

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE LIMONINA

Flavio Ccoriñaupa H.¹, Víctor Meza C^{1*}, Alejandro Fukusaki Y.²

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrolló una nueva metodología de aislamiento y selección de microorganismos degradadores de limonina. La parte experimental se realizó en los Laboratorios de Microbiología “Marino Tabusso” y de Fitoquímica, ambos en la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los microorganismos fueron aislados a partir de cáscara de naranja mezclada con tierra húmeda, suelo contaminado con hidrocarburos y compost que contenía residuos de cítricos.

Se empleó un medio salino modificado (MSM) que contenía adicionalmente limonina (120 µg mL⁻¹), pH 6,0. El procedimiento de selección constaba de tres etapas en las que se empleaba limonina en diferentes concentraciones y en la tercera etapa se realizaba una caracterización bioquímica de las cepas resultantes.

La primera selección permitió obtener 48 microorganismos potenciales degradadores de limonina. En la segunda selección se obtuvo 11 cepas que se destacaron como las que más degradaron el triterpenoide. En la tercera selección destacaron las cepas LMT-59 y LMT-69 quienes presentaron un alto porcentaje de degradación de limonina y reunieron las mejores características en la utilización de fuentes de carbono: glucosa(-), lactosa(-) y citrato(+). No obstante, las cepas LMT-47 y LMT-53 presentaron los mayores porcentajes de degradación: 89,64% y 88,89%, respectivamente. La metodología usada resulta barata y práctica para el aislamiento de microorganismos degradadores de triterpenoides tipo limonina.

Palabras clave: limonina, degradadores de triterpenoides, *Acinetobacter sp*, *Arthrobacter globiformis*, compost

ISOLATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS THAT DEGRADE LIMONIN

ABSTRACT

In the current research investigation a new methodology was developed for the isolation and selection of microorganisms that degrade limonin. The experimental stage was done in Marino Tabusso Microbiology Laboratory at La Molina National Agrarian University. The microorganisms were isolated from orange peelings mixed with humid soil, polluted with hydrocarbons and compost containing citric remains.

A modified saline media containing additional limonin was used (120 µg mL⁻¹), pH 6,0. The selection procedure was done in three stages, where limonin was used in different concentrations and where in the third stage a biochemical characterization was done in the resulting strains.

¹ Departamento de Biología Univ. Nac. Agraria La Molina

* vmeza@lamolina.edu.pe

² Departamento de Química de la Univ. Nac. Agraria La Molina

The first selection allowed us to obtain 48 potentially degrading microorganisms of limonin. In the second selection 11 strains were obtained that appeared as the ones that degraded the triterpenoid the most. In the third selection the strains LMT-59 and LMT-69 were the ones that had the highest percentage of limonin degradation and the ones that had the best characteristics in the way they used carbon sources: glucose(-), lactose(-) and citrate(+). However, the strains LMT-47 and LMT-53 were the ones that had the highest percentages of degradation, 89,64% and 88,89%, respectively. The used methodology was cheap and practical for the isolation of limonin type terpenoid degrading microorganisms.

Key words: limonin, terpenoid degrading, *Acinetobacter sp.*, *Arthrobacter globiformis*, compost

INTRODUCCIÓN

La limonina es un triterpenoide organolépticamente amargo que está presente en la mayoría de los cítricos. Su importancia radica en el hecho de que la presencia de este limonoide en concentraciones que imprimen un grado de amargor fuera del espectro normal devalúa el valor comercial del zumo y reduce su aceptación como materia prima en las empresas procesadoras de cítricos^{1,2}.

Las empresas que utilizan como materia prima zumos de cítricos son las que producen gaseosas, mayonesa, zumos concentrados, papillas para bebés y mezclas de jugos naturales, son las que se ven más afectadas en la obtención de un producto final más aceptable³.

Por otra parte, existen diversos planteamientos que buscan estabilizar el grado de amargor de los zumos de cítricos⁴. Así, un método químico plantea regular el índice de madurez (IM), factor que relaciona la concentración de sólidos totales (°Brix) y la acidez. Entre los métodos físicos está el de mantener el zumo a bajas temperaturas o utilizar polímeros sintéticos que absorben compuestos amargos. Sin embargo, estos métodos presentan problemas de alteración de las características nutricionales y organolépticas del zumo o su elevado costo operacional. Frente a esto la biotecnología ha planteado el uso de enzimas que permitan hidrolizar los compuestos amargos en procesos compatibles con los flujos de obtención del zumo y con el medio ambiente.

