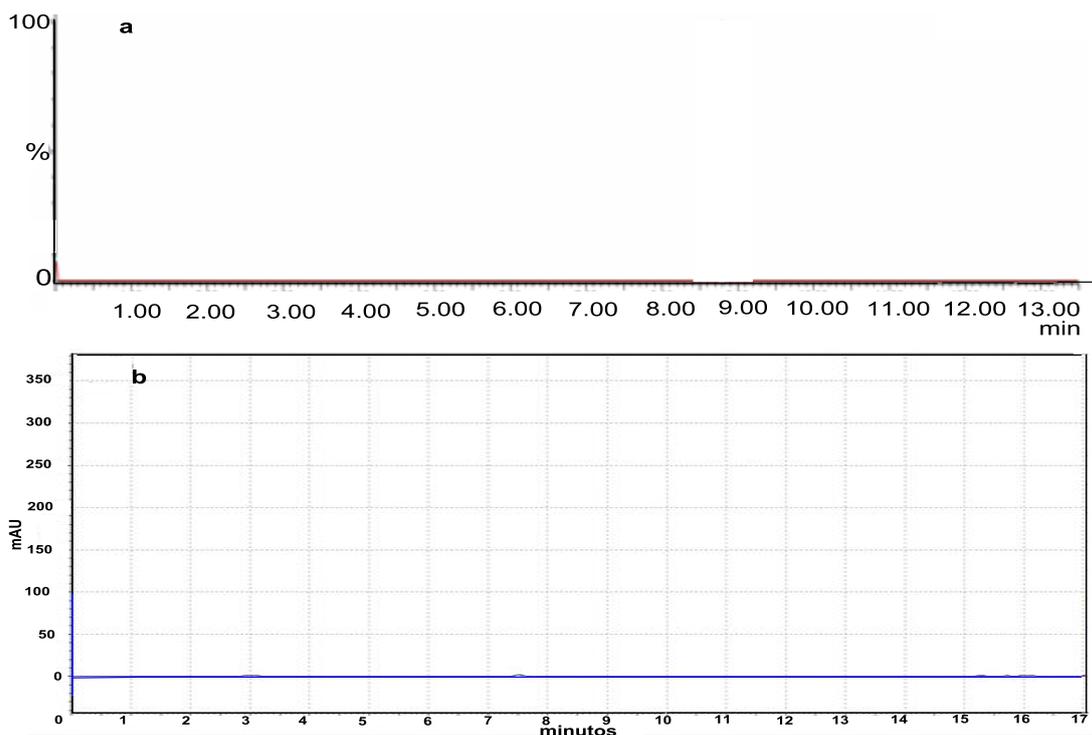


Figura A2. Estándares comerciales utilizados en el UPLC-MS/MS.





**Figura A3.** Análisis UPLC-MS/MS en MRM (a) y HPLC (b) de los medios superficial y líquido esterilizados e inoculados con *Y. lipolytica* 2.2ab. Las muestras fueron filtradas para la obtención de fragmentos y no se observan picos en ningún caso.

### 10.3. Análisis estadístico

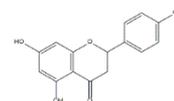
**Tabla A.1.** Prueba ANOVA de las concentraciones de los productos identificados en medio superficial.

#### Analysis of Variance Table and F-Test

Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Reject Equal Means? ( $\alpha=0.05$ )	Power ( $\alpha=0.05$ )
Between	12	12.01382	1.001151	0.2708	0.99190	No	0.14478
Within (Error)	65	240.3414	3.697561				
Adjusted Total	77	252.3553					
Total	78						

#### Descriptive Statistics

Group	Count (ni)	Mean	Effect	Median	Standard Deviation	Standard Error $\sqrt{(MSE/ni)}$
All	78	1.680641	1.680641			
A:						
Apigenina	13	3.678462	1.99782	3.03	2.096159	0.3003512
Eriodictiol	13	0.03230769	-1.648333	0	0.05182565	0.3003512
Miricetina	13	3.51	1.829359	4.18	1.527972	0.3003512
Aromadetrina	13	1.341538	-0.3391026	1.46	0.3470074	0.3003512
Ampelopsina	13	1.486923	-0.1937179	1.3	0.4113268	0.3003512
Luteolina	13	0.03461539	-1.646026	0	0.1248075	0.3003512



**Tabla A.2.** Prueba ANOVA de las concentraciones de los productos identificados en medio líquido.

Analysis of Variance Table and F-Test							
Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Reject Equal Means? ( $\alpha=0.05$ )	Power ( $\alpha=0.05$ )
Between	12	124.7888	10.39906	0.1157	0.99989	No	0.08589
Within (Error)	78	7011.217	89.88741				
Adjusted Total	90	7136.006					
Total	91						

**Descriptive Statistics**

Group	Count (ni)	Mean	Effect	Median	Standard Deviation	Standard Error $\sqrt{(MSE/ni)}$
All	91	4.844945	4.844945			
A:						
Apigenina	13	25.08308	20.23813	23.65	6.527416	0.7878978
Eriodictiol	13	0.3869231	-4.458022	0.05	0.7923634	0.7878978
Miricetina	13	1.886923	-2.958022	1.49	0.7937399	0.7878978
Aromadetrina	13	1.367692	-3.477253	1.5	0.3603969	0.7878978
Ampelopsiona	13	5.133077	0.2881319	4.07	3.530884	0.7878978
Luteolina	13	0.01076923	-4.834176	0	0.03882901	0.7878978
quercitina	13	0.04615385	-4.798791	0	0.1664101	0.7878978

**Tabla A.3.** Prueba ANOVA de los porcentajes de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos en medio superficial.

Analysis of Variance Table and F-Test							
Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Reject Equal Means? ( $\alpha=0.05$ )	Power ( $\alpha=0.05$ )
Between	1	6977.028	6977.028	19.0952	0.00021	Yes	0.98710
Within (Error)	24	8769.15	365.3813				
Adjusted Total	25	15746.18					
Total	26						

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

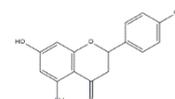
Response: SUPERFICIAL- % IN. ABTS, SUPERFICIAL - % IN. DPPH  
Term A:

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=365.3813 Critical Value=2.9269

Group	Count	Mean	Different From Groups
SUPERFICIAL- % IN. ABTS	13	75.20338	SUPERFICIAL - % IN. DPPH
SUPERFICIAL - % IN. DPPH	13	42.44077	SUPERFICIAL- % IN. ABTS

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.



**Tabla A.4.** Prueba ANOVA de los porcentajes de inhibición de radicales DPPH• y ABTS• en los extractos en medio líquido.

**Analysis of Variance Table and F-Test**

Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Reject Equal Means? ( $\alpha=0.05$ )	Power ( $\alpha=0.05$ )
Between	1	6198.542	6198.542	30.6275	0.00001	Yes	0.99958
Within (Error)	24	4857.237	202.3849				
Adjusted Total	25	11055.78					
Total	26						

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

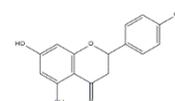
Response: LÍQUIDO-% IN.ABTS, LÍQUIDO-% IN.DPPH  
Term A:

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=202.3849 Critical Value=2.9269

Group	Count	Mean	Different From Groups
LÍQUIDO-% IN.ABTS	13	84.38846	LÍQUIDO-IN.DPPH
LÍQUIDO-% IN.DPPH	13	53.50769	LÍQUIDO-IN.ABTS

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.



## 10.4.Publicación

Bioprocess and Biosystems Engineering  
https://doi.org/10.1007/s00449-020-02316-6

RESEARCH PAPER



# Whole-cell bioconversion of naringenin to high added value hydroxylated compounds using *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface and liquid cultures

Christian Hernández-Guzmán<sup>1</sup> · Arely Prado-Barragán<sup>1</sup> · Miquel Gimeno<sup>2</sup> · Angélica Román-Guerrero<sup>1</sup> · Olga Miriam Rutiaga-Quíñones<sup>3</sup> · Nuria Elizabeth Rocha Guzmán<sup>3</sup> · Sergio Huerta-Ochoa<sup>1</sup>

Received: 16 September 2019 / Accepted: 20 February 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

The bioconversion process of bioactive naringenin by whole-cells of *Yarrowia lipolytica* 2.2ab for the production of increased value-added compounds is successfully achieved in surface and liquid cultures. This approach is an alternative to the commercial production of these bioactive compounds from vegetable sources, which are limited due to their low concentrations and the complexity of the purification processes. The experimentation rendered seven value-added compounds in both surface and liquid bioconversion cultures. Some of the compounds produced have not been previously reported as products from the bioconversion processes, such as the case of ampelopsin. Biosynthetic pathways were suggested for the naringenin bioconversion using whole-cells of *Y. lipolytica* 2.2ab. Finally, the extracts obtained from the naringenin bioconversion in liquid cultures showed higher percentage of inhibition of DPPH- and ABTS- radicals up to 32.88 and 2.08 times, respectively, compared to commercial naringenin.

**Keywords** Whole-cell bioconversion · Naringenin · Hydroxylation · Biosynthesis · *Yarrowia lipolytica* 2.2ab

### Introduction

Flavonoids, generated by the secondary metabolism of plants, are a diverse group among the polyphenols with increasing attention owing to their health beneficial effects in the dietary intake [1]. Flavonoids have a wide variety of pharmacological activities such as anti-inflammatory [2], antiviral [3], antiallergenic [4], vasodilator [5], which are mainly related to their high antioxidant capacities [6], besides providing protection against cardiovascular diseases and complementary treatment in several types of cancer [7]. The generic flavonoid's structure consists of three rings, two

phenyl rings A and B linked by a pyrone ring C, the structure of the latter classifies them into six different subclasses: flavones, flavonols, flavanones, catechins (flavanols), anthocyanidins and isoflavonoids [8]. The flavones include apigenin present in onion and parsley [9] with antioxidant and antitumor activity [10], and luteolin which is one of the coarsest compounds in medicinal and edible plants having antioxidant and anti-inflammatory activities [11]. On the other hand, the flavanols quercetin present in onions [9] and myricetin in blueberries have anti-inflammatory and antioxidant activities [12]. The flavanols are another important subgroup which includes the aromadendrin, present in beans and cabbage with antitumor and anti-inflammatory activity [12], and ampelopsin with antitumor, anti-inflammatory and antioxidant activities found in plants of the genus *Ampelopsis* and *Hovenia dulcis* [13–16]. Other important phytochemicals correspond to flavanones such as naringenin and eriodictyol present in a great variety of citric fruits and vegetables [17], being the lemon the most abundant source of the earliest, which has demonstrated to have a great variety of pharmacological and biological activities [18]. Naringenin is also found in grapes, grapefruits, tomatoes besides of citrics [11, 19, 20], mainly obtained from agricultural wastes [6].

✉ Sergio Huerta-Ochoa  
sho@xanum.uam.mx

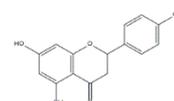
<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, P.A. 55-535, 09340 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Química-Bioquímica, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Mexico

Published online: 06 March 2020

Springer



This phytochemical is of particular interest owing to several pharmacological activities of interest such as antioxidant activity, anticancer, anti-inflammatory, vasodilator and also lowers the cholesterol levels [3, 8, 9, 17, 21]. Noteworthy, the antioxidant activity for flavonoids is associated to the hydroxyl moieties in the B ring [22], thereby the increase of the antioxidant activity in the flavonoids is directly proportional to the degree of hydroxylation [10, 11, 23]. Generally, all flavonoids are synthesized in plants from L-phenylalanine (L-Phe), that is converted to 4-coumaroyl-CoA which together with three molecules of malonyl-CoA are the basis for the formation of these metabolites [24]. The flavonoids are highly profitable for different industries such as pharmaceutical, nutraceutical and chemical, but the scale-up from plant extracts is challenging. Alternatively, the microbial bioconversion processes can offer the advantages of large-scale production [25, 26]. The bioconversion processes using biological systems allows chemical modifications [27], commonly by hydroxylation and/or methylation to attain novel compounds with attractive pharmacologically and biologically properties, so bioconversion constitutes a promising strategy towards biologically active compounds [13, 14]. Among these natural precursors, naringenin is investigated as a model molecule for bioconversion towards other flavonoids with enhanced biological activities [6]. In this regard, a large variety of bacteria, yeasts and fungi present the ability to hydroxylate highly hydrophobic compounds by the enzyme cytochrome P450 monooxygenase (CYP450) [28].

Biotechnologists are searching for alternative routes to increase flavonoid production in both whole-cell and cell-free environments, in the context of controlling the regioselectivity and stereoselectivity of the hydroxylation reaction [29]. The main types of microorganisms associated with the bioconversion of flavonoids are yeasts of the genus *Saccharomyces*, bacteria such as *E. coli* and fungi of the genus *Aspergillus*. These microorganisms biotransform flavonoids enzymatically via CYP450 enzymes which are responsible of hydroxylating, reducing or oxidizing to a specific substrate [30, 31]. Kasai et al. [21] report the use of CYP450 as a biocatalyst in recombinant cells of *Saccharomyces cerevisiae* for the bioconversion of naringenin to eriodictyol. Whole-cells of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Rhodotorula marina* in the bioconversion of naringenin to 6-hydroxynaringenin (Carthamidine) and 8-hydroxynaringenin (Isocarthamidine) are also reported [6, 19, 32]. Interestingly, *Y. lipolytica* has the ability to express the CYP450 enzymatic systems and 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases (2-ODG), a biosynthetic machinery to achieve hydroxylation of hydrophobic compounds such as naringenin [33]. Palmerín-Carreño et al. [34] used whole-cells of *Yarrowia lipolytica* 2.2ab as biocatalyst for the bioconversion of sesquiterpenes in surface culture obtaining oxidized compounds. Therefore, the present work aims to evaluate the

bioconversion process of naringenin by *Y. lipolytica* 2.2ab whole-cells at different concentrations in surface and liquid cultures for the production of high value-added compounds.

