

# EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL Y (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO EMPLEANDO CÉLULAS DE *Rhodococcus opacus* DSM 44313

## EVALUATION OF THE BIOTRANSFORMATION OF GERANIOL AND (R)-(+)- $\alpha$ -PINENE USING CELL OF *Rhodococcus opacus* DSM 44313

JENNIFER PILAR ROJAS<sup>1</sup>, JANETH AIDE PEREA<sup>2</sup>, CLAUDIA CRISTINA ORTIZ<sup>3</sup>

### PALABRAS CLAVES:

Biotransformación, geraniol, (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, *Rhodococcus opacus*, ácido geránico, 6-metil-5-hepten-2-ona, (R)-(+)-*cis*-verbenol

### KEYWORDS:

Biotransformation, geraniol, (R)-(+)- $\alpha$ -pinene, *Rhodococcus opacus*, geranic acid, 6-methyl-5-hepten-2-one, (R)-(+)-*cis*-verbenol

### RESUMEN

*La alta biodisponibilidad de los monoterpenos los hace precursores promisorios en los procesos de biotransformación, mediante los que se producen compuestos de valor agregado que pueden considerarse naturales, debido a que se obtienen por métodos enzimáticos a partir de precursores aislados de la naturaleza. En el presente estudio se evaluó la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando la cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* DSM 44313, para ello se determinó la influencia del tiempo de crecimiento de la bacteria, tomando suspensiones celulares en la mitad y finalizando la fase exponencial. También se evaluaron tres tiempos de reacción (12, 24 y 48 h) y el efecto de un cosolvente, agregando los sustratos puros y disueltos en etanol al 10%. A partir del geraniol se produjeron geraniol, ácido geránico y 6-metil-5-hepten-2-ona, sólo cuando el sustrato se adicionó puro, y se formaron en mayor concentración cuando la bacteria estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial. Con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se produjo como compuesto principal el (R)-(+)-*cis*-verbenol, siendo mayor su concentración agregando el pineno disuelto en etanol, y cuando la bacteria se encontraba en la mitad de su fase de crecimiento exponencial. Los resultados indican que el comportamiento de la bacteria cambia según el sustrato adicionado, debido a las propiedades de cada monoterpeno, pero los compuestos obtenidos con ambos sustratos tienen importantes aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimenticia y de perfumería.*

Recibido para evaluación: 4 de marzo 2009. Aprobado para publicación 11 de julio 2009

1 Universidad Industrial de Santander –UIS-, Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos –CICTA-, Estudiante de Maestría en Química.

2 Directora CICTA, Docente Escuela de Química, aperea@uis.edu.co

3 Docente Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

## ABSTRACT

*The high bioavailability of monoterpenes make them promising precursors in biotransformation processes, through which produce value-added compounds that can be considered natural because they are obtained by enzymatic methods from precursors isolated from nature. In the present study we evaluated the biotransformation of geraniol and (R)-(+)- $\alpha$ -pinene using a bacterial strain of *Rhodococcus opacus* DSM 44313; the influence of growth time bacterial was determined taking cell suspensions in the middle and finishing the exponential phase. Also three reaction times (12, 24 and 48 h) and the effect of a cosolvent were evaluated, adding the substrate pure and dissolved in ethanol at 10%. From geraniol were obtained geranial, geranic acid and 6-methyl-5-hepten-2-one, only when the substrate was added pure, and were formed in highest concentration when the bacteria was finalizing its exponential phase growth. With (R)-(+)- $\alpha$ -pinene the (R)-(+)-cis-verbenol was formed as the main compound, with a higher concentration adding the pinene dissolved in ethanol, and when the bacteria was in the middle of its exponential phase growth. The results indicate that the behavior of the bacteria changes according to the substrate added, because the properties of each monoterpene, but the compounds obtained with the two substrates have important applications in pharmaceutical, food and perfumery industries.*

## INTRODUCCIÓN

El interés en compuestos naturales en lugar de sintéticos ha aumentado la investigación acerca de la producción biotecnológica de estas sustancias [1]. Entre los sustratos utilizados con fines biocatalíticos se encuentran los terpenos, compuestos que constituyen el grupo más grande de productos naturales con cerca de 22 mil estructuras individuales conocidas hasta ahora [2]. Los terpenos están presentes en los aceites esenciales de diferentes especies y variedades vegetales, y su valor comercial puede mejorar si se transforman en productos con aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y de perfumería [3].