Entre los diversos limonoides amargos tenemos a la limonina, nomilina, ichangin y el ácido isolimoneico metil éster⁵; son también muchos los microorganismos que potencialmente poseen la capacidad de degradarlos. Las investigaciones en microorganismos que pueden ser utilizados en la prevención y/o tratamiento del grado de amargor del zumo data aproximadamente de 1973 y hasta la fecha se han recogido una serie de bacterias, en las que se ha demostrado la existencia de rutas metabólicas que permiten degradar limonoides. Así, tenemos: *Arthrobacter globiformis*⁶, *Pseudomonas sp.* 321-18⁷, *Bacterium* 342-152-1^{8,9}, *Corynebacterium fascians*⁹, *Rhodococcus fascians*² y *Acinetobacter sp.*¹⁰

Las investigaciones en estos microorganismos se han orientado a la evaluación de las enzimas que hidrolizan la limonina o su precursor no amargo. Para ello, se han producido extractos enzimáticos que se han empleado en la estabilización del zumo de cítricos. Así, por ejemplo, se ha determinado que *Arthrobacter globiformis* y *Bacterium* 342-152-1 producen limonoato deshidrogenasa, enzima que actúa controlando el metabolismo de limonoides. *Corynebacterium fascians* produce limonoato transeliminasa que actúa sobre la molécula de limonoato y en *Acinetobacter sp.* la molécula de limonina es metabolizada por la vía desoxilimonoide. Mientras que en *Pseudomonas sp.* 321-18 se ha determinado que la limonina se transforma a limonina lactona y viceversa, y que también produce limonoato deshidrogenasa, limonina epoxidasa y desoxilimonina hidrolasa.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología “Marino Tabusso” en la Universidad Nacional Agraria-La Molina. Los microorganismos fueron aislados a partir de cáscara de naranja mezclada con tierra húmeda, suelo contaminado con hidrocarburos y compost que contenía residuos de cítricos.

Por otra parte, se empleó un medio salino modificado (MSM) que contenía K_2HPO_4 1,0 ($g L^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 ($g L^{-1}$), $NaCl$ 0,1 ($g L^{-1}$), KCl 0,05 ($g L^{-1}$), $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 ($g L^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 ($g L^{-1}$) más limonina ($120 g mL^{-1}$), pH 6,0. También, se utilizaron varios medios de cultivo (caldo indol, caldo cianuro, agar lisina, agar Kligler, agar nitrato, agar motilidad y agar citrato) como controles bioquímicos de los microorganismos.

Aislamiento de microorganismos y primera selección

Se tomaron 10 g del sustrato, se diluyeron en 90 mL de agua destilada a pH 4,0, se agitaron enérgicamente por 3 minutos, se tomaba 1 mL del sobrenadante y se inoculaba en 99 mL de caldo limonina ($120 \mu g mL^{-1}$). Se incubó durante 7 días a 28 °C. Pasado este tiempo, se tomó una alícuota de este cultivo (0,1 mL) en placas de Petri con agar limonina (AL) ($120 \mu g mL^{-1}$), agar-agua y agar MSM, respectivamente y se uniformizó con una espátula de Drigalski estéril sobre la superficie del medio. Luego, se llevó a incubación por 4 días a 28 °C. A continuación, se observaron las colonias desarrolladas y se evaluó el diámetro y el aspecto externo, aislándose en tubos de agar limonina ($120 \mu g mL^{-1}$) las de mejor apariencia. Cada colonia aislada fue codificada con las siglas LMT y un número de acuerdo al orden de aislamiento. Luego, de 48 h de incubación a 28 °C se evaluó el crecimiento de cada una de las cepas, definiéndose como:

- **Cepas de crecimiento escaso**, aquellas que formaron colonias pequeñas (hasta 1 mm de diámetro) y en número reducido.
- **Cepas de crecimiento moderado**, aquellas que formaron colonias con un diámetro mayor a 1 mm pero menor a 2 mm y el número de colonias fue mayor, teniendo distancias mínimas entre las colonias.
- **Cepas de crecimiento abundante**, aquellas en la cual el crecimiento cubrió todo el área de siembra.

Segunda selección.

Se evaluó la eficiencia de hidrólisis de limonina de cada una de las cepas aisladas determinando la concentración de limonina residual en el caldo limonina ($120 \mu g mL^{-1}$).

Tercera selección.

Se realizó la evaluación microscópica y bioquímica, de cada una de las cepas aisladas según el Test de Mac Faddin¹¹ que considera las siguientes pruebas:

- Reducción de nitrato.
- Oxidación- reducción de azúcares.
- Motilidad
- Asimilación de citrato.
- Producción de ácido sulfhídrico.
- Descarboxilación de la lisina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los aislamientos realizados a partir de desperdicios de naranja, suelo con hidrocarburos y compost se presentan en el tabla 1.

Tabla 1. Aislamiento de microorganismos degradadores de limonina.

