



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA:

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BACTERIAS AISLADAS DE VAINAS
DE *V. planifolia* Jacks. ex Andrews EN PROCESOS ASOCIADOS A LA
PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

MC. ESMERALDA ESCOBAR MUCIÑO

DIRECTORAS DE TESIS:

DC. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ

DC. MARÍA LORENA LUNA GUEVARA

PUEBLA, PUE., MÉXICO

FEBRERO, 2020



BUAP

Puebla, Pue. a 5 de diciembre 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

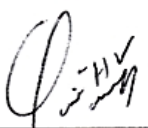
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Esmeralda Escobar Muciño**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio del comportamiento de bacterias aisladas de vainas de *V. planifolia* Jacks. ex Andrews en procesos asociados a la producción de compuestos aromáticos”

A nuestro juicio, la alumna **Esmeralda Escobar Muciño** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

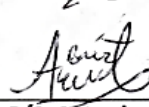
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Verónica Quintero Hernández


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. Luis Javier Martínez Morales


D.C. Antonino Baez Rogelio


D.C. Claudia F. Martínez de la Peña


D.C. María Elena Ramos Cassellis

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia por brindarme su apoyo, cariño y cuidados.

A mis amigos.

A las directoras de tesis: DC. María Lorena Luna Guevara (Colegio de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química) y DC. Margarita María de la Paz Arenas Hernández (Laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana, CICM, BUAP), por aceptarme como su estudiante de doctorado, por brindarme de su tiempo y por apoyarme en la culminación de mi tesis de doctorado.

Al comité tutorial: Al DC. Miguel Castañeda-Lucio (Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, CICM, BUAP), al DC. Luis Javier Martínez Morales (Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero, CICM, BUAP), al DC. Antonino Baez y a la DC. Verónica Quintero-Hernández (Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, CICM, BUAP), a la DC. Claudia Fabiola Martínez de la Peña (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, CICM, BUAP), A la DC. María Elena Ramos Cassellis (Colegio de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química) y al DC. Genaro Gustavo Amador Espejo (Instituto Politécnico Nacional, Mexico (IPN)) por sus comentarios, recomendaciones durante los seminarios, tutorales de tesis y por su valiosa contribución en la revisión del manuscrito de mi tesis y de la publicación que acredito el grado académico.

Finalmente, a las personas con los cuales interactué, que me ayudaron a crecer como persona, a comprender aspectos importantes de la ciencia y de la vida, sobre mi formación como estudiante de doctorado y a no caer en desesperanza sobre todo cuando se presentan tiempos difíciles y lo más importante a tener confianza en lo que hago y aunque el camino aun sea largo, continuar luchando por todos mis sueños científicos y de vida.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En este apartado expreso mi gratitud al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP-Microbiología), por permitirme ingresar y concluir el Posgrado.

Un agradecimiento especial al CONACYT por el apoyo brindado al otorgarme la beca de doctorado durante la realización del presente trabajo (Beca No. 40696).

Al Colegio de Ingeniería de Alimentos de la BUAP (Facultad de Ingeniería Química) y al ICUAP-Microbiología, por contribuir con el financiamiento de la presente tesis.

Índice de contenido

Abreviaturas.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCION.....	13
Vainilla (<i>V. planifolia</i>).....	13
El curado de la vainilla.....	14
Producción de los CAs durante el proceso del curado de las vainas de vainilla.....	15
La contribución de los microorganismos durante el curado de la vainilla.....	17
Actividad pectinolítica (AP).....	18
Las enzimas pectinolíticas en las bacterias Gram negativas.....	19
Mecanismo de las enzimas poligalacturonasa (PGs) en las bacterias Gram negativas.....	20
Los microorganismos aislados durante el proceso del curado de <i>Vanilla planifolia</i>	20
La bioconversión del ácido ferúlico a compuestos aromáticos en bacterias.....	20
La bioconversión a compuestos aromáticos a partir de los derivados de plantas.....	21
Genes involucrados en la bioconversión a los compuestos aromáticos.....	22
Resistencia a los compuestos aromáticos en las bacterias Gram negativas.....	24
Regulación de los procesos bacterianos.....	26
El mecanismo del <i>Quorum Sensing</i> (QS).....	27
La clasificación y las funciones de los autoinductores.....	27
La familia de las Acil Homoserina Lactonas (AHLS) o del Autoinductor-1.....	28
Los biosensores del AI-1.....	30
El sistema QS de un solo componente en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
El sistema QS en el género <i>Enterobacter</i> y <i>Citrobacter</i>	32
Los procesos regulados por el QS en bacterias Gram negativas.....	33
Relación del QS con la producción de enzimas pectinolíticas en las bacterias Gram negativas.....	33
Relación del QS, bioconversión del AF y la resistencia a los CAs en las bacterias Gram negativas.....	34
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	34
Aislamiento de los microorganismos del proceso del curado de <i>V. planifolia</i>	34
Procesos involucrados en la producción de compuestos aromáticos en las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	34
Actividad pectinolítica.....	34
Producción del ácido vanílico.....	35
Resistencia a los compuestos aromáticos.....	36
Cuantificación de las moléculas autoinductoras.....	36
Mecanismos QS y procesos bacterianos relacionados con la producción de los CAs.....	36
Justificación.....	37
Hipótesis.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos particulares y específicos.....	37
ESQUEMA DE TRABAJO.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Material vegetal.....	40
Aislamiento e identificación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	40
Evaluación de procesos involucrados en la producción de los compuestos aromáticos (CAs).....	40
Actividad pectinolítica (AP).....	41
Producción de enzimas poligalacturonasas (PGsa).....	42
Medición de la actividad enzimática.....	42
Bioconversión del ácido ferúlico a los CAs.....	42
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	43

Determinación de los grupos funcionales del AV y la C ₈ -AHL por espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	44
Determinación de la resistencia a los CAs	44
Cuantificación de la producción del autoinductor-1 de los microorganismos de estudio	45
Lisado libre de células del microorganismo reportero <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pCF218) (pCF372).....	45
Extractos del autoinductor-1 (Acil Homoserina Lactonas, AHLS).....	45
Detección de AHLS por bioensayo.....	46
Análisis de datos.....	46
RESULTADOS	46
Aislamiento y selección de las cepas bacterianas Gram positivas de las vainas de vainilla durante las etapas del curado.	46
Búsqueda de la actividad pectinolítica (AP) en el género <i>Bacillus</i>	51
Actividad pectinolítica en los aislados de <i>Bacillus</i>	51
Asimilación del ácido ferúlico (AAF) en el género <i>Bacillus</i>	53
Identificación y cuantificación por HPLC del ácido vanílico en el género <i>Bacillus</i>	55
Aislamiento y selección de las bacterias Gram negativas provenientes de las diferentes etapas del proceso del curado de <i>V. planifolia</i>	55
Identificación de las bacterias Gram negativas por pruebas bioquímicas, VITEK y confirmación del género y especie por secuenciación parcial del gen 16S del rRNA	56
Procesos relacionados con la producción de compuestos aromáticos	59
Determinación de la actividad pectinolítica (AP).....	59
La asimilación del ácido ferúlico (AAF) por método de goteo.....	62
Producción e identificación del ácido vanílico (AV) por HPLC.....	63
Identificación de los grupos funcionales del AV por metodología FTIR.....	64
La resistencia a los compuestos aromáticos (CAs)	65
Producción, cuantificación e identificación de grupos funcionales de moléculas autoinductoras en las bacterias Gram negativas aisladas de <i>V. planifolia</i>	66
El contenido total de la producción de las AHLS en las bacterias Gram negativas.....	66
Identificación y cuantificación de la producción de la C ₈ -AHL por método HPLC.....	68
Identificación de los grupos funcionales de la C ₈ -AHL por FTIR en bacterias Gram negativas.....	69
Identificación de las AHLS por métodos colorimétricos: biosensor e hidroxilamina-hierro.....	71
Monitoreo de la actividad poligalacturonasa (PGsa) y el efecto de la C ₈ -AHL en <i>P. aeruginosa</i> IFVB.....	72
El efecto de la C ₈ -AHL en la producción del AV en las bacterias Gram negativas	73
Producción del AV en las interacciones de las cepas Gram negativas.....	75
Identificación por FTIR de los grupos funcionales del AV en las interacciones de las bacterias Gram negativas.....	77
DISCUSIÓN	78
Aislamiento y selección de las cepas Gram positivas de las vainas de vainilla en las etapas del curado.....	78
Actividad pectinolítica.....	79
La bioconversión de AF a los CAs	79
Aislamiento y selección de las cepas bacterianas Gram negativas de las vainas de vainilla durante las etapas del curado.....	80
Actividad pectinolítica.....	81
Bioconversión del AF a los CAs.....	84
Resistencia a los compuestos aromáticos (CAs).....	84
Cuantificación del AI-1 en las bacterias Gram negativas.....	85
Método colorimétrico.....	85
Producción de las AHLS en las bacterias Gram negativas.....	86
Identificación de los grupos funcionales de la C ₈ -AHL por FTIR.....	87
Degradación de la C ₈ -AHL en las bacterias Gram negativas.....	87