La modificación de los terpenos puede realizarse usando bioprocesos que implican enzimas de diversos microorganismos, purificadas o como células completas, tanto solubles como inmovilizadas. Su aplicación permite tener procesos de tecnología limpia, realizados en condiciones de reacción moderadas [4,5], y obtener compuestos que pueden ser legalmente etiquetados como "productos naturales" [6].

El geraniol (*E*-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) es un alcohol terpénico encontrado en los aceites esenciales de rosa, geranio, citronela y palmarosa (90%), y debido a su aroma a menudo se referencia junto con el nerol, el linalol y el citronelol como alcohol de

rosa [7]. Su bioconversión es promisoría porque da lugar a la formación de  $\alpha$ -terpineol, linalol y 6-metil-5-hepten-2-ona [7], utilizados como aromatizantes y saborizantes [8,9], así como de 10-hidroxigeraniol, 10-hidroxinerol y 10-hidroxicitronelol [10], precursores de los alcoholes monoterpén-indólicos ajmalicina y serpentina, utilizados como agentes antihipertensivos, contra las arritmias cardíacas y para el mejoramiento de la circulación [11]. También puede obtenerse el ácido geránico, reconocido por sus propiedades anticancerígenas, debido a que induce la apoptosis y la actividad agonista retinoide [12].

De otra parte, el  $\alpha$ -pineno es el monoterpeno más abundante después del limoneno [6] y el principal componente del aceite de trementina, obtenido de las resinas de plantas coníferas, que pueden contener hasta un 50% de pinenos, y como un subproducto de la industria del papel [13,14]. El isómero más abundante es el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno, extraído de fuentes naturales con pureza óptica máxima de 91%, mientras que el (S)-(-)- $\alpha$ -pineno se extrae con pureza del 81%. La industria de fragancias y saborizantes consume aproximadamente 30.000 toneladas por año de pinenos, los cuales se usan para producir un amplio rango de compuestos, siendo el 84 % de ellos obtenidos por síntesis química [13].

Las biotransformaciones de  $\alpha$ -pineno producen principalmente verbenol y verbenona [15,16,17], compuestos usados en las industrias de alimentos, fragancias y fármacos [18,19].

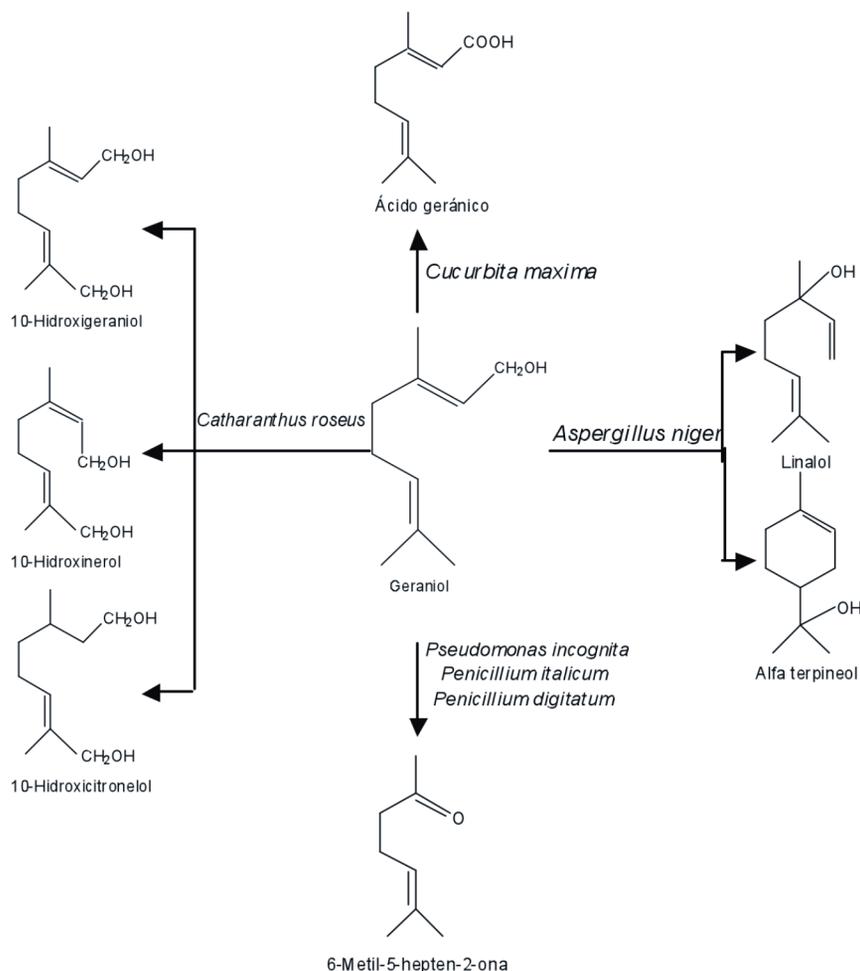
Para la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se han empleado hongos, bacterias y células vegetales, y los productos obtenidos varían según el microorganismo empleado como biocatalizador (Figuras 1 y 2).