Número de aislamiento	Sustrato	pH	Número de colonias aisladas en AL ⁽¹⁾	Número de colonias desarrolladas en AMSM ⁽²⁾	Número de colonias desarrolladas en agar-agua	Codificaciones de la cepa
Primero	Desperdicios de naranja	3,5	13	6	0	LMT 1 - LMT 13
Segundo	Suelo con hidrocarburos	6,5	23	9	0	LMT 14 - LMT 36
Tercero	Compost	5,5	37	7	0	LMT 37 - LMT 73
Total			73			

⁽¹⁾ AL: Agar limonina

⁽²⁾ AMSM: Agar Medio Salino Modificado

Los tres sustratos empleados presentan un pH ácido (3,5; 5,5, y 6,5, respectivamente). Esta condición del sustrato pudo potencialmente permitir aislar microorganismos cuyo sistema de enzimas estuviera adecuado a trabajar a un pH menor a 7,0 y en consecuencia, que exista mayor probabilidad de encontrar enzimas que degraden limonina a un pH ácido; ya que este triterpenoide amargo se encuentra como tal a un pH ácido y en la forma de limonoato a un pH básico¹². Se demostró que la limonina y la monolactona D-limonoato se encuentran asimilables microbianamente a pH 5,0 y que a valores de pH 4,0 sólo se puede asimilar en la forma de limonina⁹. No obstante, se conoce que la limonoato deshidrogenasa a nivel de laboratorio muestra una óptima actividad a pH 8,0¹³.

El número de colonias aisladas difiere significativamente. Así, de desperdicios de naranja, suelo con hidrocarburos y compost se aislaron 13, 23 y 37 colonias, respectivamente.

Por los resultados obtenidos se puede señalar que los desperdicios de naranja generaron un sustrato menos favorable para el crecimiento de microorganismos. Esto podría deberse al pH extremo que presentó (3,5) y también porque se contó con la presencia de aceites esenciales que pudieran inhibir el crecimiento de los microorganismos.

El número de colonias de bacterias fue mayor a partir del suelo con hidrocarburos y compost. Esto probablemente se debió a que en estos sustratos la concentración de nutrientes es menor, por lo cual se obliga a los microorganismos a metabolizar la limonina (fuente carbonada) adicionada y probablemente los mohos y las levaduras no tengan las rutas metabólicas que se requieren para degradar la limonina.

En un segundo aislamiento, se aislaron en total 23 colonias, de los cuales sólo 14 son potencialmente degradadores de limonina. Esto se puede afirmar porque 9 colonias crecieron en el medio AMSM y ninguna en el agar-agua.

En el tercer aislamiento se obtuvo un total de 37 colonias, de los cuales sólo 30, potencialmente degradan limonina; porque en el medio AMSM crecieron 7 colonias y en el agar-agua no se observó crecimiento alguno. La mayoría de las colonias aisladas del compost presentaron una mejor apariencia que las colonias del primer y segundo aislamiento.

Los resultados de la primera selección se observan en el tabla 2; en ésta se presentan las características generales de crecimiento del total de colonias aisladas a partir de los diferentes sustratos, siendo codificadas con las letras y números LMT-1 hasta LMT-73.

Como se puede apreciar, existe una mayor tendencia a un crecimiento moderado y escaso de parte de las cepas aisladas y desarrolladas sobre agar-limonina y un reducido número de cepas con crecimiento abundante. Esto podría deberse a que las condiciones a las que están

sometidas las cepas obligan a utilizar a la limonina como fuente de carbono y hace que muestren diferente crecimiento en el medio.

De 37 colonias aisladas del compost, 23 presentan un crecimiento moderado, 5 un crecimiento abundante y sólo 7 crecieron de manera escasa. El hecho de haber aislado un número mayor de cepas del compost, podría ser atribuido a que utilizaron en el proceso de compostaje, material vegetal proveniente de familias como Rutaceae y Meliaceae que presentan limonoides en sus tejidos^{14,15,16}.

Ningún autor reporta una selección debida a la calidad del crecimiento de la colonia; esta selección permitió discriminar a los microorganismos que se inhibieron por efecto del pH y los que no tienen la capacidad de metabolizar la limonina como principal fuente de carbono por falta de iones de Zn¹³ para la activación de sus enzimas.

De las 73 colonias, se tomaron para la segunda selección sólo los que mostraron un crecimiento moderado o abundante (48 cepas) y se conservaron en refrigeración los de crecimiento escaso para un posterior estudio; probablemente estas últimas cepas eran los falsos positivos (cepas quimiolitótrofos).

Los resultados de la segunda selección se presentan en el tabla 3; en el cual podemos apreciar que 11 cepas presentaron porcentajes de degradación entre 83,69 y 89,54 %, siendo todos originarios del compost.