Cuantificación del autoinductor y la actividad poligalacturonasa (APGs) en <i>P. aeruginosa</i> IFVB.....	90
Efecto de la C ₈ -AHL en la actividad poligalacturonasa (APGs) en <i>P. aeruginosa</i> IFVB.....	89
Modelo propuesto de la APGs y QS en <i>P. aeruginosa</i> IFVB.....	89
Efecto de la C ₈ -AHL en la producción del AV de las bacterias Gram negativas.....	92
Producción del AV durante las interacciones bacterianas.....	93
Interacción I: <i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>C. amalonaticus</i> IFVB.....	93
Interacción II: <i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>E. cloacae</i> IFVB.....	93
Identificación de los grupos funcionales del AV identificados por la metodología FTIR en los experimentos individuales e interacciones	94
CONCLUSIONES.....	94
PERSPECTIVAS	95
REFERENCIAS	96
ANEXO.....	105

Índice de figuras

Figura 1. El proceso del curado de <i>V. planifolia</i>	13
Figura 2. Los principales CAs producidos durante las diferentes etapas del proceso del curado..	14
Figura 3. Ruta metabólica de la bioconversión de los CAs en el género <i>Pseudomonas</i>	18
Figura 4. Principales familias de enzimas pectinolíticas y el sistema de transporte en las bacterias Gram negativas. Modelo basado en las enzimas degradadoras de la pared celular descritas en las bacterias Gram negativas como <i>Pectobacterium</i> , el modelo más estudiado en el ámbito.....	19
Figura 5 (A) Los sistemas de transporte de los CAS derivados de la lignina hacia el exterior de la célula vegetal. (B) La incorporación del compuesto aromático 4-PHB en un sistema bacteriano transportador del tipo MFS y un modelo de quimiotaxis en respuesta al compuesto aromático.....	22
Figura 6. La degradación de los CAs derivados de la lignina en microorganismos implicados en la bioconversión de los monoarilos (AF) a los CAs (la vainillina o el AV).....	23
Figura 7. Mecanismos de acción de los aceites esenciales en las bacterias Gram negativas.....	25
Figura 8. Mecanismo de resistencia y las enzimas implicadas en el mecanismo de degradación de los CAs en las bacterias Gram negativas.....	26
Figura 9. La estructura química de las familias de los autoinductores. AIP (autoinductor peptídico familias 1, 2, 3 y 4).....	28
Figura 10. La ruta bioquímica de la síntesis de las AHLs en las bacterias Gram negativas.....	29
Figura 11. El mecanismo del QS en las bacterias Gram negativas en la familia de las acil homoserina lactonas “AHLs” (esferas negras), dependiente del sistema LuxI/LuxR en el modelo de <i>Vibrio fischeri</i>	30
Figura 12. El sistema canónico del QS y algunos factores de virulencia activados por los reguladores LasR y RhIR en presencia de las moléculas autoinductoras: C ₄ -AHL y C ₁₂ -AHL.....	32
Figura 13. Identificación por morfología colonial de los géneros <i>B. subtilis</i> IFVB (A) y <i>B. cereus</i> IFVB (B) en medio MYP.....	51
Figura 14. Selección de microorganismos por tamiz de la AP en placa Petri de agar MM-P del sobrenadante por el método de goteo de los aislados de <i>Bacillus subtilis</i> obtenidos de las diferentes etapas del proceso del curado de la vainillina.....	52
Figura 15. Prueba de actividad pectinolítica en placa petri de agar MM-P de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas de <i>V. planifolia</i>	52
Figura 16. Selección de microorganismos <i>Bacillus cereus</i>	53
Figura 17. Prueba de confirmación de la asimilación del ácido ferúlico (AAF) en placa Petri de agar MM-VP de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas de <i>V. planifolia</i>	54
Figura 18. Cromatograma representativo de la producción de AV del AF	55

Figura 19. Selección de microorganismo por tamiz de la AP en placa Petri de agar MM-P del sobrenadante de 16 bacterias Gram negativas aisladas de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla por el método de goteo.	56
Figura 20. (A) Electroforésis en gel de los productos de PCR del gen 16S rRNA de las tres cepas Gram negativas aisladas del proceso del curado de <i>V. planifolia</i>	58
Figura 21. La determinación de la actividad pectinolítica (AP) en placa Petri de agar MM-P de las bacterias Gram negativas aisladas de las vainas de vainilla.	59
Figura 22. El diámetro de AP (cm) obtenido del pellet y el sobrenadante, por los métodos de goteo y pozo en placa Petri de agar MM-P.	60
Figura 23. Determinación de la APG por método DNS de las cepas Gram negativas aisladas del proceso del curado de las vainas de vainilla.	61
Figura 24. Selección de microorganismos Gram negativos por tamiz de la AAF en placa Petri de agar MM-VP por el método de goteo usando extractos proteicos de las bacterias Gram negativas obtenidas de las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla.	62
Figura 25. Determinación de la AAF de las cepas Gram negativas por el método de pozo en placa Petri de agar MM-VP.	63
Figura 26 (A) Cromatogramas del estándar de AV, AF y la producción del AV en <i>P. aeruginosa</i> IFVB, <i>E. cloacae</i> IFVB y <i>C. amalonaticus</i> IFVB (cultivos individuales) y (B) Curvas de crecimiento de las cepas Gram negativas.	64
Figura 27. La identificación de los grupos funcionales del AV por la técnica FTIR en las bacterias Gram negativas.	65
Figura 28. Curva de calibración del estandar C ₈ -AHL.	67
Figura 29. Determinación del índice de inducción de la β-galactosidasa (ID) por el biosensor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pCF218) (pCF372) en respuesta a las AHLs producidas por las bacterias Gram negativas aisladas del curado de <i>V. planifolia</i>	67
Figura 30. Cromatogramas de la producción de la molécula autoinductora C ₈ -AHL.	68
Figura 31. Identificación por FTIR de los grupos funcionales de la C ₈ -AHL de las 3 bacterias Gram negativas.	69
Figura 32. Cromatogramas de la degradación de la molécula autoinductora C ₈ -AHL.	70
Figura 33. Cuantificación de las AHLs en <i>P. aeruginosa</i> IFVB por el biosensor <i>A. tumefaciens</i> cepa NTL4 (pCF218) (pCF372).	71
Figura 34. Determinación de los grupos funcionales del AI-1 por el método de hidroxilamina-hierro.	72
Figura 35. Actividad PGsa en <i>P. aeruginosa</i> IFVB.	72
Figura 36. Efecto de la C ₈ -AHL en la PGsa de <i>P. aeruginosa</i> IFVB.	73
Figura 37. Cromatograma del efecto de la C ₈ -AHL en la producción del AV y la degradación del AF en las bacterias Gram negativas aisladas del sistema del curado de la vainilla.	74
Figura 38. Cromatograma de la bioconversión del AF a compuestos aromáticos.	76
Figura 39. Identificación por FT-IR de los grupos funcionales del AV en las interacciones de <i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>E. cloacae</i> IFVB (Interacción I) y <i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>C. amalonaticus</i> IFVB (Interacción II).	78
Figura 40. Sistema canónico del QS en <i>P. aeruginosa</i> cuando producen las moléculas C ₄ -AHL y C ₁₂ -AHL.	91
Figura 41. Modelo teórico del QS en <i>P. aeruginosa</i> cuando se satura con 1μM de la C ₈ -AHL (círculos dobles en azul) y su efecto en la actividad pectinolítica (En un sistema canónico regulado por QscR).	92