El género *Rhodococcus* es un grupo de bacterias Gram positivas que está ampliamente distribuido en ambientes de suelo y agua, muy conocido por su diversidad metabólica que incluye hidrocarburos, compuestos aromáticos y moléculas grandes como esteroides. Se

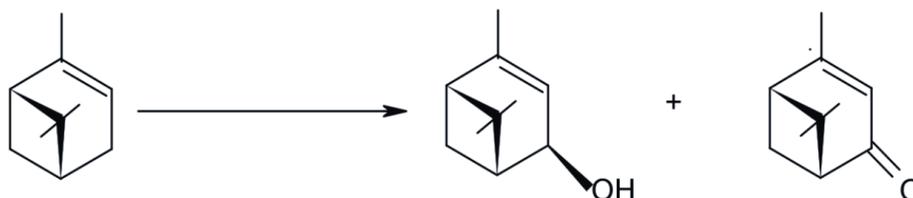
ha investigado un variado número de cepas de *Rhodococcus* por su habilidad para catalizar la hidroxilación y se ha demostrado que este género de bacterias posee gran potencial oxidativo. Entre las especies interesantes se encuentran la *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus erythropolis* [20], sin embargo, no hay reportes en los que utilicen células de *Rhodococcus opacus* en la bioconversión de los sustratos empleados en este estudio.

Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando la cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* DSM 44313, determinando la influencia del tiempo de crecimiento de la bacteria, así como del tiempo de reacción y de la adición del sustrato puro y disuelto en etanol como cosolvente.

**Figura 1.** Compuestos obtenidos en la biotransformación de geraniol empleando diferentes biocatalizadores



**Figura 2.** Principales compuestos obtenidos en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando células de hongos, plantas y bacterias



## METODOLOGÍA

### REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se empleó como biocatalizador una cepa certificada de *Rhodococcus opacus* obtenida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, *DSMZ, GmbH-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania)*. El geraniol y el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno ( $\geq 97\%$ ) se adquirieron de Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). Los solventes etanol ( $\geq 99.9\%$ ) y acetato de etilo ( $\geq 99.8\%$ ) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania) y el nitrógeno gaseoso de Aga-Fano (Bucaramanga, Colombia). Los medios de cultivo empleados fueron caldo de triptona soya (TSB, 30 g de medio en polvo en 1 L de agua destilada) y triptona soya agar (TSA, 40 g de medio en polvo en 1 L de agua destilada) y se prepararon de acuerdo a las sugerencias de Oxoid (Hampshire, Inglaterra). Los medios de cultivo se esterizaron en autoclave a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos antes de realizar los ensayos.

### CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

La cepa de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 adquirida en forma liofilizada, se reactivó en el medio líquido TSB, según las especificaciones del proveedor. Posteriormente se hizo un repique en el medio sólido TSA y después de 4 días de crecimiento a 30 °C se extrajo una colonia y se resuspendió en 15 mL de medio TSB, que se dejó crecer a 30 °C por 4 días.

La cinética de crecimiento bacteriano se estableció-

mediante mediciones turbidimétricas y de peso seco, siguiendo el método descrito por Duetz y col. [21].

### EXPERIMENTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN

Se tomaron 2.5 mL de suspensión de células formadas en el medio TSB, y se resuspendieron en 22.5 mL del mismo, esta suspensión se incubó a 30 °C durante 24 h y se denominó preinóculo. Al día siguiente se prepararon 225 mL de TSB y se les agregaron los 25 mL de preinóculo, esa resuspensión se puso en agitación a 300 rpm con temperatura controlada a 30 °C y se empezaron a contabilizar los tiempos establecidos por la curva de crecimiento en los que la bacteria se encontraba en el punto medio y finalizando su fase de crecimiento exponencial. En el caso del geraniol se tomaron 4980  $\mu$ L de suspensión celular y se les agregaron 20  $\mu$ L de geraniol puro, así como 4825  $\mu$ L de suspensión de células y 175  $\mu$ L de geraniol al 10% en etanol. Para la bioconversión de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno se tomaron 4985  $\mu$ L de suspensión celular y se les adicionaron 15  $\mu$ L de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno puro, así como 4840  $\mu$ L de suspensión de células y 160  $\mu$ L de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno al 10% en etanol. El etanol se utilizó para evaluar la presencia de un cosolvente, teniendo en cuenta que en todos los casos la concentración de sustrato en el volumen de reacción fue 20 mM. Las reacciones se realizaron en viales de 22 mL con tapa rosca, y se utilizó un shaker con agitación orbital a 300 rpm. Transcurridas 12, 24 y 48 h de reacción, se agregaron 1.25 mL de acetato de etilo, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se extrajeron los metabolitos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y al azar, determinando en cada caso la desviación estándar.

## ANÁLISIS DE PRODUCTOS

Los extractos se concentraron hasta 1 mL con nitrógeno gaseoso, se les adicionó n-tetradecano como estándar interno y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N (Paloalto, CA, USA). Para la separación de los analitos se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-WAX (60 m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25  $\mu$ m grosor de la película). La programación de temperatura fue desde 45 °C mantenidos por 10 min, con velocidad de calentamiento de 3 °C /min hasta 220 °C que se mantuvo por 30 min. Se empleó un detector selectivo de masas modelo Agilent 5975C (Paloalto, CA, USA) con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV) y analizador de masas cuadrupolar operado en modo de barrido completo desde 40 hasta 400 Dalton (m/z). La relación de split fue de 1:13 y se usó un inyector automático modelo HP 7683 Series. La identificación de componentes se realizó empleando el sistema de datos HP Enhanced Chemstation G1701BA y comparando los espectros de masas de los productos con aquellos contenidos en las bases de datos espectrales ADAMS, NIST 05 y WILEY 138.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

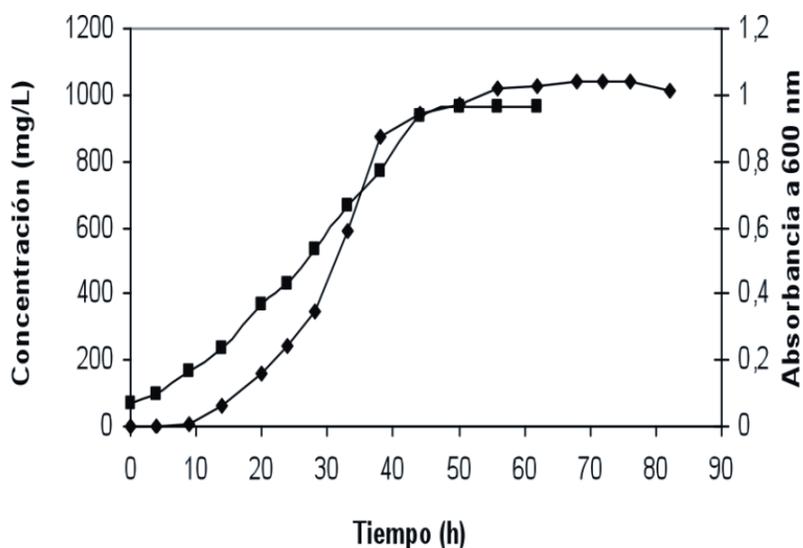
### CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento para la cepa de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 en el medio TSB se muestra en la Figura 3. En ella se observa que la bacteria presenta una fase de latencia de 9 h, y que la mayor concentración de células (967 mg/L) se obtiene a las 50h. También muestra que a las 31 h (618 mg/L) la bacteria se encuentra en la mitad de su fase de crecimiento exponencial y a las 44 h (933 mg/L) está finalizando esa fase. De modo que a esos tiempos se tomaron los volúmenes de suspensión celular para llevar a cabo la biotransformación.

### BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIOL

Las reacciones de biotransformación en las que el geraniol se agregó disuelto en etanol al 10%, conllevaron a la formación de productos por autooxidación, es decir, se encontraron los mismos compuestos tanto en los blancos como en los experimentos que contenían suspensión de células, mientras que en los ensayos

Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa *Rhodococcus opacus* en el medio TSB.  $\blacksquare$  Concentración (mg/L);  $\blacklozenge$  Absorbancia



en los que el geraniol se adicionó puro al sistema de reacción sí hubo bioconversión, como se muestra en la Tabla 1, donde se relacionan las concentraciones de los compuestos producidos. En ella se aprecia que el producto mayoritario fue el geranial (E-3,7-dimetil-2,6-octadienal), es decir, la bacteria oxidó el sustrato, que es un alcohol, y lo convirtió en su forma aldehídica, la mayor concentración se presentó a las 24 h de reacción con células tomadas cuando la bacteria estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial (24B). El segundo compuesto en abundancia es el ácido geránico (ácido (2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienóico), producto de la inserción de un átomo de oxígeno y la remoción de dos átomos de hidrógeno en la molécula de sustrato (Figura 1). El tercer compuesto formado es la cetona 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO). Tanto el ácido geránico como el MHO se obtienen en mayor concentración después de 48 h de reacción con la suspensión celular tomada finalizando la fase de crecimiento exponencial (48B).

Para los tres productos se observa que la mayor concentración se obtuvo tomando la suspensión celular a las 44 h de crecimiento bacteriano, es decir, cuando la cepa de *Rhodococcus opacus* DSM 44313 estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial.

Los compuestos producidos son de gran importancia en las industrias farmacéutica, perfumística y de alimentos. El geranial se usa en perfumería (es el principal constituyente del aroma a rosa) y en la síntesis de la Vitamina

A. El ácido geránico es reconocido por sus propiedades anticancerígenas, debido a que induce la apoptosis y la actividad agonista retinoide [12]. El 6-metil-5-hepten-2-ona es un intermediario de gran valor en la producción de aromatizantes. Se emplea como saborizante natural ya que posee un sabor reminiscente a pera; se han reportado varias patentes para su síntesis química, partiendo de diferentes sustratos y utilizando temperaturas elevadas y catalizadores de paladio, pero los rendimientos son relativamente bajos y el producto así obtenido no puede considerarse natural [22,23]. De los compuestos producidos los más relevantes son el ácido geránico y el 6-metil-5-hepten-2-ona porque no son abundantes en la naturaleza, mientras que el geranial es el principal constituyente de la esencia de la hierba de limón y también se encuentra en el aceite esencial de geranio y de otras plantas y flores [7].