Se obtuvieron porcentajes significativos de degradación de limonina similares a los obtenidos por Hasegawa^{4,17}, quien reportó hasta un 95% de degradación de limonina con células inmovilizadas de *Arthrobacter globiformis* en gel de acrilamida y el 81% de degradación utilizando *Corynebacterium fascians* en el mismo soporte. Ambos trabajos fueron realizados en zumo de naranja a un pH promedio de 3,6.

Tabla 2. Primera selección

Sustrato	Cepa LMT	Características del Crecimiento en agar-limonina (120 µg mL ⁻¹)	Sustrato	Cepa LMT	Características del Crecimiento en agar-limonina (120 µg mL ⁻¹)
Desperdicios De naranja	1	Escaso		37	Moderado
	2	Escaso		38	Moderado
	3	Escaso		39	Escaso
	4	Escaso		40	Moderado
	5	Escaso		41	Moderado
	6	Escaso		42	Moderado
	7	Escaso		43	Moderado
	8	Moderado		44	Moderado
	9	Moderado		45	Moderado
	10	Escaso		46	Moderado
	11	Moderado		47	Moderado
	12	Moderado		48	Escaso
	13	Escaso		49	Escaso
Suelo con Hidrocarburos	14	Escaso	50	Abundante	
	15	Moderado	51	Escaso	
	16	Moderado	52	Moderado	

...viene de tabla 2

Suelo con Hidrocarburos	17	Moderado	Compost	53	Moderado
	18	Escaso		54	Escaso
	19	Escaso		55	Escaso
	20	Escaso		56	Abundante
	21	Moderado		57	Abundante
	22	Escaso		58	Moderado
	23	Escaso		59	Abundante
	24	Moderado		60	Moderado
	25	Escaso		61	Moderado
	26	Moderado		62	Abundante
	27	Moderado		63	Moderado
	28	Moderado		64	Moderado
	29	Moderado		65	Moderado
	30	Moderado		66	Moderado
	31	Moderado		67	Moderado
	32	Moderado		68	Moderado
	33	Moderado		69	Abundante
	34	Moderado		70	Moderado
35	Escaso	71	Moderado		
36	Escaso	72	Moderado		
			73	Escaso	

Tabla 3: Segunda selección

CEPA LMT	Concentración inicial de Limonina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración final de Limonina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Porcentaje de degradación (%)	pH inicial	pH final
8	120,0	119,5888 \pm 0,0982	0,34	6,0	6,25
9	120,0	104,0512 \pm 0,0692	13,29	6,0	6,20
11	120,0	118,9912 \pm 0,0579	0,84	6,0	6,30
12	120,0	98,3736 \pm 0,0061	18,02	6,0	6,25
15	120,0	95,9832 \pm 0,0130	20,01	6,0	6,35
16	120,0	86,4216 \pm 0,0266	27,98	6,0	6,55
17	120,0	78,6520 \pm 0,0416	34,46	6,0	6,50
21	120,0	99,8672 \pm 0,0208	16,78	6,0	6,65
24	120,0	110,2926 \pm 0,0131	8,09	6,0	6,45
26	120,0	104,4659 \pm 0,0313	12,95	6,0	6,70
27	120,0	119,2896 \pm 0,0594	0,59	6,0	6,70
28	120,0	118,4286 \pm 0,0563	1,31	6,0	6,80
29	120,0	113,1320 \pm 0,0383	5,72	6,0	6,45
30	120,0	118,2120 \pm 0,0530	1,49	6,0	6,70
31	120,0	107,7528 \pm 0,0129	10,21	6,0	6,60
32	120,0	116,1880 \pm 0,0349	3,18	6,0	6,90

continua tabla 2...