Índice de tablas

Tabla 1. Los compuestos aromáticos identificados durante el proceso del curado de las vainas de <i>V. planifolia</i>	15
Tabla 2. Los compuestos aromáticos presentes en las vainas de <i>V. planifolia</i> en el inicio, durante y fin del proceso del curado	17
Tabla 3. Sustratos y genes implicados en la bioconversión a los CAs obtenidos de la pared celular de plantas .	24
Tabla 4. Métodos y condiciones de estudio en la evaluación de los procesos involucrados en la producción de los CAs por las bacterias Gram negativas aisladas a partir de vainas de vainilla.....	41
Tabla 5. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género <i>Bacillus</i> en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de goteo).....	47
Tabla 6. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género <i>Bacillus</i> en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de pozo).....	49
Tabla 7. Promedio de los índices de actividad pectinolítica (IAP) a partir de extractos proteicos de las cepas de <i>Bacillus</i> aisladas de las diferentes etapas del curado de <i>V. planifolia</i>	53
Tabla 8. Promedio de los índices de asimilación del ácido ferúlico (IAAF) en cepas del género <i>Bacillus sp</i> aisladas de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla	54
Tabla 9. El índice de actividad pectinolítica (IAP) fue evaluado por los métodos de goteo y pozo en placa Petri de agar MM-P de las bacterias Gram negativas aisladas de las vainas de vainilla.....	61
Tabla 10. Mínima Concentración Inhibitoria (CMI) a los CAs en las bacterias aisladas de las vainas de vainilla.	66
Tabla 11. El rendimiento y la productividad del ácido vanílico (AV) del sustrato ácido ferúlico (AF) en las bacterias Gram negativas a 12 h de monitoreo.....	75
Tabla 12. Producción, rendimiento y productividad del ácido vanílico (AV) y la vainillina (V) del sustrato ácido ferúlico (AF) en las bacterias Gram negativas a 12 h de monitoreo	77
Tabla 13. Familia de superreguladores del QS en el género <i>Pseudomonas</i>	90

ABREVIATURAS

APG: Ácido Poligalacturónico
CAs: Compuestos aromáticos
AF: Ácido ferúlico
AV: Ácido vanílico
IFVB: Aislado de las vainas de vainilla
PemA: Pectin metil estearasa A
PemB: Pectin metil estearasa B
PehX: Endopoligalacturonasa
PgA: Poligalacturonasa
PelA: Pectinasa de la familia pectato liasa A
PelB: Pectinasa de la familia pectato liasa B
PelC: Pectinasa de la familia pectato liasa C
PelD: Pectinasa de la familia pectato liasa D
PelE: Pectinasa de la familia pectato liasa E
PelL: Pectinasa de la familia pectato liasa L
PelZ: Pectinasa de la familia pectato liasa Z
PelX: Pectinasa de la familia pectato liasa X
KdgM: Transportador de monoarilos de la familia KdgM
TogB: Transportador de monoarilos de la familia TogB
TBDRs: Receptor dependiente de TonB para el transporte activo de moléculas
TonB-ExbB-ExbD: Complejo de proteínas transportadoras localizado en la membrana interna
TRAP: Transportador periplásmico tripartito independiente de ATP
IT: Transportador de monoarilos de la familia IT
MFS: Superfamilia facilitadora principal involucrada en el transporte de los monoarilos
ABC transporter: Transportadores del tipo ABC con un cassette de unión al ATP
4-PHB: 4-p-hidroxibenzaldehído
PcaK: proteína transportadora de 4-hidroxibenzoato
PcaY: Transportador de la molécula 4-PHB
FerC: Regulador transcripcional involucrado en la bioconversión de ácido ferúlico
MarR: Regulador transcripcional involucrado en la degradación de CAs
LigJABC: Regulador transcripcional de la degradación de lignina a vanilato en presencia de PCA o galato
LigKUI: Regulador transcripcional de la degradación de protocatecolato a galato
LigR: Regulador transcripcional de la degradación de lignina
PCA: Protocatecolato
GA: Ácido gálico
AEs: Aceites esenciales
QS: *Quorum Sensing*
LuxR: Regulador transcripcional de QS
AHL: Acil Homoserina Lactona
AP: Autoinductor peptídico
AI-3: Autoinductor-3
SAM: S-Adenosin-Metionina
Acil-ACP: Proteína acarreadora del grupo acilo
LuxI: Proteína autoinductor sintasa
SdiA: Regulador transcripcional del tipo LuxR Solo
AHB: Ácido hidroxibutírico
AV: Ácido vanílico

ligZ: Enzima de corte del anillo de bifenilo
ligY: Compuesto de meta-escisión OH-DDVA hidrolasa
ligA: Ligninasa A
ligW: 5-carboxivanillato decarboxilasa
ferB2: Feruloil-CoA hidratasa/liasa
desB: Ferredoxina que contiene zinc
ligV: Vanillin deshidrogenasa
pinZ: Pinoresinol/lariciresinol reductasa
ligXc: 5,5'-deshidrodivanilato O-desmetilasa ferredoxina reductasa subunidad
phcC: Protocatechuate 3,4-dioxigenasa
phcD: 3-oxoadipate enol-lactonasa 1
desZ: 3-O-metilgalato 3,4-deshidrogenasa
ligXd: 5,5'-deshidrodivanilato O-desmetilasa ferredoxina reductasa subunidad
bzaA: 5-hidroxibenzimidazol sintasa
desV: Deshidrogenasa de derivados de benzaldehído
ligP: β -estearasa
ligL: C α -deshidrogenasa
ligDEFG: operón encargado de la degradación de lignina
ligJABC: operón involucrado en la vía de hidrólisis del PCA
ligR: Regulador transcripcional del tipo LysR en respuesta a las moléculas efectoras PCA y AG
ligKUI: Operón involucrado en la vía de hidrólisis del PCA
ligM: Vanilato/3-O-metilgalato O-desmetilasa
metF: 5,10-Methilene tetrahydrofolato reductasa
ligH: 10-Formiltetrahydrofolato sintetasa
ligW2: 5-Carboxilvanilato decarboxilasa
desA: Siringato O-desmetilasa
ferBA: Feruloil-CoA hidratasa/liasa, Feruloil-CoA sintetasa
ferC: Represor transcripcional del operón *ferBA*

RESUMEN

Vanilla planifolia Jacks ex. Andrews es una orquídea representativa de México, de la cual se extraen algunos compuestos aromáticos (CAs) por medio de un proceso artesanal conocido como el curado de las vainas de vainilla que presentan un cambio de color de verde a café oscuro (chocolate). Mediante dicha técnica es comercializada la vaina como materia prima de la cual se obtiene la vainillina, un edulcorante destacado en la industria alimentaria de todo el mundo. El proceso del curado tiene como objetivo romper la pared celular vegetal de la vaina verde mediante el choque térmico con la finalidad de liberar precursores como el ácido ferúlico (AF), el cual es biotransformado a la vainillina y el ácido vanílico. Mediante una sinergia enzimática del fruto y la microbiota interactuante. El presente estudio se basó en la búsqueda de los microorganismos con potencial a la contribución en la producción del compuesto aromático “ácido vanílico”. Asimismo, se planteó la búsqueda de la relación de los procesos bacterianos relacionados con el *Quorum Sensing* (QS).

La presente investigación se dividió en cuatro etapas:

En la **etapa I**, se aislaron las bacterias Gram positivas y Gram negativas a partir de las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (E1=selección y despezonado, E2=ruptura celular o matado, E3=curado bajo el sol y sudoración sucesiva y E4= clasificación de las vainas por color, flexibilidad y aroma). Las cepas fueron asignadas y registradas con las siglas IFVB (indicando que fueron aisladas de las vainas de vainilla, por sus siglas en inglés).