## Materials and methods

### Microorganism

*Yarrowia lipolytica* 2.2ab strain belongs to the Microorganism Collection of the Solid-State Fermentation Pilot Plant of the Biotechnology Department of the Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa, Mexico. The strain was propagated in Erlenmeyer flasks with Potato Dextrose Agar medium (PDA) and incubated for 7 days at 30 °C.

### Chemicals

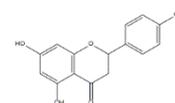
Naringenin (CAS 67604-48-2), eriodictyol (CAS 552-58-9), apigenin (CAS 520-36-5), quercetin (CAS 6151-25-3), luteolin (CAS 491-70-3), myricetin (CAS 529-44-2), aromadendrin (CAS 480-20-6) and ampelopsin (CAS 27200-12-0), free radicals DPPH· (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS· were purchased from Sigma-Aldrich. Ethyl acetate, methanol and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker. Potato Dextrose Agar Medium (PDA) and Sabouraud Dextrose Broth (SDB) were supplied by Bioxon. Distilled water was used for all experiments.

### Whole-cell bioconversion using surface cultures

Bioconversion experiments in surface cultures were performed in 25 mL serological flasks with 5 mL of PDA culture medium with an inoculum of  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> of *Y. lipolytica* 2.2ab. Flasks were incubated for 7 days at 30 °C to obtain the cell dry weight of ca. 2.7 g L<sup>-1</sup>. Once the incubation days for the bioconversion had elapsed, 20 mL of a naringenin solution, previously dissolved in ethanol, were added covering the surface growth of the strain. Thirteen concentrations of naringenin, 100, 150, 200, 300, 450, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 4500 and 6000 mg L<sup>-1</sup> were tested. For the bioconversion process, the cultures were incubated for 8 days at 30 °C. Control was naringenin in the sterile medium without microorganism. Each experiment was performed in duplicate.

### Whole-cell bioconversion using liquid cultures

Bioconversion experiments in liquid culture performed in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of broth SDB medium were used in with an inoculum of  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> of *Y. lipolytica* 2.2ab. Shaken flasks were incubated at 150 rpm for 2 days at 30 °C to obtain the cell dry weight



of ca. 7 g L<sup>-1</sup>. After the cell growth process, a naringenin solution, previously dissolved in ethanol, was added to initiate the bioconversion. Thirteen initial concentrations of naringenin, 100, 150, 200, 300, 450, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000, 4500 and 6000 mg L<sup>-1</sup> were tested. Cultures were incubated for 8 days at 30 °C. Control was naringenin in a sterile medium without microorganism. Each experiment was performed in duplicate.

### Sample preparation

Samples of 5 mL from the supernatant of reaction media were obtained after 192 h of bioconversion from both surface and liquid cultures. Samples were filtered, thus separating the supernatant from the cells in both cultures and acidified at pH 4 with 2 M HCl and extracted three times with ethyl acetate in a 1:1 ratio, vortexed and settled to phase separation. 20 µL of the upper phase (ethyl acetate) were injected to the chromatographer.

### Product analysis by high-resolution liquid chromatography (HPLC)

Concentration of residual naringenin and the presence of products formed during the bioconversion were determined in an Agilent (1100) high-performance liquid chromatographer equipped with a diode array detector (UV-VIS) at wavelength 290 nm and a quaternary pump. A reverse-phase column C-18 (ZORBAX Eclipse 5 µm, 250 mm × 4.6 mm) was used with acetonitrile (phase A) and 0.1% acetic acid (phase B) mobile phase at 0.8 mL min<sup>-1</sup> flow rate. Injection volume was 20 µL at 30 °C in a gradient elution Phase A linear gradient from 25 to 38% for 10 min, isocratic elution of phase A of 38% for 18 min, linear gradient of phase A from 38 to 25% for 2 min and an isocratic elution of phase A of 25% for 6 min [6]. Commercial standards of naringenin, luteolin, apigenin, quercetin, taxifolin, eriodictyol, myricetin, aromadendrine and ampelopsin were used for identification according to their characteristic retention times. Once the products were quantified, the total yield of bioconversion of flavonoids was determined, which was determined by the milligrams of total products per milligram of naringenin consumed.

### Product analysis by ultra-high-resolution liquid chromatography coupled to masses (UPLC/MS)

An Acquity UPLC® ultra-high-resolution liquid chromatograph (Waters, USA) coupled to masses (UPLC/MS) was used using a negative ionization module (ESI-). The column used was a reverse phase, Acquity UPLC® BEH C18 (2.1 × 150 × 1.7 µm) (Waters) which was maintained at 30 °C, at a voltage between 30–99.93 V with an injection

volume of 10 µL. The mobile phase used was acidified water 1% (water/formic acid 7.5 mM) (Phase A) and acetonitrile (mass degree) (Phase B) at a flow rate of 0.210 mL min<sup>-1</sup>, a temperature of the source of 150 °C, a solvation temperature of 450 °C, the nitrogen flow was 796 L h<sup>-1</sup> and a cone gas flow of 151 L h<sup>-1</sup>. As a cosolvent, methanol with 0.1% v/v formic acid was used. The total time of the run was 20 min and a gradient elution Phase A linear gradient from 97 to 91% for 1.88 min, 91 to 84% for 3.78 min, 84 to 50% for 11.24 min, 50 to 97% for 2.72 min and an isocratic elution of solvent A of 97% for 0.4 min. The quantification of flavonoids was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode in MS/MS. This was carried out through the set of ions to detect the transitions of the parent ions to the ions of products of the compounds: naringenin 272 > 119 Da, apigenin 270 > 117 Da, luteolin 286 > 131 Da, eriodictyol 287 > 135, aromadendrin 288 > 125 Da, quercetin 302 > 151 Da, ampelopsin 320 > 153 Da and myricetin 318 > 151 Da.

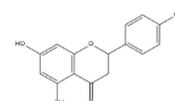
### Antioxidant activity

Antioxidant activity was measured by the DPPH· and ABTS-free radical scavenging methods. For DPPH· followed the method proposed by Brand-Williams et al. [35] with certain modifications. A solution of DPPH· in methanol (25 mg L<sup>-1</sup>) was prepared. 3.9 mL of the methanol solution was taken and 0.1 mL of the extract mixture was added to different initial concentrations of naringenin. Then, mixed vigorously and allowed to incubate for 30 min in the dark at room temperature. Absorbance was measured at 517 nm with a UV-Visible spectrophotometer (SHIMADZU). The percent inhibition of the DPPH· radical for the extract mixtures was evaluated as follows:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_0 - A_{30}}{A_0} \times 100$$

where  $A_0$  is the absorbance of the DPPH· radical at time zero and  $A_{30}$  is the absorbance of the DPPH· radical after thirty minutes of incubation.

Using the technique proposed by Kim et al. [36] with some modifications, the ABTS· radical elimination test was conducted with a solution of ABTS· 7 mM and another of 2.45 mM potassium persulfate. These solutions were mixed in equal parts and kept in the dark at room temperature for 12 to 16 h for the formation of the ABTS· radical. After 12 to 16 h, the ABTS· solution is diluted in ethanol to obtain an absorbance of 0.8 (±0.02) at 734 nm. For sample analysis, 100 µL of the extract mixture was taken at different initial naringenin concentrations and 1.9 mL of the ABTS· radical solution was added. Measurements were made in triplicate and a naringenin solution of 100 mg L<sup>-1</sup> was used as control.



**Table 1** Products concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )						Y <sub>res</sub>
	Apigenin	Eriodictyol	Myricetin	Aromadendrin	Ampelopsin	Residual naringenin	
100	2.97 ± 0.09	0.00 ± 0.00	1.27 ± 0.00	1.49 ± 0.00	2.10 ± 0.01	0.90 ± 0.07	0.079
150	3.80 ± 0.85	0.00 ± 0.00	4.23 ± 0.17	0.58 ± 0.00	2.28 ± 0.22	1.30 ± 0.45	0.074
200	2.33 ± 0.18	0.00 ± 0.00	4.13 ± 0.64	0.55 ± 0.05	1.60 ± 0.36	0.71 ± 0.11	0.032
300	2.89 ± 0.11	0.05 ± 0.00	5.03 ± 1.10	1.51 ± 0.04	1.19 ± 0.90	0.86 ± 0.05	0.028
450	2.86 ± 0.07	0.05 ± 0.00	4.00 ± 0.09	1.60 ± 0.23	1.15 ± 0.11	0.82 ± 0.00	0.016
600	3.00 ± 0.16	0.00 ± 0.00	4.18 ± 0.19	1.46 ± 0.00	1.10 ± 0.09	0.82 ± 0.00	0.012
800	10.40 ± 4.40	0.00 ± 0.00	3.90 ± 0.70	1.48 ± 0.10	1.28 ± 0.25	5.33 ± 2.19	0.009
1000	3.04 ± 0.04	0.04 ± 0.00	4.36 ± 0.11	1.46 ± 0.00	1.09 ± 0.08	0.83 ± 0.02	0.007
1500	3.03 ± 0.22	0.14 ± 0.00	4.38 ± 0.13	1.47 ± 0.00	2.10 ± 0.22	0.89 ± 0.09	0.006
2000	2.41 ± 0.16	0.14 ± 0.00	4.30 ± 0.19	1.45 ± 0.00	1.28 ± 0.29	0.82 ± 0.00	0.004
3000	3.13 ± 0.36	0.00 ± 0.00	4.31 ± 0.12	1.46 ± 0.00	1.45 ± 0.25	1.02 ± 0.01	0.003
4500	3.46 ± 0.44	0.00 ± 0.00	1.54 ± 0.03	1.49 ± 0.03	1.30 ± 0.23	0.99 ± 0.13	0.001
6000	4.50 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.44 ± 0.07	1.41 ± 0.06	1.40 ± 0.32	0.001

**Table 2** Luteolin and quercetin concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface and liquid culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Culture	Flavonoid produced (mg L <sup>-1</sup> )	
		Luteolin	Quercetin
100	Liquid	0.14 ± 0.00	0.60 ± 0.00
300	Surface	0.45 ± 0.00	-

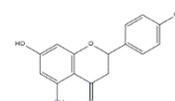
with a yield ( $Y_{ps}$ ) of 0.319, which was the highest. It is also observed that the residual naringenin is higher in liquid than in surface media, this might be due to the absorption of the precursor in the latter. To clarify this, experiments using

100 mg L<sup>-1</sup> of initial naringenin concentration and biomass previously inactivated by sterilization displayed a 99.84% recovery of the added naringenin for liquid culture, while that for the surface culture was 79.17%.

In liquid medium using 100 mg L<sup>-1</sup> of naringenin, the amount of bioactive flavonoids produced was 26.43 mg, thus obtaining 0.2646 mg of product per mg of naringenin while in surface medium with 300 mg L<sup>-1</sup> of naringenin, rendered 11.33 mg L<sup>-1</sup> of bioactive flavonoids, which represents 0.0377 mg of product per mg of naringenin. In a related study, Pérez-Nájera et al. [38] extracted flavonoids from a part of lime peels, obtaining 0.0143 mg of flavonoids (excreted in quercetin) per mg of dry matter. These authors claimed that this amount is high as the flavonoids

**Table 3** Products concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in liquid culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )						Y <sub>res</sub>
	Apigenin	Eriodictyol	Myricetin	Aromadendrin	Ampelopsin	Residual naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	
100	21.68 ± 0.00	0.29 ± 0.02	1.48 ± 0.03	0.61 ± 0.16	1.45 ± 0.15	17.03 ± 5.40	0.319
150	23.65 ± 12.28	2.17 ± 0.04	1.40 ± 0.03	1.48 ± 0.00	1.70 ± 0.25	11.37 ± 0.63	0.225
200	15.38 ± 4.45	2.16 ± 0.00	3.14 ± 0.05	0.52 ± 0.00	1.69 ± 0.24	9.95 ± 2.33	0.122
300	25.06 ± 3.67	0.06 ± 0.00	3.50 ± 0.07	1.61 ± 0.12	2.47 ± 0.15	17.20 ± 4.10	0.119
450	20.65 ± 5.07	0.04 ± 0.00	3.170 ± 0.09	1.50 ± 0.01	3.60 ± 0.90	15.34 ± 2.94	0.068
600	21.89 ± 4.23	0.00 ± 0.00	1.53 ± 0.03	1.47 ± 0.03	2.85 ± 0.38	13.77 ± 1.11	0.048
800	33.80 ± 6.02	0.05 ± 0.00	1.45 ± 0.11	1.53 ± 0.09	4.63 ± 0.36	22.49 ± 4.87	0.053
1000	28.76 ± 3.05	0.07 ± 0.00	1.46 ± 0.01	1.47 ± 0.02	4.07 ± 0.68	18.13 ± 1.67	0.037
1500	24.21 ± 5.79	0.05 ± 0.00	1.44 ± 0.00	1.50 ± 0.06	5.89 ± 0.05	16.22 ± 2.44	0.022
2000	19.74 ± 3.83	0.04 ± 0.00	1.42 ± 0.01	1.46 ± 0.00	6.47 ± 0.376	12.64 ± 3.71	0.015
3000	20.18 ± 0.91	0.05 ± 0.00	1.50 ± 0.05	1.50 ± 0.07	9.21 ± 1.52	13.20 ± 0.70	0.011
4500	33.08 ± 8.76	0.05 ± 0.00	1.55 ± 0.05	1.63 ± 0.02	11.15 ± 0.70	13.85 ± 2.71	0.011
6000	38.00 ± 4.95	0.00 ± 0.00	1.49 ± 0.12	1.50 ± 0.05	11.55 ± 0.86	21.96 ± 4.40	0.009



The percentage inhibition of the ABTS $\cdot$  radical was calculated as for the DPPH $\cdot$  radical.

### Total flavonoids

Extract sample of 0.5 mL was placed in a 10 mL flask and 0.3 mL of NaNO<sub>2</sub> was added and mixed. After 5 min, 0.6 mL of 10% w/v AlCl<sub>3</sub> was added and left at room temperature, for 6 min. Finally, 2 mL of 1 M NaOH was added and hardened with distilled water. The absorbance was determined at 510 nm (UV-Visible spectrophotometer) and total flavonoids contents were calculated using a standard curve of naringenin [37].