...viene de tabla 3

33	120,0	107,9022	+ 0,0205	10,08	6,0	6,60
34	120,0	118,5960	+ 0,0370	1,17	6,0	6,80
37	120,0	108,6480	+ 0,0250	9,46	6,0	6,95
38	120,0	90,4240	+ 0,0135	24,65	6,0	6,50
40	120,0	110,4440	+ 0,0025	7,96	6,0	6,60
41	120,0	106,2600	+ 0,0335	11,45	6,0	6,70
42	120,0	111,9360	+ 0,0442	6,72	6,0	6,75
43	120,0	13,6288	+ 0,0012	88,64	6,0	6,30
44	120,0	63,3800	+ 0,0956	47,18	6,0	6,65
45	120,0	19,4556	+ 0,0120	83,79	6,0	6,45
46	120,0	52,1748	+ 0,0740	56,52	6,0	6,45
47	120,0	12,4336	+ 0,0050	89,64	6,0	6,75
50	120,0	17,1149	+ 0,0006	85,74	6,0	6,65
52	120,0	70,4020	+ 0,0001	41,33	6,0	6,50
53	120,0	13,3300	+ 0,0012	88,89	6,0	6,55
56	120,0	14,5252	+ 0,0042	87,90	6,0	6,40
57	120,0	17,0652	+ 0,0011	85,78	6,0	6,40
58	120,0	82,5037	+ 0,0443	31,25	6,0	7,00
59	120,0	16,9157	+ 0,0000	85,90	6,0	6,10
60	120,0	17,2145	+ 0,0064	85,65	6,0	6,75
61	120,0	96,0994	+ 0,0255	19,92	6,0	7,00
62	120,0	16,0193	+ 0,0069	86,65	6,0	6,55
63	120,0	93,4101	+ 0,0140	22,16	6,0	7,25
64	120,0	116,5198	+ 0,0286	2,90	6,0	6,80
65	120,0	39,1768	+ 0,0095	67,35	6,0	7,90
66	120,0	113,4301	+ 0,0181	5,47	6,0	6,75
67	120,0	87,2846	+ 0,0085	27,26	6,0	7,60
68	120,0	116,8725	+ 0,0180	2,61	6,0	6,90
69	120,0	15,6209	+ 0,0012	86,98	6,0	6,75
70	120,0	103,5695	+ 0,0461	13,69	6,0	6,75
71	120,0	93,5595	+ 0,0455	22,03	6,0	6,45
72	120,0	116,1871	+ 0,0117	3,18	6,0	7,05

Por otro lado, se reportó un 45 % de degradación utilizando *Acinetobacter sp.* en zumo natural de naranja ajustado a un pH de 6,0¹⁰.

Entre los microorganismos aislados de suelo con hidrocarburos se pudo determinar la presencia de una levadura, la cual presentó la mayor degradación de limonina (34,46%).

Pocos investigadores han reportado a las levaduras con la capacidad potencial de degradar limonina, y menos, aislado de un sustrato con hidrocarburos. Un primer reporte se realizó en 1966 en *Candida sp.* que presentaba propiedades degradativas de hidrocarburos¹⁸. En la literatura se reportan más géneros de bacterias que degradan hidrocarburos y también limonina, por ejemplo *Corynebacterium sp.* y *Pseudomonas sp.*, entre los más importantes.

De otro lado, se puede apreciar que el pH final se incrementó en 0,67 unidades en relación al pH inicial (6,0), existiendo una tendencia a aumentar conforme llegamos a las cepas aisladas del compost; así se aprecia un pH final promedio para las cepas aisladas de desperdicios de

naranja, de 6,25; para las de suelo con hidrocarburos de 6,63 y para las de compost de 6,74. En este último se encuentran extremos bien reconocidos; así tenemos la cepa LMT-059 con un pH de 6,1 y la cepa LMT-065 con un pH de 7,9. En el primer caso se obtuvo un porcentaje de degradación del 85,9 %, encontrándose dentro del intervalo de los mejores degradadores. En el segundo caso presentó un 67,37 % de degradación de limonina. El pH final obtenido con la cepa LMT-059, permite afirmar que la limonina fue degradada como tal durante todo el tiempo de incubación, no ocurriendo así con la cepa LMT-065; hasta un momento determinado pudo degradar la limonina, para luego inhibirse la enzima (o enzimas). Esto pudo deberse a que la limonina cambió a limonoato de sodio por efecto del pH y probablemente el microorganismo no podría haber estado preparado enzimáticamente para la degradación de esta sal orgánica.

Otro punto destacable entre los microorganismos que degradaron significativamente a la limonina es de que ésta fue degradado a un compuesto estable, reflejado en el hecho de que existe una cantidad faltante de limonina; de otra manera, el nuevo compuesto producido hubiera retornado al triterpenoide original al realizar el pre tratamiento correspondiente a la muestra del caldo “agotado” para la cuantificación de la limonina. No se descarta la posibilidad de que en el caso del resto de cepas aisladas y que tuvieron porcentajes de degradación menores, hubiera ocurrido esto. Similarmente, Hasegawa¹⁷, atribuye a la formación de limonol en lugar de 17 – deshidrolimonoato lactona de anillo A lactona, la poca efectividad y estabilidad obtenida con células de *Corynebacterium fascians* inmovilizadas en gel de acrilamida.

En esta segunda selección se puede validar los resultados obtenidos en la primera; así en el tabla 3 podemos observar que las 11 mejores cepas tuvieron un crecimiento moderado y abundante; las cepas que mejor degradaron la limonina no fueron necesariamente las que crecieron en forma abundante, pero existe una tendencia a esto; así se puede observar que 6 cepas de las 11 seleccionadas presentan un crecimiento abundante.

De esta manera, el número de cepas cuyo porcentaje de degradación se encontraron entre 83,69 y 89,64 % fue de 11, encontrándose una desviación estándar significativa de 1,743 y un C.V. del 2%, significando que estas cepas pueden estar representadas por su media 86,87; de esta manera fueron escogidas para la tercera selección.