El género *Bacillus*, se identificó por medio selectivo MYP (Manitol-Yema de Huevo-Polimixina), la morfología colonial en basó en la pigmentación característica de cada una de las colonias aisladas (*B. cereus* IFVB=pigmentación rosa y *B. subtilis* IFVB=pigmentación amarilla). Para este estudio se analizaron 81 cepas Gram positivas, se encontró la actividad enzimática pectinolítica y la capacidad de asimilar el ácido ferúlico (AF) y bioconvertirlo a los compuestos aromáticos (CAs), mediante el ensayo de agar en placa Petri (pozo). Los resultados indicaron que las cepas de *Bacillus* aisladas de la etapa 2 del curado de las vainas de vainilla mostraron mayor índice de actividad pectinolítica (1.15) y de asimilación del ácido ferúlico (1.06). Posteriormente, se seleccionó la cepa *B. subtilis* IFVB de la etapa 2, proveniente de Ayototxco de Guerrero, Puebla y se encontró que la cepa produjo altas concentraciones de AV (63.74 ± 3.69 ppm).

A la par se aislaron las bacterias Gram negativas que en base a las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y la secuenciación parcial del gen 16S rRNA se identificó el género y la especie de los microorganismos que correspondieron a: *P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB. Posteriormente, se evaluaron tres procesos: (1) la producción de enzimas pectinolíticas cuantificadas en índice de actividad pectinolítica (IAP), (2) la bioconversión del AF al AV cuantificado en índice de asimilación de AF pectinolítica (IAA) y (3) la resistencia a los compuestos aromáticos: vainillina, ácido vanílico y 4-p-hidroxibenzaldehído (expresado en concentración mínima inhibitoria, $\mu\text{g/mL}$). En los resultados se encontró que las cepas Gram negativas produjeron enzimas pectinolíticas (Donde *P. aeruginosa* IFVB presentó el más alto IAP de 4.75 ± 0.45 , método por pellet y pozo), hidrolizaron el ácido poligalacturónico (donde *P. aeruginosa* IFVB presentó la actividad poligalacturonasa más alta de 104.11 ± 10.92 U $\cdot\text{mL}^{-1}$), asimilaron el ácido ferúlico (donde *P. aeruginosa* IFVB presentó el más alto IAP de 4.37 ± 0.23 método por pellet y pozo) y lo bioconvirtieron al AV cuantificado por HPLC (donde *E. cloacae* IFVB produjo la más alta concentración de AV, 4.349 ± 0.084 ppm), los grupos funcionales se identificaron por FTIR y correspondientes al grupo hidroxilo (3537 cm^{-1}), metilo (1384 cm^{-1}), ácido carboxílico (1089 cm^{-1}) y anillo aromático (868 cm^{-1}). Finalmente, las cepas mostraron diferentes perfiles de resistencia a los CAs. Los hallazgos corroboran que las tres bacterias evaluadas tienen un papel *in vitro* en la producción de los CAs como el ácido vanílico.

En la **etapa II**, se monitoreó la producción de las AHLs por los métodos: (1) El biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) (método colorimétrico utilizado en la detección de las AHLs) y (2) HPLC (identificación y cuantificación de la octanoil lactona o C₈-AHL) y se identificaron los grupos funcionales de la C₈-AHL mediante FTIR. Los resultados demostraron que las 3 cepas Gram negativas produjeron las AHLs, expresados en índices de inducción (ID) donde la cepa *P. aeruginosa* IFVB presentó el valor más alto de ID (14.91 ± 0.61) y una concentración de C₈-AHL correspondiente a 1.597 nM y una máxima degradación de la C₈-AHL de 100 nM a 7.825 ± 1.619 nM a las 12 h de crecimiento. Además, fue posible la identificación de los grupos funcionales

de la molécula autoinductora que correspondieron al enlace C=O del anillo de lactona (1642 cm^{-1}), los enlaces N=H del grupo amino (1381 cm^{-1}) y C=O de la cadena del acilo (1261 cm^{-1}).

En la **etapa III**, se cuantificó la producción de las enzimas poligalacturonasas (PGs) en la cepa de *P. aeruginosa* IFVB durante los tiempos de monitoreo de 2-28 h. La cuantificación enzimática se llevó a cabo por el método cuantitativo DNS en 2 condiciones de estudio: sin y con el adicionamiento del autoinductor C₈-AHL [$1\mu\text{M}$] al medio de cultivo TSB y se concluyó que la cepa *P. aeruginosa* IFVB hidroliza el sustrato ácido poligalacturónico (APG) mostrando mayor actividad enzimática ($87.57\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) a las 28 h de monitoreo. Posteriormente, se adicionó la C₈-AHL al medio de cultivo (TSB) y se observó un cambio en la actividad enzimática de 0 a $136.01\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ en las primeras 2 h del crecimiento. Observando un aumento de 1.5 veces en comparación con la máxima actividad enzimática sugiriendo una relación con el QS. Por otro lado, bajo las mismas condiciones de estudio (con y sin adicionamiento de C₈-AHL) no fue posible encontrar efecto significativo del adicionamiento de la C₈-AHL (1 mM) en la bioconversión del AF en AV de las cepas Gram negativas durante un tiempo de monitoreo de 12 h.

En la **etapa IV** se evaluó el proceso de bioconversión del AF al AV en las interacciones de los microorganismos Gram negativos (interacción I y II). Donde la mejor combinación fue *P. aeruginosa* IFVB-*E. cloacae* IFVB (1.32 ± 0.186 ppm de AV) cuyos grupos funcionales se corroboraron por FTIR correspondientes al grupo hidroxilo (3324 cm^{-1}), metilo (1376 cm^{-1}), ácido carboxílico (1096 cm^{-1}) y anillo aromático (867 cm^{-1}). En comparación con los inóculos simples la interacción no mostró un aumento en la producción del AV. Por lo que se sugiere proponer técnicas y condiciones que propicien el aumento de la producción de los CAs en las cepas de estudio.

En conclusión, los microorganismos aislados de las diferentes etapas del curado de *V. planifolia* hidrolizaron polisacáridos como el ácido poligalacturónico y la pectina infiriendo la posible liberación de sustratos como el ácido ferúlico, el cual es asimilado por todos los microorganismos de estudio como una fuente de carbono, mediante técnica de pozo. Así mismo, produjeron el AV bajo las condiciones analizadas (cultivos individuales y la interacción bacteriana *P. aeruginosa* IFVB-*C. amalonaticus* IFVB). Finalmente, se sugiere el uso de los microorganismos *B. subtilis* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB en futuros estudios que contribuyan al conocimiento de los procesos bacterianos involucrados en la producción de los compuestos aromáticos característicos de las vainas de vainilla mexicana (*V. planifolia*) y la posible relación de la actividad poligalacturonasa con el mecanismo de QS en *P. aeruginosa* IFVB.

INTRODUCCIÓN

1 Vainilla (*V. planifolia*)

Es una especie cultivada de la cual se obtiene el extracto de vainilla que se utiliza para proporcionar el sabor y el aroma a diversos productos alimenticios, aunque también tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y tabacalera (Luna-Guevara *et al.*, 2016).

El curado de las vainas de vainilla es un proceso que permite la producción de los compuestos aromáticos (CAs) responsables del sabor y el aroma de las vainas de vainilla. En México el proceso del curado de las vainas de vainilla es tradicional, con un estilo artesanal. El proceso del curado de la vainilla lleva de 3 a 5 meses (desde enero-mayo) y consiste en: (i) recepción, (ii) golpeo, (iii) primera clasificación, (iv) matado, (v) sudoración, (vi) colocación, (vii) reposo, (viii) segunda clasificación y (ix) empaquetado (Luna-Guevara *et al.*, 2016). El proceso se resume en la figura 1.



Figura 1. El proceso del curado de *V. planifolia* (Esquema propuesto por Luna-Guevara *et al.*, 2016).