### Statistical analysis

With the data obtained from the antioxidant activity a multifactor analysis was carried out using the statistical package NCSS 2007, an ANOVA and the Tuckey test with  $\alpha$  of 0.05 were applied to observe significant differences.

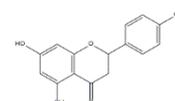
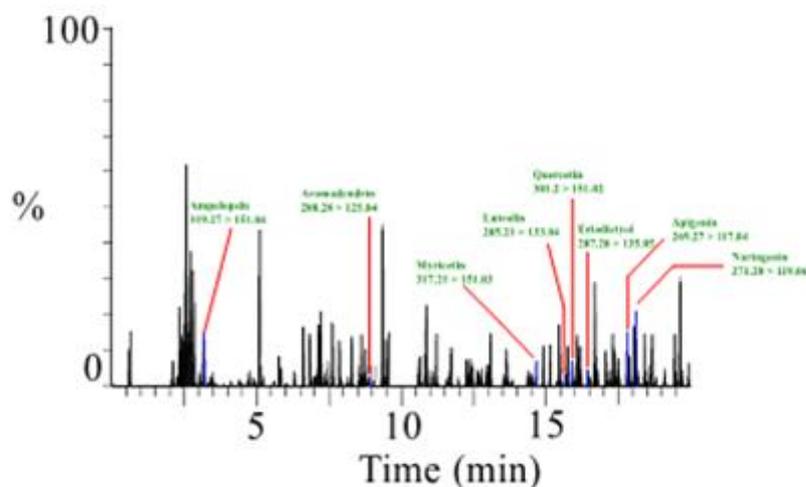
### Results and discussion

The initial naringenin concentrations varied from 100 to 6000 mg L<sup>-1</sup> in both type of cultures to the production of flavonoids by whole-cells of *Y. lipolytica* 2.2ab. The experimental evidences indicate that flavonoids production behavior is different among cultures. For instance, in the surface culture displayed six different compounds, while seven for the liquid culture, these compounds were identified by UPLC-MS chromatography in multiple reaction monitoring (MRM) in MS/MS mode. Fig. 1 presents UPLC-MS/MS analyses of flavonoids obtained by *Y. lipolytica* 2.2ab

in liquid culture. The compounds were luteolin, apigenin (flavones); myricetin, quercetin (flavanols), eriodictiyl (flavanone), aromadendrine and ampelopsin (flavanonols) as shown in Table 1, 2, and 3 and Figs. 2 and 3, for surface and liquid cultures, respectively. The biotransformation reactions of flavonoids by *Y. lipolytica* 2.2ab include dehydrogenation and hydroxylation reactions as the main modifications to the native naringenin molecule. The microbial transformation of the flavonoids is widely reported by several mechanisms among which stand out the formation of carbon-carbon bonds, methylation and hydroxylation [7]. Regarding the flavonoids biosynthesized in this work by whole cells of *Y. lipolytica* 2.2ab of naringenin, the ampelopsin has not been previously reported as a product of this bioconversion. In related works, very few flavonoids are described as products by bioconversion using recombinant microbial cells in liquid medium, among them the apigenin, luteolin, eriodictiyl, aromadendrin and recently, quercetin and myricetin.[12, 18, 22, 26, 27]. Noteworthy, among the thirteen concentrations studied in this work, the lowest concentrations of 100 in liquid and 300 mg L<sup>-1</sup> in surface medium presented the most identified and quantified molecules. The bioconversion yield of all identified flavonoids (mg of identified products per mg of consumed naringenin) could not be related to the initial naringenin concentration; when the naringenin concentration increases, the syntheses of the identified compounds decreases, while the formation of other non-identified compounds increases in a non-proportional relationship. For example, a compound with a molecular weight of 475 g mol<sup>-1</sup> was detected (UPLC-MS/MS), but this new compound could not be matched with the library of the computer software.

It is worth to note that only at 100 mg L<sup>-1</sup> of naringenin feed in liquid culture all identified products were present

**Fig. 1** UPLC-ESI-MS/MS analyses of flavonoids obtained by *Y. lipolytica* 2.2ab in liquid culture



**Table 1** Products concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )						Y <sub>res</sub>
	Apigenin	Eriodictyol	Myricetin	Aromadendrin	Ampelopsin	Residual naringenin	
100	2.97 ± 0.09	0.00 ± 0.00	1.27 ± 0.00	1.49 ± 0.00	2.10 ± 0.01	0.90 ± 0.07	0.079
150	3.80 ± 0.85	0.00 ± 0.00	4.23 ± 0.17	0.58 ± 0.00	2.28 ± 0.22	1.30 ± 0.45	0.074
200	2.33 ± 0.18	0.00 ± 0.00	4.13 ± 0.64	0.55 ± 0.05	1.60 ± 0.36	0.71 ± 0.11	0.032
300	2.89 ± 0.11	0.05 ± 0.00	5.03 ± 1.10	1.51 ± 0.04	1.19 ± 0.90	0.86 ± 0.05	0.028
450	2.86 ± 0.07	0.05 ± 0.00	4.00 ± 0.09	1.60 ± 0.23	1.15 ± 0.11	0.82 ± 0.00	0.016
600	3.00 ± 0.16	0.00 ± 0.00	4.18 ± 0.19	1.46 ± 0.00	1.10 ± 0.09	0.82 ± 0.00	0.012
800	10.40 ± 4.40	0.00 ± 0.00	3.90 ± 0.70	1.48 ± 0.10	1.28 ± 0.25	5.33 ± 2.19	0.009
1000	3.04 ± 0.04	0.04 ± 0.00	4.36 ± 0.11	1.46 ± 0.00	1.09 ± 0.08	0.83 ± 0.02	0.007
1500	3.03 ± 0.22	0.14 ± 0.00	4.38 ± 0.13	1.47 ± 0.00	2.10 ± 0.22	0.89 ± 0.09	0.006
2000	2.41 ± 0.16	0.14 ± 0.00	4.30 ± 0.19	1.45 ± 0.00	1.28 ± 0.29	0.82 ± 0.00	0.004
3000	3.13 ± 0.36	0.00 ± 0.00	4.31 ± 0.12	1.46 ± 0.00	1.45 ± 0.25	1.02 ± 0.01	0.003
4500	3.46 ± 0.44	0.00 ± 0.00	1.54 ± 0.03	1.49 ± 0.03	1.30 ± 0.23	0.99 ± 0.13	0.001
6000	4.50 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.44 ± 0.07	1.41 ± 0.06	1.40 ± 0.32	0.001

**Table 2** Luteolin and quercetin concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface and liquid culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Culture	Flavonoid produced (mg L <sup>-1</sup> )	
		Luteolin	Quercetin
		100	Liquid
300	Surface	0.45 ± 0.00	-

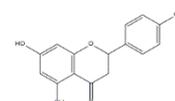
with a yield ( $Y_{ps}$ ) of 0.319, which was the highest. It is also observed that the residual naringenin is higher in liquid than in surface media, this might be due to the absorption of the precursor in the latter. To clarify this, experiments using

100 mg L<sup>-1</sup> of initial naringenin concentration and biomass previously inactivated by sterilization displayed a 99.84% recovery of the added naringenin for liquid culture, while that for the surface culture was 79.17%.

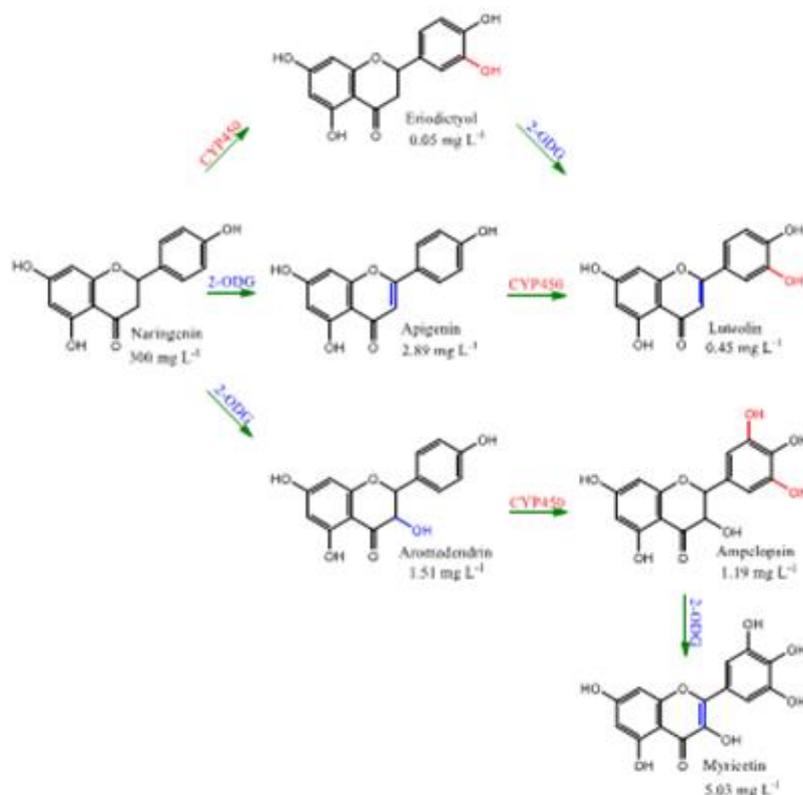
In liquid medium using 100 mg L<sup>-1</sup> of naringenin, the amount of bioactive flavonoids produced was 26.43 mg, thus obtaining 0.2646 mg of product per mg of naringenin while in surface medium with 300 mg L<sup>-1</sup> of naringenin, rendered 11.33 mg L<sup>-1</sup> of bioactive flavonoids, which represents 0.0377 mg of product per mg of naringenin. In a related study, Pérez-Nájera et al. [38] extracted flavonoids from a part of lime peels, obtaining 0.0143 mg of flavonoids (excreted in quercetin) per mg of dry matter. These authors claimed that this amount is high as the flavonoids

**Table 3** Products concentration of the naringenin bioconversion by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in liquid culture

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )						Y <sub>res</sub>
	Apigenin	Eriodictyol	Myricetin	Aromadendrin	Ampelopsin	Residual naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	
100	21.68 ± 0.00	0.29 ± 0.02	1.48 ± 0.03	0.61 ± 0.16	1.45 ± 0.15	17.03 ± 5.40	0.319
150	23.65 ± 12.28	2.17 ± 0.04	1.40 ± 0.03	1.48 ± 0.00	1.70 ± 0.25	11.37 ± 0.63	0.225
200	15.38 ± 4.45	2.16 ± 0.00	3.14 ± 0.05	0.52 ± 0.00	1.69 ± 0.24	9.95 ± 2.33	0.122
300	25.06 ± 3.67	0.06 ± 0.00	3.50 ± 0.07	1.61 ± 0.12	2.47 ± 0.15	17.20 ± 4.10	0.119
450	20.65 ± 5.07	0.04 ± 0.00	3.170 ± 0.09	1.50 ± 0.01	3.60 ± 0.90	15.34 ± 2.94	0.068
600	21.89 ± 4.23	0.00 ± 0.00	1.53 ± 0.03	1.47 ± 0.03	2.85 ± 0.38	13.77 ± 1.11	0.048
800	33.80 ± 6.02	0.05 ± 0.00	1.45 ± 0.11	1.53 ± 0.09	4.63 ± 0.36	22.49 ± 4.87	0.053
1000	28.76 ± 3.05	0.07 ± 0.00	1.46 ± 0.01	1.47 ± 0.02	4.07 ± 0.68	18.13 ± 1.67	0.037
1500	24.21 ± 5.79	0.05 ± 0.00	1.44 ± 0.00	1.50 ± 0.06	5.89 ± 0.05	16.22 ± 2.44	0.022
2000	19.74 ± 3.83	0.04 ± 0.00	1.42 ± 0.01	1.46 ± 0.00	6.47 ± 0.376	12.64 ± 3.71	0.015
3000	20.18 ± 0.91	0.05 ± 0.00	1.50 ± 0.05	1.50 ± 0.07	9.21 ± 1.52	13.20 ± 0.70	0.011
4500	33.08 ± 8.76	0.05 ± 0.00	1.55 ± 0.05	1.63 ± 0.02	11.15 ± 0.70	13.85 ± 2.71	0.011
6000	38.00 ± 4.95	0.00 ± 0.00	1.49 ± 0.12	1.50 ± 0.05	11.55 ± 0.86	21.96 ± 4.40	0.009



**Fig. 2** Suggested flavonoid biosynthetic pathway by *Y. lipolytica* 2.2ab in surface culture. Four enzymes are responsible for the bioconversion of naringenin by *Y. lipolytica* 2.2ab, CYP450 (cytochrome P450 monooxygenase) and 2-ODG (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase)

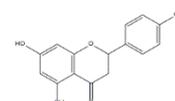


are present mainly in the shell and bagasse. On the other hand, Fajardo-Romero et al. [39] quantified flavonoids from the outer cover of the red onion, obtaining 0.0046 mg of flavonoids (excreted in quercetin) per mg of dry matter. In both cases, total flavonoids were quantified (glycosylated inactive and deglycosylated). This study, however, obtains higher production of flavonoids than the earlier reports for both media. In the liquid medium increased up to 52 times and 2.63 times in surface medium. The present work demonstrates that bioconversion can overcome the restrictions of extractions from vegetal sources of these compounds, and moreover [25, 26], the flavonoids are free from glycosylation and complexation with other phenolic compounds [12].