Los resultados obtenidos en la tercera selección se presentan en el tabla 4. Como se puede observar, todas las cepas que pasaron a esta selección fueron del compost.

Una característica general de todo este grupo seleccionado es la falta de producción de indol, la reducción de nitrato a nitrito, así como también la falta de producción de ácido sulfhídrico. Adicionalmente, en forma general, excepto por la cepa LMT-62, todos responden en forma positiva a la tinción según Gram.

Las cepas LMT 45, 50, 60 y 69 presentaron reacción positiva a la prueba de la oxidasa, presentando como último aceptor de iones hidrógeno al oxígeno. Sin embargo, todas las cepas reducen nitrato a nitrito; esto podría llevar a pensar que se trata de microorganismos que en ausencia o baja concentración de oxígeno, pueden utilizar como último aceptor de iones hidrógeno al nitrato u otro compuesto aniónico. Por otro lado, generalmente, los microorganismos que presentan actividad de oxidasa, también pueden degradar peróxido de hidrógeno; esto debido a que si el último aceptor es el oxígeno, podría formarse este compuesto, siendo altamente tóxico para el microorganismo, como lo menciona Mac Faddin¹¹.

Tabla 4: Caracterización bioquímica de los microorganismos

Cepa LMT	Oxi	Glu	Lis	H ₂ S	Cit	I	Ni	Mo	NaCN	Medio Kligler	Respuesta a tinción Gram	% Degradación
43	-	Deg	+	-	+	-	+	-	Crec	Deg de Glu y Lac	+	88,64
45	+	Deg	+	-	+	-	+	+	Crec	Deg de Glu	+	83,79
47	-	Deg	+	-	+	-	+	-	Crec	Deg de Glu y Lac	+	89,64
50	+	Deg	+	-	+	-	+	+	Crec	Deg de Glu	+	85,74
53	-	Deg	+	-	+	-	+	-	Crec	Deg de Glu y Lac	+	88,89
56	-	Deg	+	-	+	-	+	-	Crec	Deg de Glu y Lac	+	87,90
57	-	Deg	+	-	+	-	+	-	Crec	Deg de Glu y Lac	+	85,78
59	-	No Deg	-	-	±	-	+	-	No Crec	No Deg de Glu ni Lac	+	85,90
60	+	Deg	+	-	+	-	+	+	Crec	Deg de Glu	+	85,65
62	-	Deg	-	-	+	-	+	+	Crec	Deg de Glu	-	86,65
69	+	Deg	-	-	+	-	+	-	Crec	No Deg de Glu ni Lac	+	86,98

(Deg): degradación, **(Crec):** crecimiento, **(Glu):** glucosa, **(Lac):** lactosa, **(±):** crecimiento lento

Con respecto a la motilidad de los microorganismos, sólo las cepas LMT 45, 50, 60 y 62 presentaron dicha cualidad.

Las cepas LMT 59, 62 y 69 no descarboxilaron lisina, es decir no formaron cadaverina; esta característica es importante desde el punto de vista práctico, porque para un uso comercial futuro, la formación de esta diamina sería desagradable para su presentación debido al olor característico que presenta. Por otro lado, esta característica es común en algunas bacterias de carácter patógeno.

Con respecto a la utilización de citrato, todas las cepas presentaron un crecimiento marcado, excepto la cepa LMT – 59, la cual se caracterizó por un crecimiento lento, siendo necesario hasta 48 horas para la determinación del crecimiento en citrato.

Sólo la cepa LMT – 59 presentó susceptibilidad al cianuro (CN⁻), no presentó turbidez a las 24 horas de incubación, como sí lo demostraron el resto de cepas.

Con respecto a la degradación de azúcares evaluados en el medio Kligler, las cepas LMT 43, 47, 53, 56 y 57 degradaron la glucosa y lactosa. Las cepas 45, 50, 60 y 62 degradaron sólo glucosa y sólo la cepa LMT 59 no lo hizo.

Un caso especial constituye la cepa LMT – 69, la cual degradó la glucosa en el medio Hugh y Leifson para azúcares, pero no lo hizo en el medio Kligler, igualmente no degradó lactosa en este último medio. En forma similar, Hasegawa⁷, reportó el aislamiento de una bacteria del género *Pseudomonas sp.*, la cual no degradó azúcares en el medio Hugh y Leifson, pero sí muy débilmente, la glucosa, en el medio sensitivo de Dye.

Esta caracterización es, tal vez, la más importante entre las que se han realizado. Para una degradación óptima de la limonina se requiere una cepa cuya capacidad de degradación sea, en el mejor de los casos, exclusiva. Si el microorganismo consume además de limonina, otra fuente de carbono como la glucosa, es muy probable que la ruta metabólica que emplee para la degradación del triterpenoide sea alternativa; y si ambas fuentes de carbono están presentes en el medio, consumirá probablemente la fuentes de carbono que sea afin con su ruta metabólica principal; en este caso, la ruta metabólica en la mayoría de las cepas sería la Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), para la degradación de glucosa.