En la especie *V. planifolia*, se han identificado alrededor de 200 compuestos volátiles, incluyendo ácidos, éteres, alcoholes, ésteres, compuestos fenólicos y carbonílicos. De estos compuestos volátiles cuatro fenoles son conocidos como indicadores de la calidad comercial de la vainilla a causa de sus altas concentraciones e importancia en la producción del aroma. Los CAs producidos en las vainas de vainilla son: (1) La vainillina (4-hidroxi-3-

metoxibenzaldehído) (1000 a 20000 ppm), (2) el p-hidroxibenzaldehído (2000 ppm), (3) el ácido vanílico (4-hidroxi-3-metoxibenzoico) (2000 ppm) y (4) el ácido p-hidroxibenzoico (200 ppm), cuyas concentraciones se alcanzan al final del proceso del curado de las vainas de vainilla (Salazar *et al.*, 2012). En la figura 2 se observan las estructuras químicas de los principales compuestos producidos durante el proceso del curado.

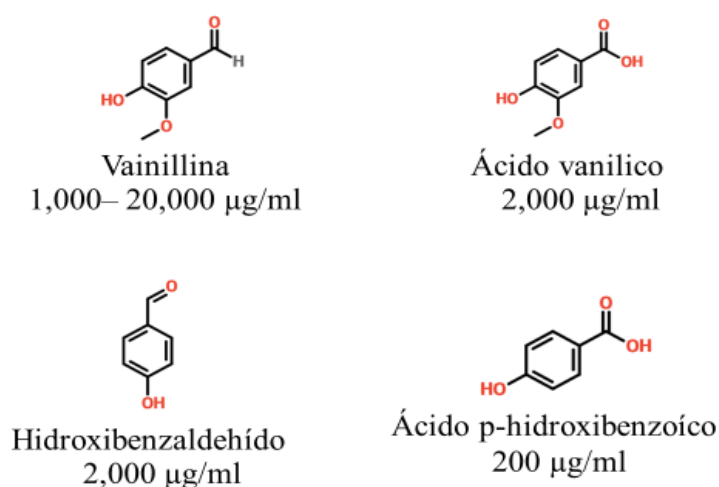


Figura 2. Los principales CAs producidos durante las diferentes etapas del proceso del curado (Hernández-Hernández, 2010).

1.1 El curado de la vainilla

Durante el proceso del curado, las vainas maduras de vainilla empiezan a desarrollar el sabor a vainillina, como resultado de las reacciones enzimáticas que son inducidas en el fruto. El desarrollo del sabor también requiere de un tiempo de reposo de varias semanas el cual es muy laborioso. Cada etapa, durante el proceso del curado tiene un objetivo, que culmina en la producción de los CAs. Durante el escaldado, el objetivo es detener el desarrollo vegetativo en la vaina fresca y el promover la descompartimentalización de la pared celular creando mejores condiciones para el contacto entre los sustratos y sus enzimas respectivas. De esta manera, los precursores de glucósido que están encapsulados catalizan la liberación de la vainillina y otros CAs. También, es muy importante que las mejores condiciones del escaldado o matado que limiten la inactivación de las enzimas nativas de las vainas. El protocolo más común del matado de las vainas de vainilla es el tratamiento térmico, que incluye un protocolo de exposición bajo el sol con un tiempo de tratamiento o bien con horno o en agua caliente a temperatura controlada

(Pardio *et al.*, 2009). La vainilla es el principal producto derivado de las vainas de *V. planifolia* y se obtiene mediante una reacción de etanolisis (Pardio *et al.*, 2009).

1.2 Producción de los CAs durante el proceso del curado de las vainas de vainilla

Las vainas verdes de *V. planifolia* se someten al proceso del curado tradicional en México. El aroma de las vainas curadas es bastante complejo y se reportan más de cien compuestos volátiles que contribuyen al perfil aromático. La mayoría de los sustratos utilizados para la producción de los CAs no están presentes en las vainas verdes o se presentan como conjugados glicosídicos (que son inodoros). Estos son sustratos utilizados en la bioconversión a los CAs por medio de las enzimas que son liberadas por la compartimentación celular debido a la ruptura de la pared celular en los pasos de escaldado y sudado durante el curado (Röling *et al.*, 2001 y Silva *et al.*, 2011). Los compuestos volátiles obtenidos de las vainas de vainilla curada han sido caracterizados mediante cromatografía de gases y análisis de olfatometría. Entre los compuestos producidos se incluyen los derivados de la ruta bioquímica del shikimato (11), ácidos orgánicos (5), aldehídos (4), ésteres (3), cetonas (2) y un alcohol alifático (Pérez-Silva *et al.*, 2006 y Silva *et al.*, 2011).

Tabla 1. Los compuestos aromáticos identificados durante el proceso del curado de las vainas de *V. planifolia*

Compuesto	Número de compuestos caracterizados	Ejemplo
Alifáticos	34	-
Aldehídos	8	1-hexanal 2-heptenal, 2-octanal (E, E) -2,4-heptadienal 1-nonanal (E) -2-decenal (E, Z) -2,4-decadienal (E, E) -2,4-decadienal
Ácidos	12	Ácido fórmico, ácido acético, ácido propenoico, ácido 2-metilpropanoico, ácido isopentanoico, ácido hexanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico ácido esteárico ácido oleico y ácido linoleico
Alcoholes	4	1-octen-3-ol, 2,3-butanediol (iso 1), 2,3-butanediol (iso 2) y 1,2-propandiol
Esteres	3	Éster etílico del ácido butírico, éster etílico del ácido linoleico y éter etílico del ácido linoléico

*Tabla obtenida de Silva *et al.*, (2011).

Tabla 1. Los compuestos aromáticos identificados durante el proceso del curado de las vainas de *V. planifolia* (continuación)

Compuesto	Número de compuestos caracterizados	Ejemplo
Cetonas	1	3-hidroxi-2-butanona
Hidrocarburos	6	Docosan, tricosan, nodecan, tetracosan, pentacosan y heptacosan
Derivados del Shikimato	21	Guaiacol, fenol ácido cinámico y metil ester ácido cinámico
libre y glucosilados	13	Guayacol, fenol ácido cinámico y metil ester ácido cinámico
Compuestos fenólicos y glucosilados	4	Vanillina, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-creosol, alcohol vanílico, alcohol 4-hidroxibencílico, alcohol anisílico, alcohol benzílico, 2-feniletanol, acetilvanilona, ácido salicílico y éster metílico.
Compuestos fenólicos libres	4	3-fenilpropanol, cinnamil alcohol, 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol
Heterocíclicos	2	Furfural-3-etil-4-metil-1H-pirrol-2,5-diona

*Tabla obtenida de Silva *et al.*, (2011).

También, se han caracterizado los CAs producidos en varias etapas del curado, el estudio de Silva *et al.*, 2011 resume los CAs producidos en la etapa inicial, durante y al finalizar el procesado de las vainas de vainilla. Entre los principales componentes se encuentran la vainillina, el ácido vanílico, el 4-hidroxibenzaldehido y el ácido p-hidroxibenzoico (Hernández-Hernández, 2011). En la tabla 1 se resumen los CAs identificados en *V. planifolia* durante el proceso del curado. La tabla 2, resume los 13 principales CAs producidos en las vainas de vainilla, en base a la eficiencia obtenida de la determinación de su concentración en su forma libre o ligada.

Tabla 2. Los compuestos aromáticos presentes en las vainas de *V. planifolia* en el inicio, durante y fin del proceso del curado

Etapas del curado	Compuestos aromáticos
Inicio	Alcohol benzil, 2-fenil etanol, 4 cresol, metil salicilato, 4 alcohol hidroxibenzil, alcohol anisílico, 4-cresol, vainillina, acetovanilona, alcohol vanílico, ácido vanílico y ácido 4-hidroxibenzoico
Durante	Metil salicilato, ácido 4-hidroxibenzoico, 2-fenil etanol, alcohol benzil, alcohol anisil, 4-cresol, ácido vanílico, alcohol vanílico, 4-hidroxibenzaldehído, alcohol 4-hidroxibenzílico y vainillina.
Fin	Ácido vanílico, 4 ácido hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, alcohol anisílico y alcohol vanílico.

*Adaptada de Silva *et al.*, 2011.