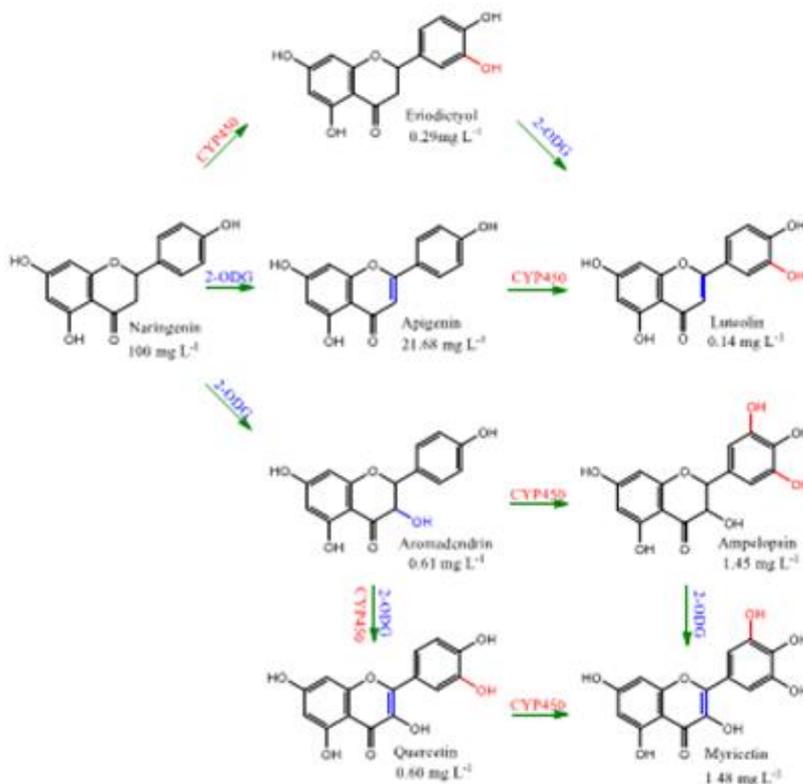
### Production of apigenin

This flavone is produced due to the oxidative reaction catalyzed by a dioxygenase dependent on 2-oxoglutarate with flavone synthase (FNS) activity on the precursor naringenin causing the formation of a carbon–carbon bond [40]. It is interesting to note that the formation rates of apigenin biosynthesized by *Y. lipolytica* 2.2ab were  $2.89 \pm 0.11$  mg L<sup>-1</sup> and  $21.68 \pm 0.00$  mg L<sup>-1</sup> in surface and liquid media,

respectively. This is relevant considering the chemo preventive, anti-inflammatory and antioxidant activities associated to this metabolite [10]. In a related work, Park et al. [41] carried out the bioconversion from 136 mg L<sup>-1</sup> of naringenin to apigenin with recombinant *Streptomyces venezuelae* obtaining 1.5 mg L<sup>-1</sup> of this flavone, the authors increased the production of apigenin to 15.3 mg L<sup>-1</sup> using this recombinant cells of *S. venezuelae* supplemented with 1.2 mM 4-coumaric acid and 2 g L<sup>-1</sup> sodium molonate by the introduction of *matB* and *matC* encoding for malonyl-CoA synthetase, which oxidizes the precursor forming a double bond between the carbons 2 and 3 [42]. Recently, Marín et al. [40] reported the production of apigenin and naringenin by *Streptomyces albus* cells genetically modified using as casamino acids precursor, the concentrations of apigenin and naringenin were 0.08 mg L<sup>-1</sup> and 0.014 mg L<sup>-1</sup>, respectively. These authors increased the production of apigenin by adding naringenin at a concentration of 0.1 mM (27.23 mg L<sup>-1</sup>), thus obtaining 0.384 mg L<sup>-1</sup> of apigenin. Noteworthy, the obtained of apigenin in liquid medium in this study as well as in surface medium for some experiments were higher compared to that reports. Figure 2 shows the possible pathway during flavonoids production by in surface culture obtained from



**Fig. 3** Suggested flavonoid biosynthetic pathway by *Y. lipolytica* 2.2ab in liquid culture. Four enzymes are responsible for the bioconversion of naringenin by *Y. lipolytica* 2.2ab, CYP450 (cytochrome P450 monooxygenase) and 2-ODG (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase)



an initial naringenin concentration of 300 mg L<sup>-1</sup> indicating which enzymes might play a significant role. Naringenin is a substrate of the enzyme oxidoreductase 2-ODG with FNS activity towards apigenin by the formation of a double bond between carbon 3 and 4 of naringenin. The action of this oxidoreductase enzyme with FNS activity is good in *Y. lipolytica* 2.2ab because higher amount of apigenin is detected than that for its precursor in both media.

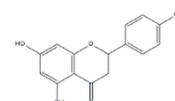
### Production of eriodictyol

This molecule belongs to the group of flavanones as the hydroxylated form of the naringenin biocatalyzed by CYP450 with F3'H activity which hydroxylate the carbon 3' of the precursor. The production of eriodictyol was 0.05 ± 0.00 mg L<sup>-1</sup> and 0.29 ± 0.02 mg L<sup>-1</sup> in surface and liquid medium, respectively. Previous reports indicate that the recombinant cells of *Saccharomyces cerevisiae* promoted the bioconversion of naringenin to eriodictyol by the CYP450 enzyme complex [21, 43, 44]. The production of eriodictyol in this work is slightly higher than that reported in other publications, for example, it was reported to be 0.002 mg L<sup>-1</sup> using recombinant cells of *S. albus* as

a biocatalyst [40]. In a related work by Chu et al., whole-cell of *Bacillus megaterium* resulted in 13.53 mg L<sup>-1</sup> of eriodictyol [30]. However, despite a stable cell growth rate above 100 μM (27.23 mg L<sup>-1</sup>) of naringenin, the conversion decreased, which was attributed to an inhibition of the hydroxylation reaction. Palmerín-Carreño et al. [34] also observed substrate and product inhibition of *Y. lipolytica* 2.2ab during the bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. Interestingly, the production of eriodictyol has not been previously reported by *Y. lipolytica* in surface medium, notwithstanding the low concentration in the present work. In liquid culture, the experimental evidence suggests that FNS activity is more efficient than that for F3'H owing to the higher concentration of apigenin than eriodictyol.

### Production of luteolin

The formation rates of luteolin biosynthesized by *Y. lipolytica* 2.2ab were 0.45 mg L<sup>-1</sup> and 0.14 mg L<sup>-1</sup> in surface and liquid medium, respectively (Table 2). This flavone was only detected in the bioconversion by *Y. lipolytica* 2.2ab at an initial concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> in liquid medium and 300 mg L<sup>-1</sup> in the surface medium. Marín et al. [40]



reported a production of  $0.09 \text{ mg L}^{-1}$  of luteolin by genetically modified *S. albus* cells, suggesting that this flavone is formed from apigenin as substrate of CYP450 with F3'H activity that catalyzes the hydroxylation reaction at the 3' carbon towards luteolin [40]. Figure 3 depicts the suggested biosynthetic pathway for flavonoids production by *Y. lipolytica* 2.2ab in liquid culture using  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of initial naringenin. Luteolin could be produced as a precursor to apigenin and by the action of the enzyme CYP450 with F3'H activity, additionally, it might also be produced from eriodictyol precursor and by the activity of the FNS enzyme.

### Production of aromadendrin

From the identified compounds in both types of cultures, there are three possible direct products from naringenin; two of them hydroxylated, the aromadendrin and eriodictyol and the dehydrogenated apigenin. For the earliest, naringenin serves a substrate of the F3H activity of 2-ODG hydroxylating carbon 3 to obtain aromadendrin. The aromadendrin, also called dihydrokaempferol, is a 3-hydroxyflavone present in citrus fruits displaying increased antioxidant activity as the degree of hydroxylation of flavonoids increases [23]. The formation rates of aromadendrin biosynthesized by *Y. lipolytica* 2.2ab were  $1.51 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$  and  $0.61 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$  in surface and liquid medium, respectively. In a related work, Amor et al. [31] used a recombinant *E. coli* strain expressing plant flavonoid hydroxylation gene to obtain  $35 \text{ mg L}^{-1}$  of aromadendrin from  $50 \text{ mg L}^{-1}$  of naringenin in a single flavonoid hydroxylation step. The production of this flavonol by recombinant cells of *S. albus* and *S. coelicolor* was also reported, obtaining below  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$  and  $0.028 \pm 0.003 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively [12]. Noteworthy, this study is first to report the production of aromadendrin in surface medium and by *Y. lipolytica*.

### Production of quercetin

This flavanol was detected at a concentration of  $0.60 \text{ mg L}^{-1}$ . Noteworthy, the formation of quercetin was only quantified at  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of naringenin in liquid medium (Table 2) [45]. This metabolite can be obtained from the aromadendrine by the F3'H activity of CYP450 and subsequently by the FLS1 activity of the 2-ODG, hydroxylating in ring B and forming a double bond in ring C. Cells genetically modified from *E. coli* produced quercetin ( $0.18 \text{ mg L}^{-1}$ ) from naringenin [46]. In another work, Trantas et al. [47] carried out the bioconversion of  $136 \text{ mg L}^{-1}$  of naringenin obtaining  $0.38 \text{ mg L}^{-1}$  of quercetin by recombinant cells of *S. cerevisiae*. Recently, the production of quercetin by genetically modified cells of *S. albus* and *S. coelicolor* gave  $0.102 \pm 0.008 \text{ mg L}^{-1}$  and  $0.030 \pm 0.002 \text{ mg L}^{-1}$  of this flavanol, respectively [12]. In the present work, the quercetin production by *Y. lipolytica*

2.2ab was slightly higher compared to these genetically modified cells.

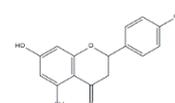
### Production of ampelopsin

The formation rates of ampelopsin, also named ampeloptin or dihydromyricetin, biosynthesized by *Y. lipolytica* 2.2ab were  $1.19 \pm 0.90 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1.45 \pm 0.15 \text{ mg L}^{-1}$  in surface and liquid medium, respectively. Noteworthy, the production of ampelopsin by whole-cells has not been previously reported and generally, this flavanonol is obtained by purified extracts from plants such as *Hovenia dulcis*, *Ampelopsis megalophylla*, *Ampelopsis cantoniensis*, *Ampelopsis chafanjoni*, *Ampelopsis sinica*, *Ampelopsis brevipedunculata*, *Ampelopsis radix* and *Ampelopsis grossedentata* [13–16]. This compound can be obtained by the activity F3'5'H of CYP450 using aromadendrin as a precursor. According to the literature, ampelopsin has not been reported as a product of the bioconversion process with whole-cells.

### Production of myricetin

The ampelopsin is precursor of the final product myricetin, which is a common plant-derived flavonoid exhibiting a wide range of activities that include strong antioxidant, anticancer, antidiabetic and anti-inflammatory [48] by the FLS1 activity of the enzyme 2-ODG. The myricetin can also be formed by taking quercetin as a precursor throughout the activity of CYP450 with F3'5'H thus forming the double bond in the ring C. According to our proposed route, myricetin is the final compound of the biosynthetic path; thereby an effect of the type of culture is highlighted to obtain the different compounds. The formation rates of myricetin biosynthesized by *Y. lipolytica* 2.2ab were  $5.03 \pm 1.10 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1.48 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$  in surface and liquid media, respectively. Another related study indicated that the recombinant *E. coli* cells carried out the bioconversion of naringenin and eriodictyol obtaining  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  of myricetin [46]. Additionally, the genetically modified cells of *S. albus* and *S. coelicolor* carried out the bioconversion of naringenin ( $86.69 \text{ mg L}^{-1}$ ) to myricetin obtaining  $0.04 \pm 0.006 \text{ mg L}^{-1}$  and below  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively [12]. Again, the production of myricetin by *Y. lipolytica* 2.2ab in this study is higher compared to the genetically modified cells.

This biosynthetic pathway to produce these metabolites from naringenin by *Y. lipolytica* 2.2ab coincides with the pathways that occur in plants [24]. Therein, the CYP450 complex and the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase contains the enzymatic system responsible for the synthesis of flavonoids [49, 50]. The biosynthetic pathways for *Y. lipolytica* 2.2ab are proposed using the molecular structure of the flavonoids obtained and bibliographic data [24] of possible enzymes involved in dehydrogenation and hydroxylation



reactions. In addition to the flavonoid hydroxylases, there are flavone synthase and the flavanol synthase reported in plants, some *Y. lipolytica* strains display interesting activities for monooxygenases and dioxygenases with important industrial applications [51]. It is worth to note that there are no reports regarding the production of flavonoids and the bioconversion of naringenin by *Y. lipolytica* using surface and liquid cultures. This work also renders a high production of apigenin than of eriodictyol and aromadendrine, suggesting that the 2-ODG enzyme with FNS activity is more efficient than the CYP450 with F3'H and F3'5'H activity in liquid culture. This agrees to Marín et al. [40] where enzyme F3'H in *S. albus* did not completely convert the naringenin to eriodictyol and apigenin in luteolin, thereby confirming that the FNS enzyme is more efficient than the F3'H owing to the higher concentration of apigenin than eriodictyol.

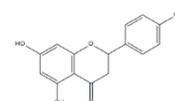
### Antioxidant activity

Table 4 shows the antioxidant activity measurements as inhibition percentages of synthetic radical DPPH· and ABTS· of the extracts obtained in both types of culture. Extracts displayed higher antioxidant activity than the corresponding naringenin solution used as control. Some percentages of inhibition are similar to that for ascorbic acid (vitamin C) [43, 44] presenting 92.8% inhibition percentage of the radical DPPH using 2500 mg L<sup>-1</sup> [52]. The antioxidant activity obtained in this study using 100 mg L<sup>-1</sup> of naringenin in liquid medium was 77.38% and 40.12% of inhibition of radicals ABTS· and DPPH·, respectively. These results are similar to those reported by Pérez-Nájera et al. [38] for extracted

phenolic compounds from lime peels. In another interesting work, Habtemariam [53] carried out the assays of antioxidant activity of an extended variety of flavonoids, demonstrating that eriodictyol is the flavonoid with the highest antioxidant power followed by quercetin, myricetin, luteolin, apigenin and naringenin. Total flavonoid content (Table 4) was quantified in the extracts to determine the relationship with the antioxidant activity. These extracts obtained from the bioconversion showed a high content of total flavonoids which correlates well with the ABTS and DPPH assays data. This agrees with the publication of Dangrit and Sompornpailin [54] where the high content of flavonoids correlates with a high free radical scavenging. In the first instance of this work, the inhibition percentage of ABTS· is higher than that for DPPH· and a slightly higher relationship between flavonoid content and percentage of ABTS· inhibition is presented, showing a significant difference in the percentages of inhibition of ABTS· and DPPH· in both media. Previous studies showed discrepancies among the reported antioxidant activity determined by in vitro tests [55]. Bondet et al. [56] mention that there is reversibility in the reaction of DPPH· with phenolic compounds which would cause a decrease in antioxidant activity thereby explaining the differences between reported data. Additionally, the ABTS· shows low selectivity, reacting with any hydroxylated aromatic compound regardless of its antioxidant potential [38]. In the present work, the extracts with an initial concentration of naringenin of 300 mg L<sup>-1</sup> in surface culture displayed an activity of elimination of the radical DPPH· 9.67 times higher than that of the precursor naringenin, and that for the elimination of the radical ABTS· was of 1.13 times.