Hasegawa⁹ reportó que tanto *Arthrobacter globiformis* y *Bacterium* 342 – 152 – 1, forman un complejo estable entre la limonoato deshidrogenasa y su sustrato (limonoato); la *Pseudomonas sp.* aislado en 1974, no forma este tipo de complejo, en este microorganismo el metabolismo de limonoides juega un papel mucho menor, mientras que en *Arthrobacter globiformis* y *Bacterium* 342 – 152 – 1, la limonoato deshidrogenasa aparentemente juega un rol en un sistema regulatorio enzimático, el cual controla el metabolismo de limonoides.

Una cepa con un sistema metabólico capaz de degradar limonina como principal fuente de carbono sería más conveniente para fines de una aplicación futura al zumo de naranja, en donde otras fuentes de carbono están presentes; así la cepa LMT – 59 estaría en mejor condición de metabolizar la limonina por la afinidad que tiene en su degradación mas no de glucosa ni lactosa. Similarmente, Hasegawa reportó que la *Pseudomonas sp.* que aisló, no degradó azúcares, pero sí limonoato de sodio. Sin embargo, el mismo autor, aisló la bacteria *Corynebacterium fascians*, la cual creciendo en medios de cultivo con fuentes de carbono azucarados y llevándolo posteriormente al zumo de naranja, degradó limonina sin alterar significativamente la composición azucarada ni de algunos ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, cítrico y málico del zumo de naranja⁸.

De otro lado, se realizó un análisis estadístico con los resultados obtenidos de las 11 cepas, para determinar cuales presentan diferencias significativas. El resultado de esta prueba se observa en el tabla 5; presentando diferencia significativa las cepas LMT – 47 y LMT – 53 con respecto a la cepa LMT – 45. Esta diferencia permite afirmar, que siendo los porcentajes más altos de degradación de limonina los que presentan las cepas 47 y 53, se diferencian del resto de cepas. Sin embargo, las cepas que presentan la misma letra, presentarán porcentajes de degradación similares, pero cuyas diferencias con respecto al resto no son significativas.

Tabla 5: Prueba estadística de tukey

Cepa No.	% Degradación	Presentación de la significancia
LMT- 47	89,64	a
LMT- 53	88,89	a b
LMT- 43	88,64	a b c
LMT- 56	87,90	a b c d
LMT- 69	86,98	a b c d e
LMT- 62	86,65	a b c d e f
LMT- 59	85,90	a b c d e f g
LMT- 57	85,78	a b c d e f g h
LMT- 50	85,74	a b c d e f g h i
LMT- 60	85,65	a b c d e f g h i j
LMT- 45	83,79	c d e f g h i j

Nivel de significancia; 95%

En un primer momento, se puede especular que las cepas LMT – 47 y LMT – 53, representan el punto culminante en la obtención del objetivo principal de la investigación pero como se ha visto anteriormente, estas cepas se caracterizan por la descarboxilación de la lisina generadora de malos olores. Sin embargo, la descarboxilasa es adaptada o inducida bajo ciertas condiciones de crecimiento del microorganismo; característica que los hace objeto de estudio para futuras investigaciones.

Considerando la capacidad de los microorganismos para degradar limonina y las condiciones en las cuales fue desarrollada la investigación, se pudo observar en esta tercera selección, dos grupos bien definidos: aquellos microorganismos que descarboxilan lisina y aquellos que no lo hacen. En el primer grupo, se encuentran las cepas LMT 43, 45, 47, 50, 53, 56, 57 y 60, las cuales todas degradan glucosa; y en el segundo grupo se encuentran las cepas LMT 59, 62 y 69, de las cuales sólo la cepa LMT – 59 se comporta como D-glucosa y lactosa negativos. En este grupo se encontró una excepción, la cepa LMT- 69, la cual no degradó ni glucosa ni lactosa en el medio Kligler, pero sí degradó glucosa en el medio Hugh y Leifson para carbohidratos.

Aunque las 11 cepas que pasaron a esta tercera selección tuvieron un alto porcentaje de degradación de limonina, la cepa LMT – 59 es la que mejor encierra el concepto de exclusividad en la degradación del triterpenoide seguido de la cepa LMT – 69 para las condiciones de investigación desarrolladas.