1.3 La contribución de los microorganismos durante el curado de la vainilla

Se sabe que los microorganismos que constituyen la flora de las vainas de *V. planifolia* contribuyen en la producción de los CAs durante el proceso del curado al utilizar precursores como la lignina, la curcumina, los estilbenos fenólicos, el isoeugenol, el eugenol, el ácido ferúlico, aminoácidos aromáticos y la glucosa. Todos estos compuestos encontrados en la pared celular vegetal (Röling *et al.*, 2001 y Peña *et al.*, 2016). Los microorganismos pueden producir los CAs como la vainillina y el AV. Muchas bacterias y hongos como *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Byssochlamys*, *Penicillium* y *Rhodococcus* pueden utilizar el AF como sustrato intermediario en la vía metabólica microbiana para la bioconversión a los CAs (Figura 3) (Mathew y Abraham 2004). En particular, las vías metabólicas bacterianas utilizadas en la bionversión de AF a CAs como la vainillina y el AV requieren de diferentes precursores entre ellos el AF que es el de mayor interés debido a su abundancia en la naturaleza. En cuanto a la composición química, el AF se encuentra unido covalentemente mediante enlaces éter o éster unidos a polisacáridos de lignina, arabinosa, glucosa, xilosa y residuos de galactosa que forman parte de la pectina o hemicelulosa, que a su vez dan estructura a la pared celular de las plantas y frutos, entre ellos *V. planifolia* (Labuda, 2010; Mathew y Abraham 2004).

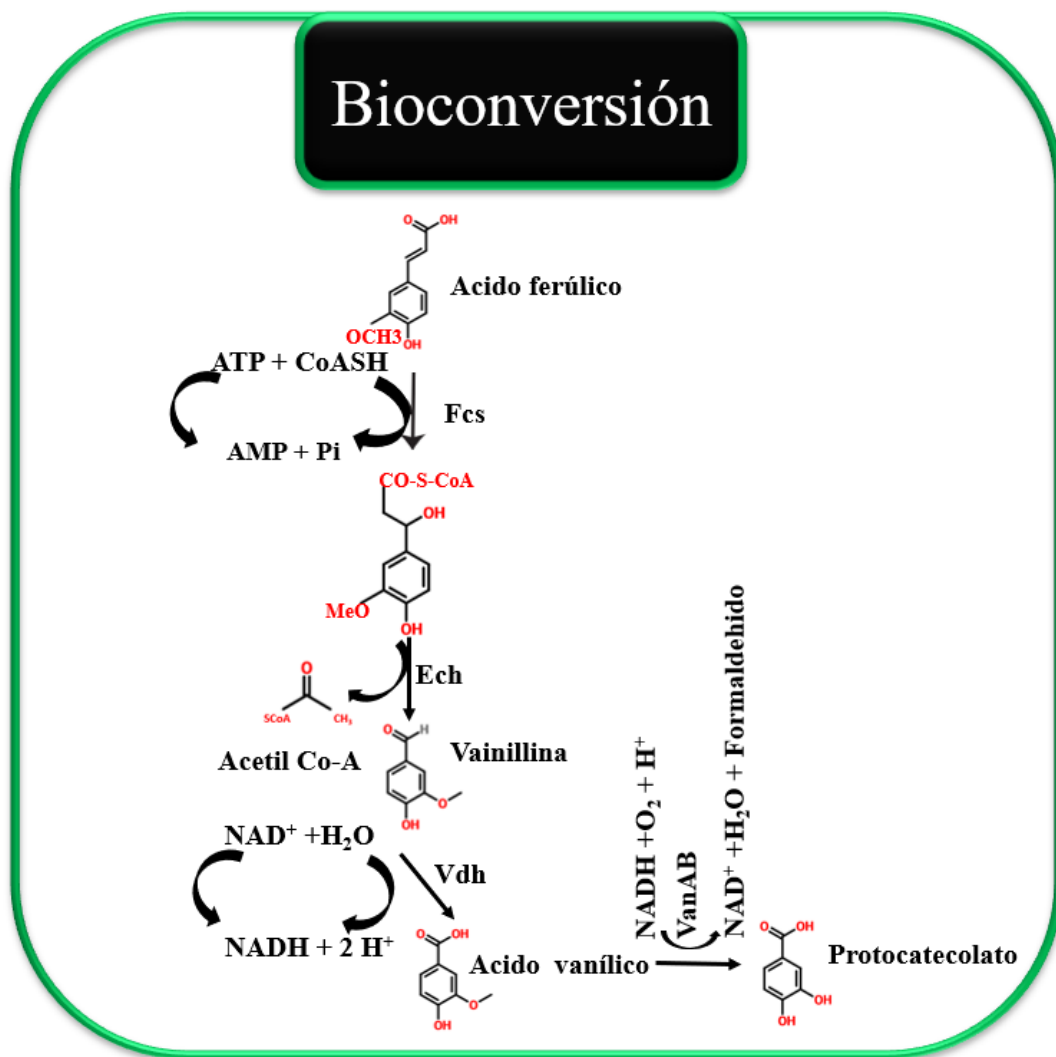


Figura 3. Ruta metabólica de la bioconversión de los CAs en el género *Pseudomonas* (Tomada de Ravi *et al.*, 2017).

2 Actividad pectinolítica (AP)

La AP es un proceso involucrado con el curado de la vainilla, que a su vez se relaciona con la comunidad bacteriana, debido a que los microorganismos pueden presentar diferentes actividades enzimáticas (celulítica, proteolítica, lipolítica y pectinolítica), que en sinergia pueden hidrolizar la pared celular vegetal y liberar sustratos que pueden ser bioconvertidos a los CAs. El mecanismo es conocido como “penetración activa” y se lleva a cabo en la pared celular de las plantas, frutos y vegetales (Mateos *et al.*, 1992 y Röling *et al.*, 2001). A continuación, se describen las familias de enzimas pectinolíticas en las bacterias Gram negativas. Entre ellas la familia de las enzimas

poligalacturonasa (PGs), así como los mecanismos de transporte implicados en la entrada de sustratos a la célula bacteriana, para la posterior hidrólisis del polímero de pectina a polímeros de menor longitud (Monosacáridos, disacáridos y trisacáridos).

2.1 Las enzimas pectinolíticas en las bacterias Gram negativas

En general, las familias de enzimas pectinolíticas en bacterias Gram negativas están clasificadas en 3 grupos: (1) pectin metil esterases (PemA y PemB), (2) poligalacturonasas (PehX y PgA) y (3) pectato liasas (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelL, PelZ y PelX). En la figura 4, se muestran las diferentes enzimas pectinolíticas secretables y endógenas en las bacterias Gram negativas, así como las proteínas o canales transportadores (KdgM, TogB y TOMNA₂) necesarios para transportar las trazas de polímero de pectina al espacio periplásmico y citoplasmático, para el término de su procesamiento u aprovechamiento por la célula bacteriana (Abbott y Boraston, 2008; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