**Table 4** Percentage of inhibition of DPPH· and ABTS· radicals in the extracts

Initial concentration of naringenin (mg L <sup>-1</sup> )	Total flavonoids (mg L <sup>-1</sup> )		% inhibition				% inhibition of naringenin	
			ABTS·		DPPH·			
	Type of culture							
	Surface	Liquid	Surface	Liquid	Surface	Liquid	ABTS·	DPPH·
100	53.33 ± 7.63 65 ± 7.07		46.93 ± 1.04	77.38 ± 2.84	19.29 ± 1.58	40.12 ± 0.25	37.143 ± 2.67	1.22 ± 0.15
150	108.33 ± 0.0	128.33 ± 12.58	56.48 ± 3.16	78.53 ± 6.13	21.03 ± 0.38	40.79 ± 1.59	49.08 ± 0.85	1.64 ± 0.20
200	121.66 ± 10.40	169.33 ± 19.13	60.59 ± 2.63	75.21 ± 0.47	21.07 ± 0.99	40.05 ± 0.72	51.16 ± 2.56	2.17 ± 0.03
300	225 ± 20.81	239.16 ± 10.56	66.94 ± 4.78	79.35 ± 7.88	21.27 ± 12.44	41.20 ± 1.38	59.13 ± 1.35	2.20 ± 0.01
450	266.66 ± 54.08	369.16 ± 28.97	67.91 ± 5.31	77.84 ± 2.79	37.71 ± 0.92	41.10 ± 0.22	59.57 ± 0.33	2.96 ± 0.20
600	420 ± 52.04	543.33 ± 16.07	70.22 ± 3.19	79.78 ± 4.93	36.57 ± 0.88	40.64 ± 0.25	65.97 ± 3.54	3.26 ± 0.31
800	533.33 ± 56.78	731.66 ± 20.81	77.07 ± 0.86	78.89 ± 0.11	37.20 ± 0.45	40.92 ± 0.56	69.66 ± 3.09	3.35 ± 0.65
1000	860 ± 55.07	946.66 ± 43.10	77.284 ± 5.08	82.65 ± 3.37	37.70 ± 1.47	46.59 ± 6.49	71.23 ± 0.44	3.61 ± 0.16
1500	908.33 ± 13.22	1261.67 ± 40.10	82.85 ± 3.70	89.53 ± 2.38	38.04 ± 2.00	48.95 ± 6.46	81.07 ± 0.86	5.81 ± 0.17
2000	1018.33 ± 45.09	1958.33 ± 37.52	87.64 ± 2.32	91.39 ± 1.48	48.07 ± 0.35	64.06 ± 0.79	83.97 ± 0.08	6.66 ± 0.06
3000	1685 ± 105.83	2918.30 ± 72.85	93.66 ± 1.65	94.71 ± 0.88	70.85 ± 0.69	80.66 ± 3.12	87.36 ± 1.63	6.88 ± 0.79
4500	2033.33 ± 133.16	4396.66 ± 85.78	94.55 ± 1.57	95.07 ± 1.29	80.88 ± 1.22	81.17 ± 2.35	89.37 ± 0.53	7.00 ± 1.18
6000	2691.66 ± 111.39	5683.33 ± 125.83	95.52 ± 1.48	96.72 ± 0.30	82.05 ± 0.36	89.35 ± 0.54	90.71 ± 0.01	7.48 ± 1.48



It is worth mentioning that all the extracts contained several compounds in addition to the residual naringenin. The molecular structure of the formed flavonoids, determines their antioxidant power [57], some structural modifications may increase the antioxidant activity, while it decreases for others. In this study, the molecular changes had no effect on the antioxidant activity of the synthesized compounds. For the liquid culture, the elimination of DPPH- and ABTS-radicals from the extract with an initial concentration of naringenin of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  was 32.88 and 2.08 times higher than that of naringenin, respectively. Comparison of the inhibition percentages of ABTS- and DPPH- showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the surface and liquid culture for the formation of compounds with remarkable antioxidant activity during the naringenin bioconversion. Therefore, we have demonstrated the bioconversion of naringenin to high added value compounds such as apigenin, luteolin, quercetin, myricetin, aromadendrin, ampelopsin and eriodictiylol by means of whole-cells of *Y. lipolytica* 2.2ab in surface and liquid cultures. Additionally, this work is a watershed for the future production of many other non-naturally existing flavonoid molecules hydroxylated by *Y. lipolytica*.

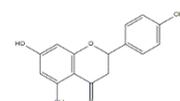
**Acknowledgments** We are grateful to the National Council of Science and Technology (Conacyt México) for financial support for project SEP-CONACYT-2013-CO1-220867, and through a Christian Hernández Guzmán PhD Grant 302006.

### Compliance with ethical standards

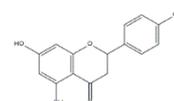
**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

### References

- Álvarez E, Cambeiro O (2003) Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer *Offarm* 22:130–140
- Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P (2014) Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol Adv* 33:1063–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Ribeiro IA, Rocha J, Sepodes B, Mota-Filipe H, Ribeiro MH (2008) Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *J Mol Catal B Enzym* 52–53:13–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.10.011>
- Olsen KM, Hehn A, Jugde H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C (2010) Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol* 10:1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-21>
- Markovic JD (2007) Flavonoids, the role and the importance in modern investigations. *Acta Agric Serb* XII:25–36
- Madej A, Popłowski J, Huszcza E (2014) Improved oxidation of naringenin to carthamidin and isocarthamidin by *Rhodotorula marina*. *Appl Biochem Biotechnol* 173:67–73. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0787-4>
- Das S, Rosazza JPN (2006) Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J Nat Prod* 69:499–508. <https://doi.org/10.1021/np0504659>
- Zhang J (2007) Flavonoids in grapefruit and commercial grapefruit juices: concentration, distribution, and potential health benefits. *Proc Fla State Hort Soc* 120:288–294
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Tong X, Smith KA, Pelling JC (2012) Apigenin, a chemopreventive bioflavonoid, induces AMP-activated protein kinase activation in human keratinocytes. *Mol Carcinog* 51:268–279. <https://doi.org/10.1002/mc.20793>
- López-Lázaro M (2009) Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 9:31–59. <https://doi.org/10.2174/138955709787001712>
- Marín L, Gutiérrez-del-Río I, Entrialgo-Cadierno R, Villar CJ, Lombó F (2018) De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE* 13:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278>
- Pinto JT, Alvarenga LF, Pinto de Oliveira D, Toledo de Oliveira T, Schwan RF, Dias DR, de Queiroz JH (2017) Elaboration and characterization of Japanese Raisin Tree (*Hovenia dulcis* Thumb.) pseudofruits fermented alcoholic beverage. *Food Sci Technol* 37:101–108. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.25616>
- Cheng P, Gui C, Huang J, Xia Y, Fang Y, Da G, Zhang X (2017) Molecular mechanisms of ampelopsin from *Ampelopsis megaphylla* induces apoptosis in HeLa cells. *Oncol Lett* 14:2691–2698. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6520>
- Kou X, Chen N (2012) Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea. *Food Sci Hum Wellness* 1:14–18. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2012.08.001>
- Kou X, Fan J, Chen N (2017) Potential molecular targets of ampelopsin in prevention and treatment of cancers. *Anticancer Agents Med Chem* 17:1610–1616. <https://doi.org/10.2174/1871521409666170412130529>
- Jiménez-Atiéndar M, Escribano J, Cabanes J, Gandía-Herrero F, García-Carmona F (2005) Oxidation of the flavonoid eriodictiylol by tyrosinase. *Plant Physiol Biochem* 43:866–873. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.010>
- Minato KI, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T (2003) Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci* 72(14):1609–1616. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02443-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02443-8)
- Xu J, Yang L, Zhao SJ, Wang ZT, Hu ZB (2012) An efficient way from naringenin to carthamidin and isocarthamidin by *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1803–1806. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0934-9>
- Nagy TO, Ledolter K, Solar S (2008) Oxidation of naringenin by gamma-radiation. *Radiat Phys Chem* 77:728–733. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.10.007>
- Kasai N, Ikushiro S-i, Hirose S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Ohta M, Sakaki T (2009) Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 387:103–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.134>
- Ribeiro IA, Ribeiro MHL (2008) Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control* 19:432–438. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.007>
- Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM (2011) Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or

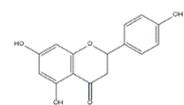


- methoxylated phenolic compounds. *Process Biochem* 46:1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.017>
24. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26:1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
  25. Cao H, Chen X, Jassbi AR, Xiao J (2015) Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol Adv* 33:214–223. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>
  26. Lee JH, Oh ET, Chun SC, Keum YS (2014) Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger* and *Cunninghamella elegans*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57:523–527. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4145-6>
  27. Velasco RB, Montenegro DLM, Vélez JFS, García CMP, Durango DLR (2009) Biotransformación de compuestos aromáticos sustituidos mediante hongos filamentosos fitopatógenos de los géneros *botryodiplodia* y *colletotrichum*. *Rev Soc Quím Perú* 75:94–111
  28. Hirakawa K, Kobayashi S, Inoue T, Endoh-Yamagami S, Fukuda R, Ohta A (2009) Yas3p, an op1 family transcription factor, regulates Cytochrome P450 expression in response to n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 284:7126–7137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806864200>
  29. Holland HL, Weber HK (2000) Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr Opin Biotechnol* 11:547–553. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00142-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00142-7)
  30. Chu LL, Pandey RP, Jung N, Jung HJ, Kim E-H, Sohng JK (2016) Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. *Microb Cell Fact* 15:1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0533-4>
  31. Amor IL-B, Salem N, Guedon E, Engasser J-M, Chekir-Ghedira L, Ghoul M (2010) Preliminary investigation of naringenin hydroxylation with recombinant *E. coli* expressing plant flavonoid hydroxylation gene. *Nat Prod Commun* 5:777–782
  32. Chang T-S, Lin M-Y, Lin H-J (2010) Identifying 8-hydroxynaringenin as a suicide substrate of mushroom tyrosinase. *J Cosmet Sci* 61:205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00619.1.x>
  33. Coelho MAZ, Amaral PFF, Belo I (2010) *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Appl Microbiol Microb Biotechnol* 1:930–944
  34. Palmerin-Carreño DM, Rutiaga-Quiñones OM, Verde Calvo JR, Prado-Barragan A, Huerta-Ochoa S (2015) Screening of microorganisms for bioconversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *LWT Food Sci Technol* 64:788–793. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.065>
  35. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
  36. Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51:6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
  37. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
  38. Pérez-Nájera V, Lago-Cervantes E, Gutiérrez-Lomelí M, Del-Toro-Sánchez C (2013) Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Rev Ciencias Biol La Salud* XV:1665–1456. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.153>
  39. Fajardo-Romero A, Arroyo-Rivera Á, Ramírez-Navas JS (2017) Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*). *UGCiencia* 22:119–126. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.599>
  40. Marín L, Gutiérrez-del-Río I, Yagüe P, Manteca Á, Villar CJ, Lombó F (2017) De novo biosynthesis of apigenin, luteolin, and eriodictyol in the actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Front Microbiol* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00921>
  41. Park SR, Paik JH, Ahn MS, Park JW, Yoon YJ (2010) Biosynthesis of plant-specific flavones and flavonols in *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol Biotechnol* 20:1295–1299. <https://doi.org/10.4014/jmb.1005.05038>
  42. Park SR, Ahn MS, Han AR, Park JW, Yoon YJ (2011) Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. *J Microbiol Biotechnol* 21:1143–1146. <https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08012>
  43. Chung DM, Chung YC, Maeng PJ, Chun HK (2011) Regioselective deglycosylation of onion quercetin glucosides by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 33:783–786. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0501-8>
  44. Zhu S, Wu J, Du G, Zhou J, Chen J (2003) Efficient synthesis of eriodictyol from l-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 80:3072–3080. <https://doi.org/10.1128/AEM.03986-13>
  45. Trueba GP (2003) Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cuba. Investig Biomed* 22:48–57
  46. Leonard E, Yan Y, Koffas MAG (2006) Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 8:172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.001>
  47. Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F (2009) Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 6:355–366. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.07.004>
  48. Semwal DK, Semwal RB, Combrinck S, Viljoen A (2016) Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients* 8:1–31. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
  49. González-Mendoza D (2007) El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. *Rev Int Contam Ambient* 23:177–183
  50. Araújo WL, Martins AO, Fernie AR, Tohge T (2014) \*2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Front Plant Sci* 5:1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00552>
  51. Bordewick S, Beier A, Balke K, Bornscheuer UT (2018) Baeyer-Villiger monooxygenases from *Yarrowia lipolytica* catalyze preferentially sulfoxidations. *Enzyme Microb Technol* 109:31–42. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.09.008>
  52. Osadebe PO, Okoye FBC, Uzor PF, Nnamani NR, Adiele IE, Obiano NC (2012) Phytochemical analysis, hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchornea cordifolia* methanol leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Asian Pac J Trop Med* 5:289–293. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60041-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60041-8)
  53. Habtemariam S (1997) Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- $\alpha$  in L-929 tumor cells. *J Nat Prod* 60:775–778. <https://doi.org/10.1021/np960581z>
  54. Dangrit D, Sompornpailin K (2018) Antioxidant activities of transgenic flower over-expressing FLS and TT8 involving in flavonoid biosynthesis. *Appl Mech Mater* 879:78–82. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.879.78>
  55. Frejnagel S (2007) Comparison of polyphenolic composition of extracts from honeysuckle, chokeberries and green tea: a short report. *Pol J Food Nutr Sci* 57:83–86
  56. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical



- method. *LWT - Food Sci Technol* 30:609–615. <https://doi.org/10.1006/food.1997.0240>
57. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic compounds. *Free Radical Bio Med* 20(7):933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## 10.5. Participación en congresos

### Participación 1: Poster

**Título:** Hidroxilación de la naringenina por células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017.



### HIDROXILACIÓN DE LA NARINGENINA POR CÉLULAS COMPLETAS DE *Yarrowia lipolytica* 2.2ab EN CULTIVO SUPERFICIAL

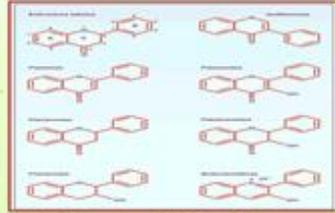
Christian Hernández Guzmán\*, Angélica Román Guerrero\*, Lilia Arely Prado Barragán\*, Miquel Gimeno Seco\*, Sergio Huerta Ochoa \*

\* Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
\* Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### Resumen

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos generados por el metabolismo secundario de los vegetales. Se les ha relacionado con una serie de efectos benéficos para la salud, fundamentalmente se caracterizan por exhibir alto potencial antioxidante, lo cual coadyuva en el tratamiento de diferentes padecimientos de salud. Se ha reportado que las moléculas con mayor grado de hidroxilación presentan mejores características benéficas, motivo por el cual se ha incrementado el interés en el estudio de los mecanismos que generen aumento de hidroxilación. Este estudio tiene como objetivo identificar los productos que presenten mayor grado de hidroxilación generados como resultado de la bioconversión de naringenina utilizando células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. Se identificaron (HPLC y HPLC-MS-MS) las moléculas de eriodictiol y luteolina originadas por la bioconversión de naringenina por células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab en cultivo superficial.