El ácido geránico se ha producido con una cantidad relativa del 5% por biotransformación de geraniol mediante células vegetales de *Cucurbita maxima* [11], en este estudio, la mayor concentración obtenida, 47.59 ppm, representa el 1.55% de cantidad relativa, menor al reportado en la bibliografía, sin embargo, en la referencia el tiempo de reacción fue de 20 días, con una concentración inicial de geraniol de 6.0 mM, mientras que en el presente trabajo, el mayor tiempo de reacción fue de 2 días y la concentración de geraniol fue de 20.0 mM. Es decir, dejando transcurrir más tiempo la reacción o modificando la concentración de sustrato

**Tabla 1.** Compuestos producidos en la biotransformación de geraniol agregado puro (mg/L), tomando la suspensión celular en la mitad (A) y finalizando la fase de crecimiento exponencial (B)

Tiempo (h) Compuesto	12A	24A	48A	12B	24B	48B
6-metil-5-hepten-2-ona	ND.	ND.	ND.	2.27 ± 0.58	3.08 ± 0.86	5.33 ± 0.48
Geranial	78.13 ± 5.26	76.53 ± 4.85	72.36 ± 8.75	48.88 ± 3.27	78.90 ± 6.55	44.25 ± 0.93
Ácido geránico	11.75 ± 0.84	11.78 ± 1.26	22.46 ± 2.76	33.24 ± 2.54	41.41 ± 4.07	47.59 ± 1.46

Media ± Desviación estándar (n = 3); ND: No detectable

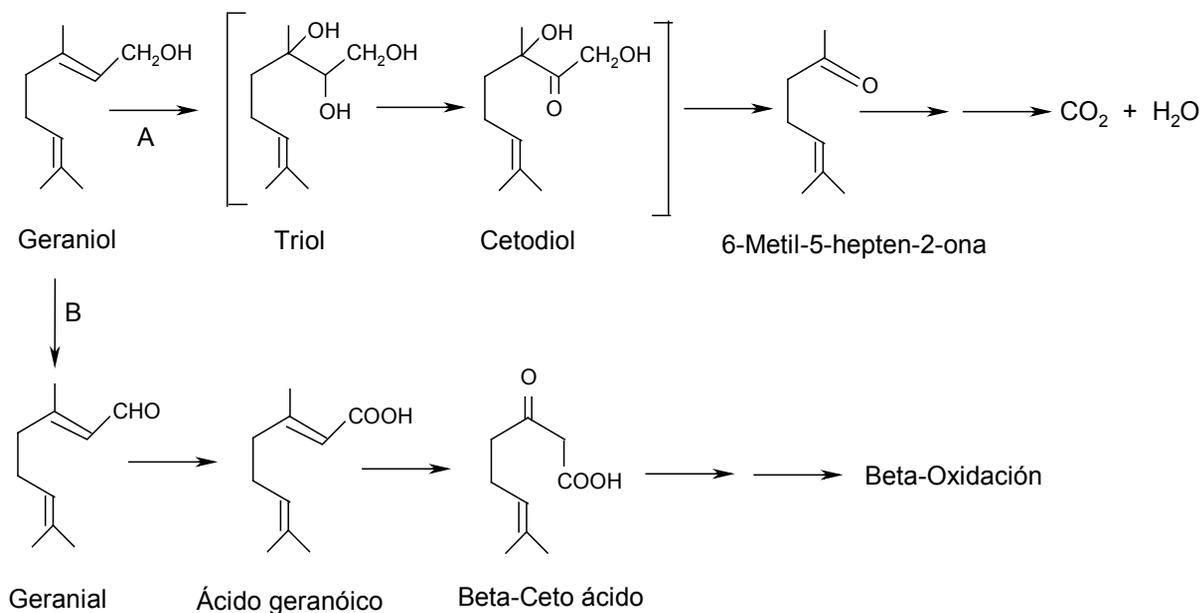
pueden obtenerse mayores concentraciones de este importante anticancerígeno. Además, es probable que la alta concentración de sustrato adicionada en este trabajo inhiba la capacidad biotransformadora de la bacteria.

El 6-metil-5-hepten-2-ona se ha obtenido por biotransformación de geraniol empleando células bacterianas de *Pseudomonas incognita* para la cual se han propuesto dos rutas (Figura 4). La ruta A implica un ataque oxidativo sobre el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, formando un epóxido, que luego proporciona un triol, que posteriormente es oxidado al cetodiol. Este cetodiol después es convertido en 6-metil-5-hepten-2-ona por un proceso oxidativo. La ruta B inicia con la oxidación del grupo hidroxil del alcohol primario para producir geranial y ácido geránico que es posteriormente  $\beta$ -oxidado [6]. El 6-metil-5-hepten-2-ona también se ha producido empleando células fúngicas de *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*, sin embargo, la bioconversión por hongos parece seguir un mecanismo diferente al propuesto para la biotransformación por *Pseudomonas incognita* (Figura 4). El estudio completo de las rutas enzimáticas implicadas está en progreso [6].