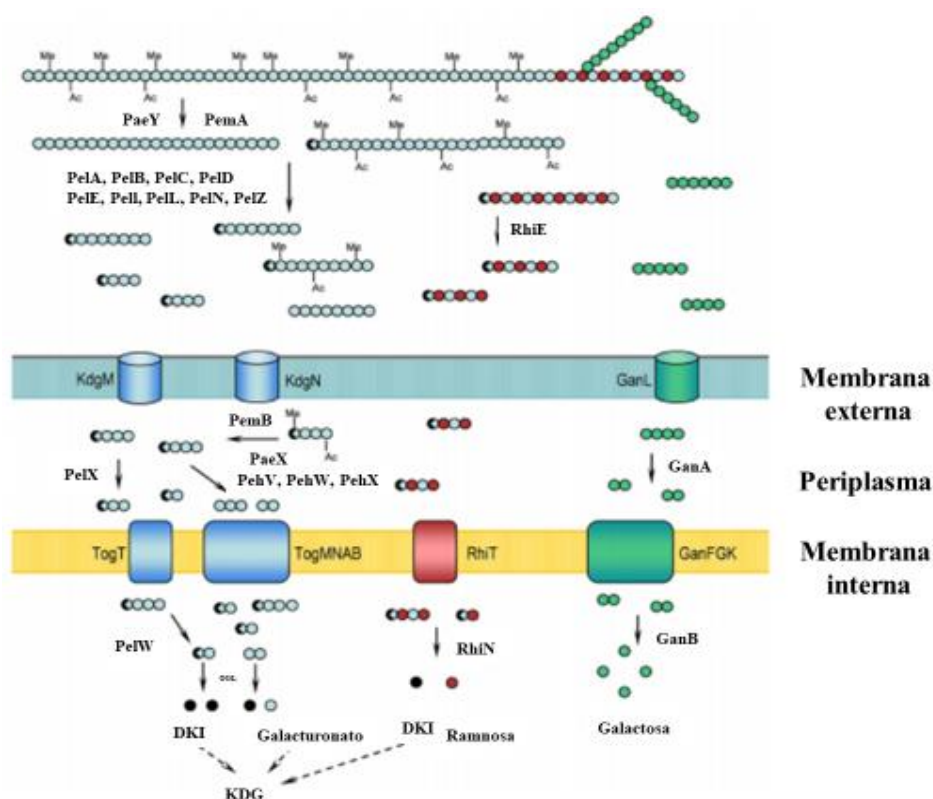


Figura 4. Principales familias de enzimas pectinolíticas y el sistema de transporte en las bacterias Gram negativas. Modelo basado en las enzimas degradadoras de la pared celular descritas en las bacterias Gram negativas como *Pectobacterium*, el modelo más estudiado en el ámbito (Tomada de Hugouvieux-cotte-pattat *et al.*, 2019).

2.2 Mecanismo de las enzimas poligalacturonasa (PGs) en las bacterias Gram negativas

El papel de las enzimas poligalacturonasa (PGs) producidas por las bacterias Gram negativas es hidrolizar los enlaces entre los polímeros que forman la pared celular vegetal (plantas o frutos). La clasificación de las enzimas PGs se describe a continuación: (1) la beta-1, 4-endoglucanasa, (2) pectato liasa, (3) pectinasa (4) metilesterasa y (5) xiloglucano endo-transglicósilasa (Hugouvieux *et al.*, 2014 y Pundir *et al.*, 2017). El mecanismo de hidrólisis de los sustratos como el galacturano y el pectato se lleva a cabo en los enlaces (1-4) alfa-D-galactosidurónicos (Pundir *et al.*, 2017).

2.3 Los microorganismos aislados durante el proceso del curado de *V. planifolia*

Se ha indicado que la actividad enzimática de las bacterias Gram negativas pueden contribuir al proceso del curado de la vainilla mediante la producción de los CAs (Röling *et al.*, 2001). Algunos modelos previamente estudiados son *Pseudomonas* y *Enterobacter* en cuanto a la producción del AV (Li *et al.*, 2008 y Zamzuri *et al.*, 2014). Por otro lado, en México se han aislado bacterias Gram negativas de las diferentes etapas del proceso del curado de la vainilla. Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* (Luna-Guevara *et al.*, 2016). En el caso de las bacterias Gram positivas se reporta al género *Bacillus* como un microorganismo capaz de contribuir al proceso del curado de la vainilla (Chen *et al.*, 2015).

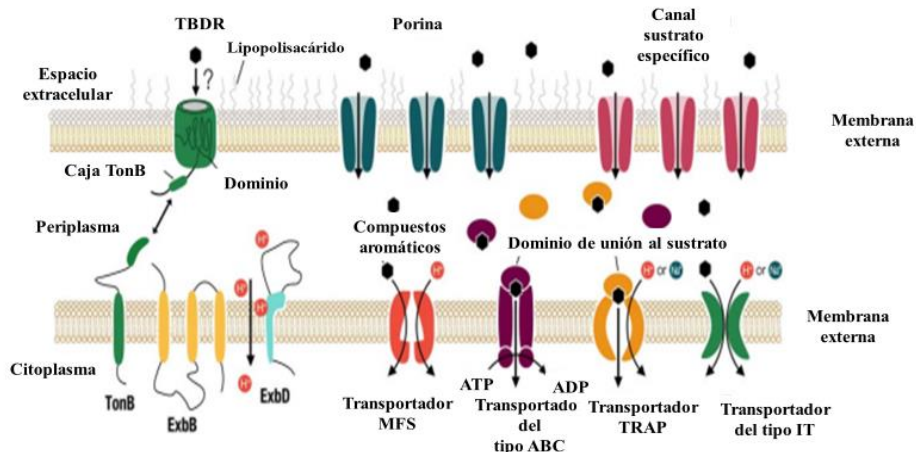
2.4 La bioconversión del ácido ferúlico a compuestos aromáticos en bacterias

Las enzimas feruloil esterasas pueden llevar a cabo el proceso de bioconversión del AF a los CAs como el AV y la vainillina. El papel de las enzimas es hidrolizar el enlace éster entre el ácido hidroxicinámico y los azúcares presentes en la pared celular de las plantas y frutos. Las esterasas de ácido ferúlico se han aislado de una amplia gama de microorganismos (Pundir *et al.*, 2017). Ejemplos de microorganismos que poseen esterasas del AF son *Streptomyces olivochromo*, *Pseudomonas fluorescens* subsp. *celulosa*, *Neocallimastix* MC-2, *Penicillium pinophilum*, *Schizophyllum commune* y varias especies de *Aspergillus* (Mathew y Abraham 2004). Para el caso de las enterobacterias se sabe que poseen la enzima feruloil esterasa. Un ejemplo descrito es *Enterobacter* Px 6-4 que puede bioconvertir sustratos como el 4-vinil guayacol y el AF a los CAs como el AV y la vainillina (Li *et al.*, 2008). Por otro lado, en el género *Bacillus* contribuye a la producción de CAs mediante la bioconversión del AF a la vainillina (Chen *et al.*, 2016).

2.5.1 La bioconversión a compuestos aromáticos a partir de los derivados de plantas

La bioconversión de los CAs derivados de la lignina es un mecanismo que se encuentra estudiado en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los microorganismos más estudiados son los géneros *Pseudomonas sp.* y *Sphingobium sp.* SYK-6. Este último microorganismo degrada compuestos derivados a partir de los polímeros de lignina como el aril-eter, fenil coumarano, resinol, bifenilo y espirodienona. Dichos componentes pueden ser bioconvertidos a los CAs como los monoarilos entre ellos el ferulato, vainillina, vanilato, protocatecolato (PCA), siringato y siringaldehído. Se ha reportado que existe un mecanismo de entrada de sustratos al espacio endocitoplasmático de la célula bacteriana, por medio de poros o canales, el cual es importante en el primer paso de asimilación de sustratos siendo bioconvertidos a los CAs (Figura 5A). Posteriormente, a través de la membrana interna de las bacterias Gram negativas, los compuestos aromáticos son generalmente incorporados por transportadores de tipo pasivo, las porinas y canales que son sustrato-específico. Los transportadores activos pueden interactuar con la membrana interna bacteriana, formado un complejo de proteínas conocidos como los receptores dependientes de TonB (TBDRs), TonB-ExbB-ExbD, la familia de transportadores del tipo TRAP, la familia de transportadores IT, la superfamilia facilitadora principal (MFS) y los transportadores del tipo cassette de unión al ATP o transportadores ABC; que están involucrados en el transporte de los CAs derivados de la lignina en bacterias. El sistema de transporte más importante es la MFS y se encuentra estudiado en el género *Cinetobacter sp.* ADP1 y *Pseudomonas*. Los CAs que pueden ser transportados por este sistema son el AF, el 4-hidroxibenzaldehído (4-PHB), PCA, vainillina, quinato, shikimato y vanilato (Kamimura *et al.*, 2017). Un ejemplo representado en la figura 5B es el modelo de *Pseudomonas*, en el que se ha estudiado un vínculo entre el sistema de transporte del tipo MFS (PcaK), la quimiotaxis (PcaY) y el metabolismo de 4-HBA.