#### Introducción



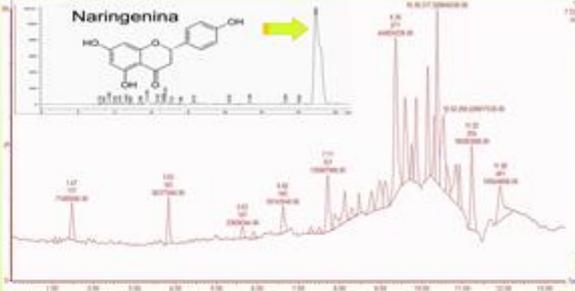
**Antioxidante, Antibacterial, Antidiabética, Antifúngica, Antiinflamatoria, Anticancerígena, Antialzheimer, Antituberculosa, AntiVIH, Antituberculosa, Antiplaquetario y Anticoagulante, Antialérgicas.**

#### Metodología



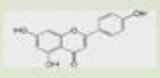
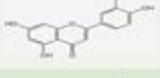
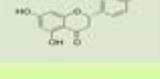
Los experimentos de bioconversión se llevaron a cabo en frascos serológicos de 25 mL con 5 mL de medio de cultivo PDA y un inóculo de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, cubriendo el crecimiento superficial de la cepa con una solución de naringenina (42 mg L<sup>-1</sup>) e incubados a 30 °C durante 192 h. La determinación de la concentración de naringenina y la presencia de productos formados durante la bioconversión se llevó a cabo por HPLC [5]. Para la identificación de los productos se requirió el uso de HPLC-MS-MS.

#### Resultados



**Figura 1.** Cromatograma (HPLC-MS-MS) de la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab a las 192 h.

#### Tabla 1. Estructura, fórmula condensada y peso molecular de flavanonas producidas

Compuesto	Estructura	Fórmula condensada y PM
Apigenina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> 270 g/mol
Luteolina		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> 286 g/mol
Eriodictiol		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 288 g/mol

#### Conclusiones

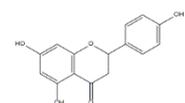
Se determinó el consumo de naringenina concomitante a la formación de apigenina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, 270 g/mol), eriodictiol (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 288 g/mol), y luteolina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 286 g/mol) utilizando células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab. Estos resultados indican que las células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab presentan el sistema enzimático requerido en el proceso de bioconversión de naringenina a moléculas con mayor grado de hidroxilación. Actualmente los compuestos con mayor grado de hidroxilación poseen mayor valor agregado en las industrias de alimentos, farmacéuticas y cosméticas.

E-mail: sho@xanum.uam.mx  
christian\_guzman24@hotmail.com

Agradecimiento: Al CONACYT por el financiamiento al proyecto CB-2013-01 22088 y beca para estudios de Posgrado.

#### Referencias

1. Álvarez-Castro, E. y Orallo-Cambeiro, F. "Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Ámbito Farmacológico*, 22(10): 130-140, 2003
2. Madej, A., Poplonki, J. y Huszcza, E. "Improved oxidation of naringenin to carthamidin and isocarthamidin by *Rhodotorula marina*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173: 67-73, 2014.
3. Nagy, Tristan O., Ledolter, Karin., Solar, Soja., "Oxidation of naringenin by gamma-radiation". *Radiation Physics and Chemistry*, 77: 728 – 733, 2008.
4. Prasetyo E.N., Nyantongo G.S., Guebitz G.M. "Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds". *Process Biochemistry*, 46: 1019-1024, 2011.
5. Hernández-Guzmán, C. "Bioconversión de flavonoides cítricos utilizando células microbianas enteras". Maestría en Biotecnología UAM-I, 2015.



## Participación 2: Poster

**Título:** Efecto del medio y tipo de cultivo en la bioconversión de la naringenina por células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017.



**EFECTO DEL MEDIO Y TIPO DE CULTIVO EN LA BIOCONVERSIÓN DE NARINGENINA POR CÉLULAS COMPLETAS DE *Yarrowia lipolytica* 2.2ab**

Christian Hernández Guzmán\*, Angélica Román Guerrero\*, Lilia Arely Prado Barragán\*, Miquel Gimeno Seco\*, Sergio Huerta Ochoa\*

\* Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
\* Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.



Resumen

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en vegetales, cereales y frutas. Se han observado múltiples efectos positivos para la salud debido a su acción antioxidante. Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del medio y tipo de cultivo en las reacciones de hidroxilación de naringenina utilizando células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. Se observó que *Y. lipolytica* 2.2ab presenta la capacidad de bioconversión de naringenina a productos con mayor grado de hidroxilación como el eriodictiol y la luteolina en ambos tipos de cultivo; mientras que la quercetina sólo se produjo en cultivo líquido. Asimismo, se observó que el tipo de cultivo afecta la concentración de los compuestos hidroxilados que se producen.

Introducción

**Antioxidante, Antidiabético, Antiinflamatorio, Antialzheimer, AntiVIH, Anticoagulante,**

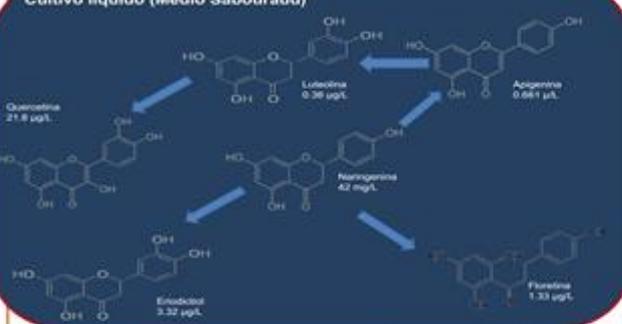
**Antibacterial, Antifúngica, Anticancerígena, Antituberculoso, Antiplaquetario y Antialérgicas.**



Flavonoides

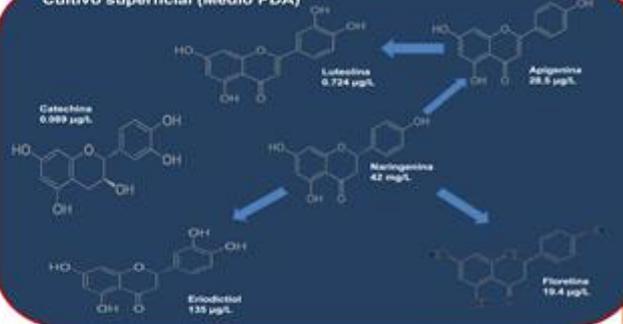
Resultados

Cultivo líquido (Medio Sabouraud)



Quercetina 21.8 µg/L, Luteolina 0.36 µg/L, Apigenina 0.661 µL, Naringenina 42 mg/L, Eriodictol 3.32 µg/L, Fisetina 1.33 µg/L

Cultivo superficial (Medio PDA)



Catequina 0.989 µg/L, Luteolina 0.724 µg/L, Apigenina 28.6 µg/L, Naringenina 42 mg/L, Eriodictol 135 µg/L, Fisetina 19.4 µg/L

Metodología



Colecta de cepas UAM-PP4, PDA, pH 5.5 (7 días y a 30°C), Cortejo de células, Bioconversión Naringenina, Extracción de los productos, Análisis por HPLC, Crecimiento 1 x 10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>

*Yarrowia lipolytica* 2.2ab fue obtenida del cepario de la Planta Piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. La bioconversión se llevó a cabo en caldo Dextrosa Sabouraud (CSD) y Agar Papa Dextrosa (PDA). Los experimentos de bioconversión se llevaron a cabo en frascos serológicos de 250 ml, con 5 ml de medio PDA (cultivo superficial) y en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de CSD (cultivo líquido), en ambos casos se inoculó con 1x10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup> y se adicionaron 42 mg L<sup>-1</sup> de naringenina. Los cultivos se incubaron a 30 °C por 192 h. Posteriormente se determinó por HPLC la concentración de naringenina residual y de los productos formados como resultado de la bioconversión [2]. La identificación de los productos se realizó por HPLC-MS-MS.

E-mail: sho@xanum.uam.mx  
christian\_guzman24@hotmail.com

Agradecimiento: Al CONACyT por el financiamiento al proyecto CB-2013-01 22086 y beca para estudios de Posgrado.

Conclusiones

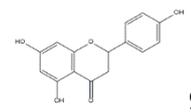
Se comprobó, para ambos tipos de cultivo, la producción moléculas de apigenina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 270 g/mol), eriodictol (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 288 g/mol) y luteolina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 286 g/mol) formadas durante el proceso de bioconversión de naringenina por células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab.

La formación de quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>, 302 g/mol) sólo se observó en medio líquido.

Se concluye que es factible utilizar el sistema enzimático contenido en las células completas de *Y. lipolytica* 2.2ab para la bioconversión de naringenina a compuestos con mayor grado de hidroxilación.

Referencias

1. Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. Y y Quevedo-Fosaca, "Flavonoides y sus acciones antioxidantes", J. Monografía Artemisa. Rev. Fac. Med. UNAM Vol. 52 No. 2 Marzo-Abril, 2009.
2. Hernández-Guzmán, C. "Bioconversión de flavonoides cítricos utilizando células microbianas enteras". Maestría en Biotecnología UAM-I, 2015.
3. Kawai, N., Iwasaki, S. I., Hirotsu, S., Anzawa, A., Ichino, H., Watanabe, H. y Sakaki, T. "Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*". *Biochemical and biophysical research communications*, 387, 1, 103-108, 2009.
4. López-Luengo, M. T. "Flavonoides". *Ámbito Farmacológico, OFFARM*, Vol. 21 No. 4 Abril 2002.
5. Hegu, Tristan O., Ledebler, Karin., Solar, Bigna. "Oxidation of naringenin by gamma-radiation". *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 728 - 733, 2008.
6. Prasetyo, E. N., Nyanhongo G. S., Guebitz G.M. "Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds". *Process Biochemistry*, 46, 1019-1024, 2011.
7. Te-Sheng Chang, Meng-Yi Lin, y Hsuan-Jung Lin. "Identifying 6-Hydroxynaringenin as a suicide substrate of mushroom tyrosinase". *J. Cosmet. Sci.* 61, 205-210 Mayo/Junio 2010.



90

### Participación 3: Ponencia

**Título:** Efecto de la concentración de naringenina en el proceso de bioconversión por *Y. lipolytica* 2.2ab en medio superficial y en medio líquido.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jal., México, del 25 al 30 de junio de 2017.



#### EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NARINGENINA EN EL PROCESO DE BIOCONVERSIÓN POR *Y. lipolytica* 2.2ab EN MEDIO SUPERFICIAL Y EN MEDIO LÍQUIDO

Christian Hernández Guzmán<sup>a</sup>, Angélica Román Guerrero<sup>a</sup>, Lilia Arely Prado Barragán<sup>a</sup>, Miquel Gimeno Seco<sup>b</sup>, Sergio Huerta Ochoa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Ciudad de México, C.P. 09340, <sup>b</sup> Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Ciudad de México, C.P. 04510, [christian\\_guzman24@hotmail.com](mailto:christian_guzman24@hotmail.com)

**Palabras clave:** Bioconversión, Biocatalizador, Hidroxilación

**Introducción.** Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos generados por el metabolismo secundario de los vegetales, los cuales al ser consumidos de manera regular confieren efectos benéficos para la salud, debido a que se caracterizan por poseer un alto potencial antioxidante (1). La naringenina es una molécula clasificada en el subgrupo de las flavononas, poseedora de un gran potencial antioxidante e interés debido a sus diferentes efectos positivos sobre la salud (2). Se ha demostrado que el grado de hidroxilación de los flavonoides incrementa su propiedad antioxidante. Kasai et al. (3) llevó a cabo la hidroxilación de la naringenina utilizando la enzima monooxigenasa citocromo P450 expresada por *P. chrysosporium*. El objetivo principal fue evaluar el efecto de la concentración de naringenina en el proceso de bioconversión con *Yarrowia lipolytica* 2.2ab en dos métodos de cultivo: superficial y líquido.