## BIOTRANSFORMACIÓN DE (R)-(+)- $\alpha$ -PINENO

En la Tabla 2. se observan las concentraciones en las que se obtuvo el (R)-(+)-cis-verbenol (Figura 2), principal producto de la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno. En ella se aprecia que la concentración de (R)-(+)-cis-verbenol aumenta con el tiempo, ya sea agregando el sustrato puro o disuelto en etanol al 10% y tomando la suspensión de células en la mitad (A) o finalizando (B) la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, comparado con el geraniol, se observa una mayor formación de producto cuando el sustrato se disuelve en etanol, específicamente a las 48 h de reacción tomando la suspensión celular en la mitad de la fase de crecimiento exponencial (48A). Los cambios observados pueden deberse a las diferencias de solubilidad. En el caso del (R)-(+)- $\alpha$ -pineno el etanol puede facilitar el proceso de bioconversión debido a que solubiliza el sustrato en el medio de reacción, sin el cual no sería posible debido a la baja solubilidad del  $\alpha$ -pineno en agua (0.026 mmol/L) [24], mientras que el geraniol por ser un alcohol es más soluble en agua y con ese sustrato el etanol podría ejercer un efecto tóxico sobre las células.

Figura 4. Posibles rutas para la degradación de geraniol por *Pseudomonas incognita*



**Tabla 2.** Concentraciones del cis-verbenol obtenido en la biotransformación de (R)-(+)- $\alpha$ -pineno (mg/L) tomando la suspensión celular en la mitad (A) y finalizando la fase de crecimiento exponencial (B)

Tiempo (h)	12A	24A	48A	12B	24B	48B
Adición de sustrato						
Puro	27.52 $\pm$ 0.28	30.78 $\pm$ 2.45	33.19 $\pm$ 4.63	16.06 $\pm$ 1.77	35.48 $\pm$ 2.10	46.69 $\pm$ 3.83
Disuelto en etanol al 10%	25.82 $\pm$ 4.82	33.84 $\pm$ 4.66	71.85 $\pm$ 3.05	18.57 $\pm$ 0.75	27.73 $\pm$ 2.00	63.49 $\pm$ 1.31

Media  $\pm$  Desviación estándar ( $n = 3$ ); ND: No detectable

El (R)-(+)-cis-verbenol se usa como feromona de agregación para controlar las infestaciones por escarabajos en los pinos y como material de partida para preparar análogos del ácido  $\alpha$ -aminobutírico (GABA) y directamente como aditivo o para producir variedad de compuestos fragantes y vitaminas [19]. El (R)-(+)-cis-verbenol se ha obtenido por biotransformación del (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando como biocatalizadores células de *Pseudomonas putida* [15], una cepa de *A. niger* genéticamente modificada y células vegetales de *Psychotria brachyceras*, *Rauvolfia sellowii* [19] y *Picea abies* [16].

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron compuestos con importantes aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y perfumística, mediante la biotransformación de geraniol y (R)-(+)- $\alpha$ -pineno empleando células de *Rhodococcus opacus* DSM 44313.

La cepa bacteriana llevó a cabo la biotransformación de geraniol, produciendo geranial, ácido geránico y 6-metil-5-hepten-2-ona, sólo cuando el sustrato se agregó puro al sistema de reacción. Los tres compuestos se obtuvieron en mayor concentración cuando la bacteria estaba finalizando su fase de crecimiento exponencial.