De esta investigación se reporta a la cepa LMT – 59 y LMT – 69 como microorganismos degradadores de limonina a pH 6,0, en condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES

- La metodología desarrollada para el aislamiento de microorganismos, basada en el crecimiento sobre agar limonina y teniendo al agar agua y al agar MSM como blancos, es eficiente y de bajo costo.
- Las metodologías empleadas para las selecciones de los microorganismos, basadas en la densidad de crecimiento (primera selección) y porcentaje de degradación de limonina (segunda selección) permitieron separarlos según su comportamiento frente al pH ácido (6,0) y su respuesta a la limonina como fuente de carbono. Asimismo, la caracterización bioquímica desarrollada en la tercera selección permitió aceptar u objetar algunas cepas seleccionadas.
- La primera selección permitió obtener 48 microorganismos potenciales degradadores de limonina. En la segunda selección se obtuvieron 11 cepas que se destacaron como las que más degradaron el triterpenoide.
- En la tercera selección destacaron las cepas LMT-59 y LMT-69 quienes presentaron un alto porcentaje de degradación de limonina y reunieron las mejores características en la utilización de fuentes de carbono; glucosa(-), lactosa(-) y citrato(+).
- Las cepas LMT-47 y LMT-53 presentaron los mayores porcentajes de degradación 89,64% y 88,89%, respectivamente.
- El compost constituyó el sustrato más apropiado para el aislamiento de microorganismos degradadores de limonina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a los Departamentos de Biología y de Química de la Universidad Nacional Agraria La Molina por su aporte en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Marwaha, S.; M. Puri; M. Bhullar y R. Kothari. 1994. Optimization of parameters for hydrolysis of limonin for debittering of Kinnow mandarin juice by *Rhodococcus fascians*. *Enz. Microb. Technol.* 16: 723-725.
2. Cánovas, M. y J. Iborra. 2003. Culture collections and biochemistry. *I. Microbiol.* 6: 105-112.
3. Shaw, P.; L. Baines; B. Milnes, y G. Agmon. 2000. Commercial debittering processes to upgrade quality of citrus juice products. ACS Symposium series 2000, 758 citrus limonoids, 120–131.
4. Singh, S.; R. Jain; A. Gupta y A. Dhatt. 2003. Debittering of Citrus juices – A Review. *J. Food Sc. Technol.* 40(3): 247-253
5. Khalil, A.; T. Galal y A. Khalid. 2003. Limonoids from *Citrus* reticulate Z. *Naturforsch.* 58: 165-170.
6. Hasegawa, S.; L. Brewster y V. Maier. 1973. Use of limonoate dehydrogenase of *Arthrobacter globiformis* for the prevention or removal of limonin bitterness in *Citrus* products. *J. Food Sci.* 38 : 1153-1155.
7. Hasegawa, S.; V. Maier y A. Jr. King. 1974c. Isolation of new limonoate dehydrogenase from *Pseudomonas*. *J. Agric. Food Chem.* 22 : 523.
8. Hasegawa, S.; C. Vandercook; G. Choi; Z. Heuman y P. OU 1985. Limonoid debittering of *Citrus* juice sera by immobilized cells of *Corynebacterium fascians*. *J. Food Sci.* 50 : 330-332.
9. Hasegawa, S. y V. Maier. 1983. Solutions to the limonin bitterness problem of Citrus juices. *Food Technology.* 37 (6) : 73 - 77.
10. Vaks, B.; Lifshitz, A. 1981. Debittering of Orange juice by bacteria which degrade limonin. *J. Agric. Food Chem.* 29 : 1258-1261.
11. Mac Faddin, J. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Ed. Williams & Wilkins. Second edition. London. 527 pp.
12. Cánovas, M.; L. García-Cases y J. Iborra. 1998. Limonin consumption at acidic pH values and absence of aeration by *Rhodococcus jkscians* cells in batch and immobilized continuous systems. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 111-116.
13. Puri, M.; L. Kaur y S. Marwaha. 2002. Partial purification and characterization of limonoate dehydrogenase from *Rhodococcus fascians* for the degradation of limonin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(4): 669-673.
14. Champagne, D.; Koul, O.; Isman, M.; Scudder, G. y Towers, G. 1992. Biological activity limonoids from Rutales. *Phytochemistry* 31, 377-394.
15. Jayaprakasha, G.; R. Singh; J. Pereira y K. Sakariah. 1997. Limonoids from *Citrus* reticulata and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, 44(5): 843-846.
16. Mandadi, K.; Jayaprakasha, G.; Bhat, N. y Patil, B. 2007. Red Mexican Grapefruit: A novel source for bioactive limonoids and their antioxidant activity. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 62: 179-188.
17. Hasegawa, S.; M. Patel y R. Snyder. 1982. Reduction of limonin bitterness in navel orange juice serum with bacterial cells immobilized in acrylamide gel. *J. Agric. Food Chem.* 30: 509.
18. Myns E. y A. Wiaux. 1966. Biología de los Hidrocarburos. Fac. Sci. Agron. Univ. Heverlec.