**Metodología.** Los experimentos de bioconversión se realizaron en frascos serológicos de 25 mL con 5 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa PDA y en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo Dextrosa Sabouraud, en ambos medios se inóculo  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , se probaron 13 concentraciones de naringenina de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  a  $6 \text{ g L}^{-1}$ , los cultivos se incubaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 192 h. La determinación de la concentración de naringenina residual y la presencia de productos formados durante la bioconversión se llevó a cabo por HPLC (4).

**Resultados.** Se observó, que la concentración de naringenina y el tipo de medio de cultivo tuvieron un efecto significativo en la bioconversión. En la Figura 1, se presentan los cromatogramas (HPLC) de las concentraciones de naringenina que proporcionaron la mayor formación de productos derivados de la bioconversión por *Y. lipolytica* 2.2ab, en los medios superficial (Figura 1a) y líquido (Figura 1b), a una concentración de naringenina (precursor) de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  y  $4.5 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. En ambos medios de cultivo se identificó con base a estándares externos una flavonona con apelativo eriodictiol ( $t_r = 12.7 \text{ min}$ ). También se observaron otras señales de posibles productos los cuáles serán identificados por HPLC-MS y

se continuará con la purificación de los productos por técnicas cromatográficas y poder realizar la identificación por Resonancia Magnética Nuclear.

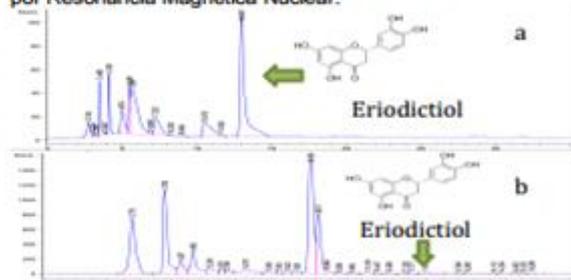


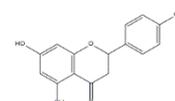
Figura 1. Cromatograma de HPLC de la bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab a las 192h a) Medio superficial y b) Medio líquido.

**Conclusiones.** Fue evaluado el efecto de la concentración de la naringenina y el tipo de medio cultivo en un proceso de bioconversión por *Yarrowia lipolytica* 2.2ab, obteniendo un efecto importante, ya que en ambos medios de cultivo hubo producción de la flavonona eriodictiol, además de otras señales de productos formados. Las concentraciones con mayor formación de productos fueron  $150 \text{ mg L}^{-1}$  para el medio superficial y  $4.5 \text{ g L}^{-1}$  para el medio líquido.

**Agradecimiento.** Al CONACyT por el financiamiento al proyecto CB-2013-01 22086 y beca de Posgrado 302006.

#### Bibliografía.

- 1) Alvarez-Castro, E. y Orallo-Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Ámbito Farmacéutico*, 22(10): 130-140.
- 2) Naqy, T., Ledolter, K. y Solar, S. (2008). Oxidation of naringenin by gamma-radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(6), 728-733.
- 3) Kasai, N., Ikushiro, S. I., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Watanishi, H. y Sakaki, T. (2009). Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(1), 103-108.
- 4) Hernández-Guzmán, C. (2015). Bioconversión de flavonoides cítricos utilizando células microbianas enteras. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I. 31-36.

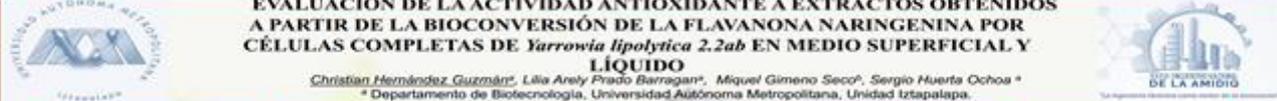


## Participación 4: Poster

**Título:** Evaluación de la actividad antioxidante a extractos obtenidos a partir de la bioconversión de la flavanona naringenina por células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab en medio superficial y líquido.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, San José del Cabo, B.C.S., México, del 1 al 4 de mayo de 2018.



### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA BIOCONVERSIÓN DE LA FLAVANONA NARINGENINA POR CÉLULAS COMPLETAS DE *Yarrowia lipolytica* 2.2ab EN MEDIO SUPERFICIAL Y LÍQUIDO

Christian Hernández Guzmán\*, Lilia Arely Prado Barragán\*, Miquel Gimeno Seco\*, Sergio Huerta Ochoa\*

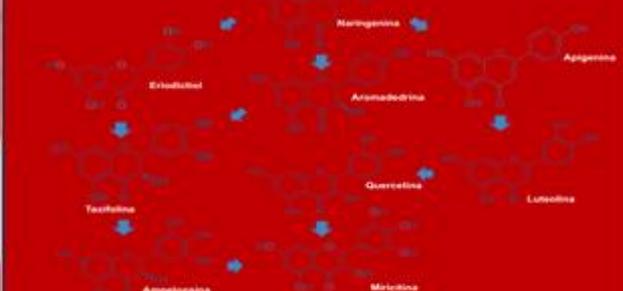
\* Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
\* Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### RESUMEN

Los flavonoides son compuestos de origen vegetal con diversa actividad biológica, su producción industrial se ve restringida debido a la complejidad de los métodos de extracción y bajo rendimiento. Una alternativa es su obtención por biosíntesis microbiana. En este estudio se evaluó la actividad antioxidante (DPPH\* y ABTS\*) de extractos obtenidos de la bioconversión de naringenina en cultivo superficial (150, 450 y 600 mg L<sup>-1</sup>) y cultivo líquido (1,500 y 4,500 mg L<sup>-1</sup>) por células completas de *Yarrowia lipolytica* 2.2ab. Como productos de bioconversión se identificaron (HPLC) moléculas de eriodictiol, apigenina, quercetina, taxifolina, luteolina, miricetina, aromadendrina y ampelopsina. Además, en el proceso de bioconversión en medio líquido, la actividad antioxidante, DPPH\* y ABTS\*, del extracto obtenido fue de 1.17 y 1.09 veces mayor, respectivamente, que en la concentración inicial naringenina (4,500 g L<sup>-1</sup>).

#### RESULTADOS

Productos de la bioconversión de la naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab en medio superficial y líquido



**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH\* y ABTS\* en los extractos obtenidos de la bioconversión de la naringenina

Tipo de Cultivo	Concentración Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	% Inhibición	
		DPPH*	ABTS*
Superficial	150	13.42 ± 1.82	60.22 ± 6.53
	450	13.98 ± 0.65	62.68 ± 1.49
	600	14.05 ± 1.11	60.92 ± 0.58
Líquido	1,500	17.61 ± 1.02	66.21 ± 8.53
	4,500	82.68 ± 6.55	98.73 ± 0.13
Estándar de naringenina	150	10.84 ± 0.00	41.18 ± 1.87
	450	11.61 ± 0.95	58.04 ± 1.72
	600	12.52 ± 0.19	59.68 ± 0.10
	1,500	14.47 ± 0.92	61.50 ± 0.28
	4,500	70.54 ± 0.87	90.41 ± 0.02

#### INTRODUCCIÓN



Antioxidante, Antibacterial, Antidiabética, Antifúngica, Antiinflamatoria, Anticancerígena, Antialzheimer, Antitubercular, AntiVIH, Antiplaquetario y Anticoagulante, Antialérgicas.

#### CONCLUSIONES

Tanto en cultivo superficial como en cultivo líquido, se identificaron como productos de la bioconversión: eriodictiol, apigenina, quercetina, taxifolina, luteolina, miricetina, aromadendrina y ampelopsina, aunque a diferentes concentraciones. Los extractos obtenidos a partir de la bioconversión de naringenina con células enteras de *Y. lipolytica* 2.2ab presentaron un mayor porcentaje de inhibición de los radicales DPPH\* y ABTS\* que el estándar de naringenina. Se observaron diferencias en el incremento de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos en cultivo superficial y líquido, probablemente debido a la diferencia de concentraciones de los flavonoides obtenidos y naringenina residual.

#### METODOLOGÍA



#### REFERENCIAS

- Álvarez, Ezequiel, and Orallo Cambaño. "Actividad Biológica de Los Flavonoides ( I ). Acción Frente Al Cáncer." *Ofium* 22(1): 7, 2003.
- Madej, A., Popielniak, J. y Huzarska, E. "Improved oxidation of naringenin to carthamin and isocarthamin by *Rhodotorula marina*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173: 67-73, 2014.
- Ribeiro, Isabel A. "Effect of Naringin Enzymatic Hydrolysis towards Naringenin on the Anti-Inflammatory Activity of Both Compounds." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 52-53(1-4): 13-18, 2006.
- Priestley E.N., Nyenongo G.S., Quebizi G.M. "Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds". *Process Biochemistry*, 46: 1019-1024, 2011.
- Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. Y. y Guzmán-Fonseca, "Flavonoides y sus acciones antioxidantes". *J. Monográfico Artemisa. Rev. Fac. Med. UNAM* Vol. 52 No. 2 Marzo-Abril, 2009.
- TedDheng Chang, Meng-Yi Liu, y Hsueh-Jung Lin. "Identifying 8-Hydroxynaringenin as a suicide substrate of mushroom tyrosinase". *J. Chromat. Sci.* 61: 205-210 Mayo-Junio 2010.
- Brand-Williams, W. M.E. Cuvelier, and C. Berset. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30, 1995.

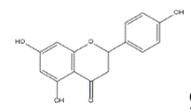
#### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



E-mail: sho@xanum.uam.mx  
christian\_guzman24@hotmail.com

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento al proyecto CB-2013-01 22086 y beca para estudios de Posgrado.



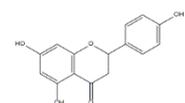
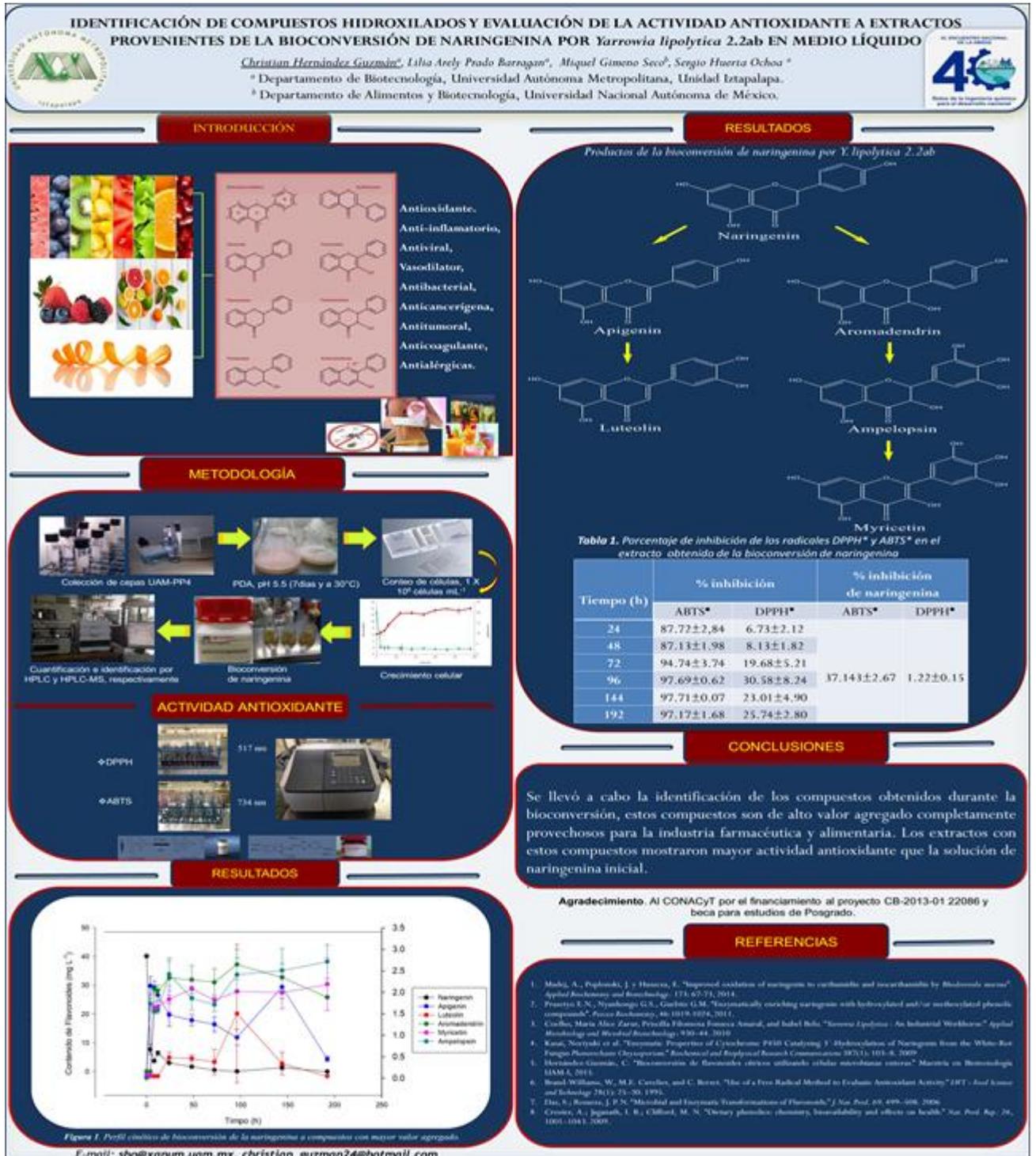
92

## Participación 5: Poster

**Título:** Identificación de compuestos hidroxilados y evaluación de la actividad antioxidante a extractos provenientes de la bioconversión de naringenina por *Yarrowia lipolytica* 2.2ab en medio líquido.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Huatulco, Oaxaca., México, del 7 al 10 de mayo de 2019.