Con el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno la bacteria llevó a cabo la producción de (R)-(+)-cis-verbenol, tanto a partir del sustrato adicionado puro, como a partir del sustrato disuelto en etanol. El (R)-(+)-cis-verbenol se produjo en

mayor concentración a las 48 h de reacción tomando la suspensión celular en la mitad de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria y adicionando el sustrato disuelto en etanol, es decir, en este caso, a diferencia de lo observado con el geraniol, el etanol favoreció el proceso de biotransformación, posiblemente debido a las diferencias de solubilidad entre el geraniol y el (R)-(+)- $\alpha$ -pineno.

## AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el financiamiento del Proyecto 8159.

Doctora Elena Stashenko, directora del Centro de Investigación en Biomoléculas –CIBIMOL–.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] SERRA, Stefano; FUGANTI, Claudio y BRENNAN, Elisabetta. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*. 2005. Vol. 23. Nº. 4: 193-198.
- [2] DE CARVALHO, Carla y DA FONSECA, Manuela. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology advances*. 2006. Vol. 24: 134-142.
- [3] LINARES, Denis et al. Production of trans-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99: 4590-4596.
- [4] GIRI, Archana et al. Biotransformation using plant

- cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*. 2001. Vol. 19: 175-199.
- [5] STRAATHOF, Adrie; PANKE, Sven y SCHMID, Andreas. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002. Vol. 13: 548-556.
- [6] LINARES, Denis; FONTANILLE, Pierre y LARROCHE, Christian. Exploration of  $\alpha$ -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Application to novalic acid production in a bioreactor. *Food Research International*. 2009. Vol. 42. N° 4: 461-469.
- [7] SELL, Charles. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2003. 410 p.
- [8] DA SILVA, José et al. Rhodium Catalyzed hydroformylation of Linalool. *Applied Catalysis A: General*. 2006. Vol. 309: 169-176.
- [9] MARÓSTICA, Mario y PASTORE, Gláucia. Production of R-(+)- $\alpha$ -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 101: 345-350.
- [10] COLLU, Graziella et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters*. 2001. Vol. 508: 215-220.
- [11] LOYOLA, Víctor et al. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. 2004. Vol. 48: 67-94.
- [12] NAGAKI, Masahiko et al. Biotransformation of prenyl alcohols by cultured cells of *Cucurbita maxima*. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 2007. Vol. 47: 33-36.
- [13] TONIAZZO, Geciane et al. Biotransformation of (-)- $\beta$ -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005. Vol. 121: 837-844.
- [14] YOO, S.K.; DAY, D.F.; CADWALLADER, K.R. Bioconversion of  $\alpha$ - and  $\beta$ - pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry*. 2001. Vol. 36: 925-932.
- [15] DIVYASHREE, MS.; GEORGE, J.; AGRAWAL, R. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *Journal of Food Science and Technology*. 2006. Vol. 43. N° 1: 73-76.
- [16] LINDMARK, Marica et al. Transformation of  $\alpha$ -Pinene using *Picea abies* suspension culture. *Journal of Natural Products*. 2003; 66: 337-343.
- [17] ROZENBAUM, H.F. et al. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Brazilian of Chemical Engineering*. 2006. Vol. 23, N° 3: 273-279.
- [18] ANCEL, J.E. et al. Kinetic peculiarities of  $\alpha$ -pinene oxidation by molecular oxygen. *Applied Catalysis A: General*. 2004. Vol. 272: 109-114.
- [19] LIMBERGER, Renata et al. Bioconversion of (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2007; Vol. 10. N° 4: 500-507.
- [20] VAN DER GEIZE, Robert y DIJKHUIZEN, Lubbert. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current Opinion in Microbiology*. 2004. Vol. 7: 255-261.
- [21] DUETZ, W.A. et al. Methods for intense aeration, growth, storage and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66: 2641-2646.
- [22] AQUINO, Fabrice; BONRATH, Werner y CREVATIN, Aljosa. Process for the preparation of methylheptenone. 2008. US. P. 7.319.172.
- [23] KRILL, Steffen; KRETZ, Stephan; SCHNEIDER, Achim. Preparation of 6-methylheptanone. 2003. US. P. 6.605.746.
- [24] VAN DER WERF, Mariët; DE BONT, Jan y LEAK, David. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1997. Vol. 55: 147-177.