## Participación 6: Poster

**Título:** Whole-cell bioconversion of naringenin using *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface and liquid cultures.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** 4th Edition of International Conference on Catalysis and Green Chemistry, Tokio, Japon., del 13 al 14 de mayo de 2019.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
IZTAPALAPA

### Whole-cell bioconversion of naringenin using *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in surface and liquid cultures

Christian Hernández-Guzmán<sup>1</sup>, Angélica Román-Guerrero<sup>1</sup>, Arely Prado-Barragán<sup>1</sup>, Miquel Gimeno<sup>2</sup>, Sergio Huerta-Ochoa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. P.A. 55-535, 09340 Iztapalapa, CDMX, México.  
<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

**Introduction**

The multiple biological activities of flavonoids, natural phenolic compounds, make them worthy of attention. They exert a wide range of positive attributes for human health such as: antioxidant activity, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, estrogenic, vasodilator, hepatoprotective, antihemorrhagic, among others. Naringenin is a member of the subgroup of flavonones, possessing a great antioxidant potential [1] and which has taken a great interest due to its different positive effects on health. These so-called bioactive compounds are of plant origin and their industrial production is restricted due to their complex production from vegetable substrates, as well as the low yield that is regularly obtained. To overcome these limitations, one of the alternatives is microbial biosynthesis [2,3]. The antioxidant activity presented by the flavonoids supposes to be related to the hydroxyl groups in the B ring, reason why the increase of the antioxidant activity in the flavonoids is directly proportional to the hydroxylation degree. These increase in the hydroxylation degree of the flavonoids can be carried out by chemical modification to a specific precursor using bioconversion processes with biocatalysts (enzymes or cells). This study was aimed to identify the products of the naringenin bioconversion using whole cells of *Yarrowia lipolytica* 2.2ab in superficial and liquid medium in order to add a greater added value through hydroxylation reactions and to evaluate the antioxidant capacity of the extracts.

**Results**

Naringenin bioconversion by *Y. lipolytica* 2.2ab resulted in the more hydroxylated and dehydrogenated products as these were identified as apigenin, luteolin, aromadendrin, ampelopsin and myricetin.

**Experimental Section**

Strain Collection of UAM-IPN → Inoculum preparation PDA, pH 5.5 (7 days and 30 °C) → Cell counting 1x10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> → Cell growth → Liquid culture Naringenin bioconversion → Surface culture Naringenin bioconversion → Quantification and identification of products by HPLC and HPLC-MS-MS, respectively

*Y. lipolytica* 2.2ab belongs to the collection of microbial cultures of the Solid State Fermentation research group of the Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. The bioconversion experiments were performed in 25 mL serological flasks with 5 mL of papa dextrose agar (PDA) for surface culture and in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of dextrose Sabouraud Broth (DSB) for liquid culture, both inoculated with 1x10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> and added with 42 mg L<sup>-1</sup>. Cultures were incubated at 30 °C for 192 h. Subsequently, resulting products and residual naringenin concentration were quantified by HPLC [4]. Identification of the reaction products was carried out in an HPLC-MS-MS unit.

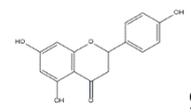
**Conclusions**

*Y. lipolytica* has great potential for its application in bioconversion of naringenin to molecules of greater biological and commercial value in both, surface and liquid culture.

**References**

- Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. Y. y Guevara-Foseca, 2009. "Flavonoides y sus acciones antioxidantes". *J. Monografía Artemisa. Rev Fac Med UNAM*, 52 ( 2 ) .
- Kasai, N., Kushiro, S. I., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Warishi, H. y Sakai, T. 2009. "Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387 (1): 103-108.
- Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. 2011. "Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds". *Process Biochemistry*, 46:1019-1024.
- Hernández-Guzmán, C. 2015. "Bioconversión de flavonoides cítricos utilizando células microbianas enteras". MSc in Biotechnology. UAM-I.

E-mails: sho@xonum.uam.mx  
christian\_guzman24@hotmail.com



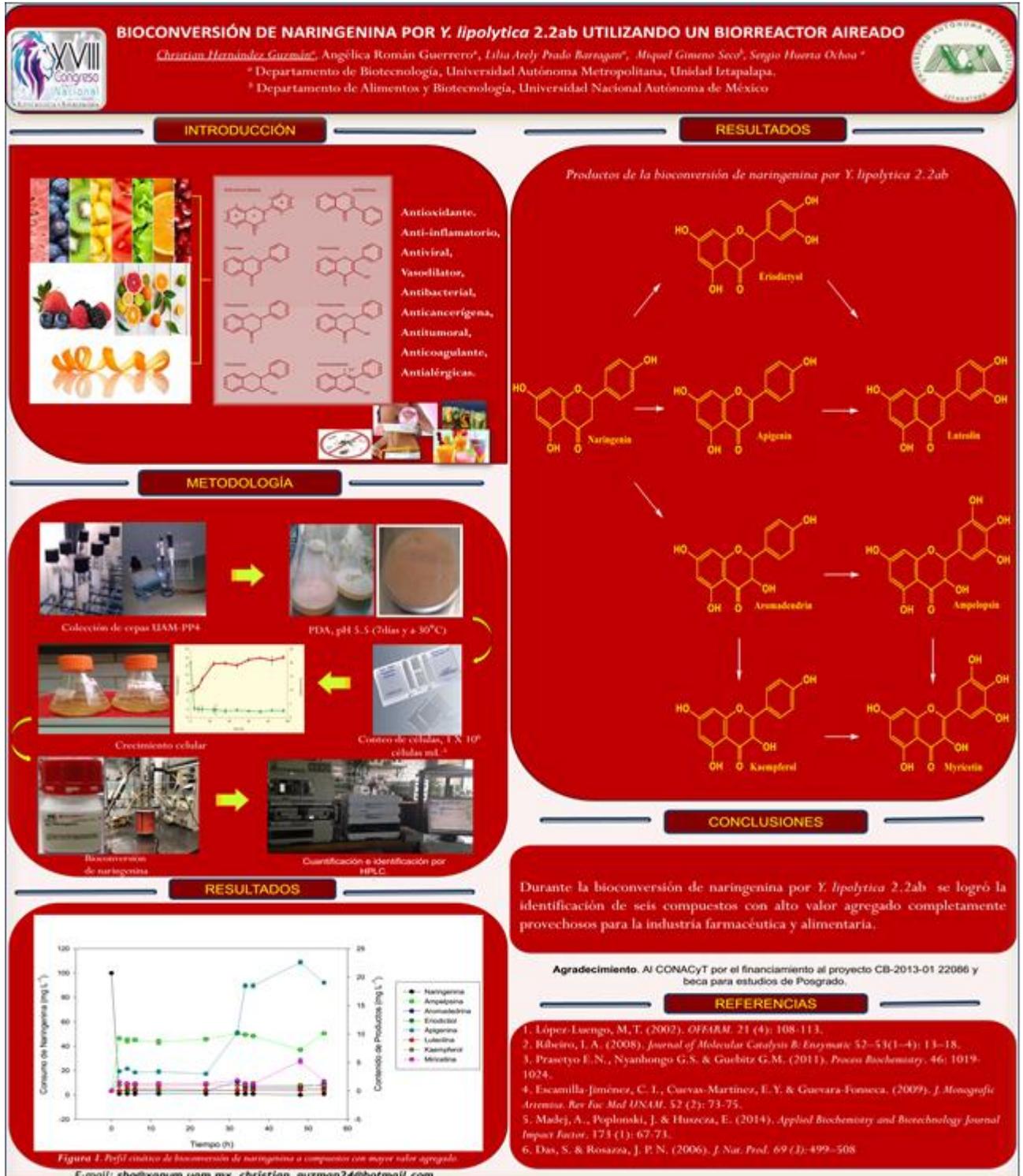
**Catalysis and Green Chemistry**

## Participación 7: Poster

**Título:** Bioconversión de naringenina por *Y. lipolytica* 2.2ab utilizando un biorreactor aireado.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, León, Guanajuato., México, del 23 al 28 de junio de 2019.



## Participación 8: Poster

**Título:** Identification of hydroxylated compounds from the bioconversion of naringenin by *Yarrowia lipolytica* 2.2ab.

**Autores:** Christian Hernández Guzmán, Angélica Román Guerrero, Lilia Arely Prado Barragán, Miquel Gimeno Seco, Sergio Huerta Ochoa.

**Congreso:** The 5<sup>th</sup> European Congress of Applied Biotechnology, Florencia, Italia., del 15 al 19 de septiembre de 2019.

**IDENTIFICATION OF HYDROXYLED COMPOUNDS FROM THE BIOCONVERSION OF NARINGENIN BY *Yarrowia lipolytica* 2.2ab**



*Christian Hernández Guzmán<sup>1</sup>, Angélica Román Guerrero<sup>1</sup>, Lilia Arely Prado Barragán<sup>1</sup>, Miquel Gimeno Seco<sup>2</sup>, Sergio Huerta Ochoa<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
<sup>2</sup> Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México



### Introduction

The flavonoids are plants secondary metabolites that exhibits important antiviral, anti-inflammatory, vasodilators and antioxidant biological activities [1]. Naringenin is classified on the subclass of flavonones and is naturally present in grapes, tomatoes and citric fruits. Due to its positive effects on health, their study has attracted the attention of several research groups [2, 3]. It has been reported that the increase in antioxidant activity in flavonoids is highly related to the degree of hydroxylation and/or methoxylation [4]. *Yarrowia lipolytica* may express the CYP450 enzyme system, which is indispensable to increase the hydroxylation of hydrophobic compounds such as naringenin [5]. Chang et al. [6] reported the bioconversion of naringenin to 8-hydroxynaringenin by *A. oryzae* cells. The hydroxylation of naringenin to eriodictiol by means of the cytochrome P450 monooxygenase enzyme expressed by *P. chrysosporium* was reported by Kasai et al. [7]. The objective of this study was the identification of the compounds obtained from the bioconversion of naringenin by the enzymatic system produced by *Y. lipolytica* 2.2ab (Y12.2ab).

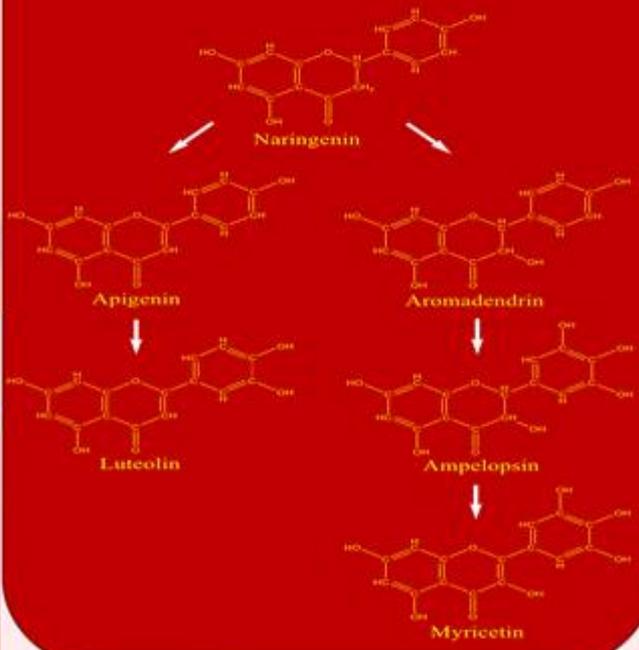


Antioxidant,  
Anti-inflammatory,  
Antiviral,  
Antidiabetic,  
Vasodilator,  
Antibacterial,  
Anticarcinogenic,  
Antitumor &  
Anti-hypertension.



### Results

Naringenin bioconversion by *Y. lipolytica* 2.2ab resulted in the more hydroxylated and dehydrogenated products; these were identified as apigenin, luteolin, aromadendrin, ampelopsin and myricetin.



### Experimental Section



Strain Collection of UAM-PP4



Inoculum propagation PDA, pH 5.5 (7 days and 30 °C)



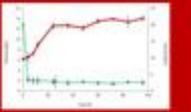
Cell counting  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>



Identification and concentration of products by HPLC and HPLC-MS-MS



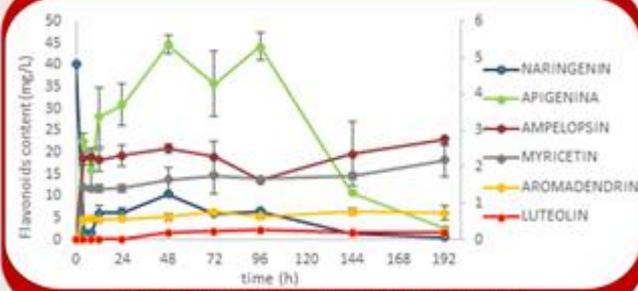
Naringenin bioconversion, Liquid culture



Cell growth

Bioconversion experiments were prepared in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of Sabouraud culture broth inoculated with  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> of Y12.2ab and 100 mg L<sup>-1</sup> of naringenin were added. Identification and concentration of residual naringenin and formed products was performed by HPLC and HPLC-MS-MS, the use of external standard was required [8].

### Results



**Figure 1.** Profile of concentrations during the bioconversion.  
E-mail: shod@xanum.uam.mx, christian\_guzman24@hotmail.com

### Conclusions

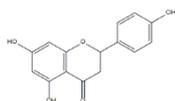
Five compounds with high added valued were obtained during the bioconversion naringenin by Y12.2ab. The molecules obtained showed higher antioxidant activity than the initial precursor.

### Acknowledgment

The authors thank CONACYT for the financial support for carrying out this research CB-2013-01 22086

### References

1. A. Madej, J. Poplonski, E. Huszcza, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173 (2014) 67-73.
2. E. Álvarez, O. Cambreiro, *Offarm*, 22 (2003) 130-140.
3. T.O. Nagy, K. Ledóber, S. Solár, *Radiation physics and chemistry*, 77 (2008) 728-733.
4. E.N. Prasetyo, G.S. Nyarhongo, Gierbitz G.M. *Process Biochemistry*, 46 (2011) 1019-1024.
5. M.A.Z. Coelho, P.F. Amaral, L.Belo, *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (2010) 930-44.
6. T.S. Chang, M.-Y. Lin, H.-J. Lin, *J. Cosmet. Sci*, 61, (2010) 205-210.
7. N. Kasai et al, *Biochemical and biophysical research communications*, 387 (2009) 103-108.
8. C. Hernández-Guzmán, Master in biotechnology, UAM-I, México, 2015.



96