A)



B)

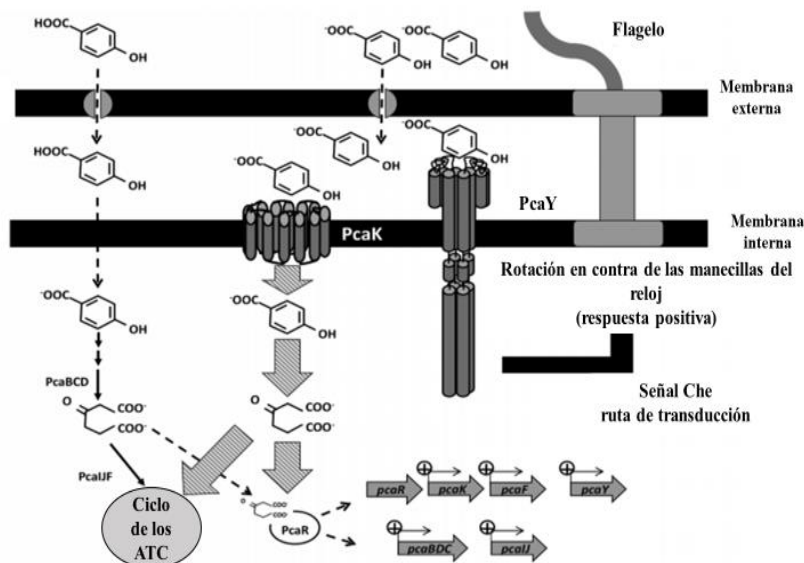


Figura 5 (A) Los sistemas de transporte de los CAs derivados de la lignina hacia el exterior de la célula vegetal. **(B)** La incorporación del compuesto aromático 4-PHB en un sistema bacteriano transportador del tipo MFS y un modelo de quimiotaxis en respuesta al compuesto aromático (Tomada de Kamimura *et al.*, 2017 y Luu *et al.*, 2015).

Los CAs del tipo de los monoarilos como la vainillina, el AF y el vanilato son metabolizados por 3 vías principales: la canalización biológica, la O-desmetilación y la ruta de degradación del anillo aromático que recicla los CAs por medio de la vía de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y finalmente obtener la CoA (Figura 6) (Kamimura *et al.*, 2017 y Ravi *et al.*, 2017).

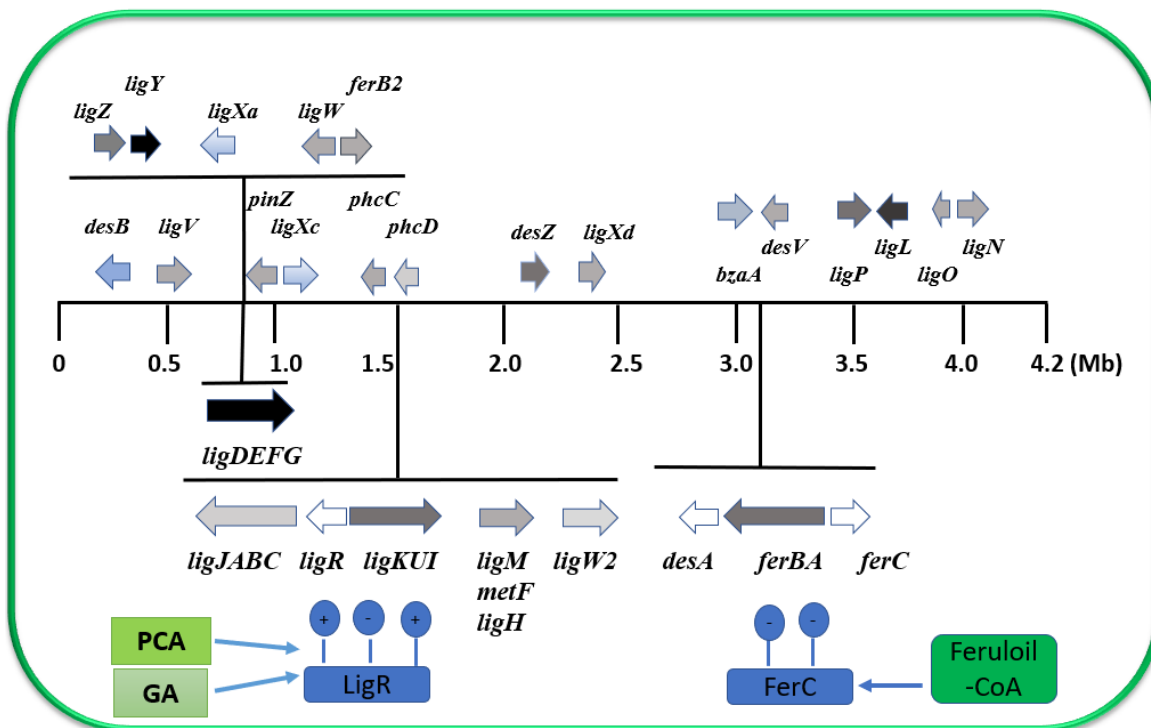


Figura 6. Localización de los genes involucrados en la degradación de los CAs derivados de la lignina en microorganismos implicados en la bioconversión de los monoarilos (AF) a los CAs (la vainillina o el AV) (Tomada de Karishma y Phale, 2015; Kamimura *et al.*, 2017).

2.5 Genes involucrados en la bioconversión a los compuestos aromáticos

Existe un conjunto de genes involucrados en la degradación y bioconversión de los CAs que forman parte de la estructura del polímero de la lignina (Kamimura *et al.*, 2017). En la tabla 3, se enlistan los sustratos y genes involucrados en la producción de los CAs. Por otro lado, los genes catabólicos del AF están regulados por la proteína FerC. Un regulador transcripcional del tipo MarR y son desreprimidos por la presencia de la feruloil-CoA. También, los operones *ligJABC* y *ligKUI* son positivamente regulados por LigR, un regulador transcripcional del tipo LysR, que se activa en respuesta a moléculas efectoras como PCA (protocatecolato) y GA (galato) (Kamimura *et al.*, 2017).

Tabla 3. Sustratos y genes implicados en la bioconversión a los CAs obtenidos de la pared celular de plantas

Sustrato	Genes implicados en la bioconversión a los CAs
β -aril éter	<i>ligD, ligL, ligN, ligO, ligE, ligP, ligF y ligG</i>
Bifenilos	<i>ligXa, ligXc, ligXd, ligZ, ligY, ligW y ligW2</i>
Fenilcumarinas	<i>bzaA, phcC y phcD</i>
Monómeros de ferulato	<i>ferA, ferB, ferb2 y ferC</i>
Vainillina y siringaldehído	<i>ligV y desV</i>

*Información obtenida de Kamimura *et al.*, 2017.

2.6 Resistencia a los compuestos aromáticos en las bacterias Gram negativas

En general, se ha estudiado el efecto de algunos CAs en bacterias Gram negativas y se ha observado el efecto antimicrobiano a nivel de membrana, inhibiendo la vía de respiración, en la resistencia al calor, cambios en el pHs, temperatura y se ha observado un efecto inhibitorio en el sistema *Quorum Sensing* (QS). El compendio del efecto antimicrobiano en bacterias Gram negativas se observa en la figura 7 (Delaquis *et al.*, 2005, Yemis *et al.*, 2011 y Nazzaro *et al.*, 2013).

Algunos compuestos como el eugenol, el isoeugenol, la vainillina, el safrol y el cinamaldehído son fenilpropenos que constituyen un grupo relativamente pequeño de aceites esenciales (AEs), que se encuentran presentes en las vainas de vainilla, compuestos a los cuales son resistentes algunos de los microorganismos que forman parte de la microbiota de las vainas de vainilla, debido a un mecanismo de adaptación a la presión selectiva ejercida por los CAs como la vainillina, AF y parahidroxibenzaldehído (Ito *et al.*, 2006). El mecanismo de resistencia a los CAs de las bacterias Gram negativas depende de un conjunto de enzimas involucradas en la vía de degradación de los CAs (Ito *et al.*, 2006 y Nazzaro *et al.*, 2013). En general, las bacterias Gram negativas se consideran más resistentes a los efectos antimicrobianos de los AEs en comparación con las Gram positivas, debido a las diferencias estructurales en la pared celular (Zamzuri *et al.*, 2014). Por otro lado, los estudios de Ito y cols., describen la resistencia bacteriana a los CAs como una estrategia para no acumular compuestos tóxicos, mediante el uso de las vías metabólicas como la ruta β -cetoacilato presente en las bacterias Gram negativas (Ito *et al.*, 2006). La ruta de resistencia a los CAs que han adquirido las Gram negativas aisladas del proceso del curado de la vainilla se explica en la figura 8.

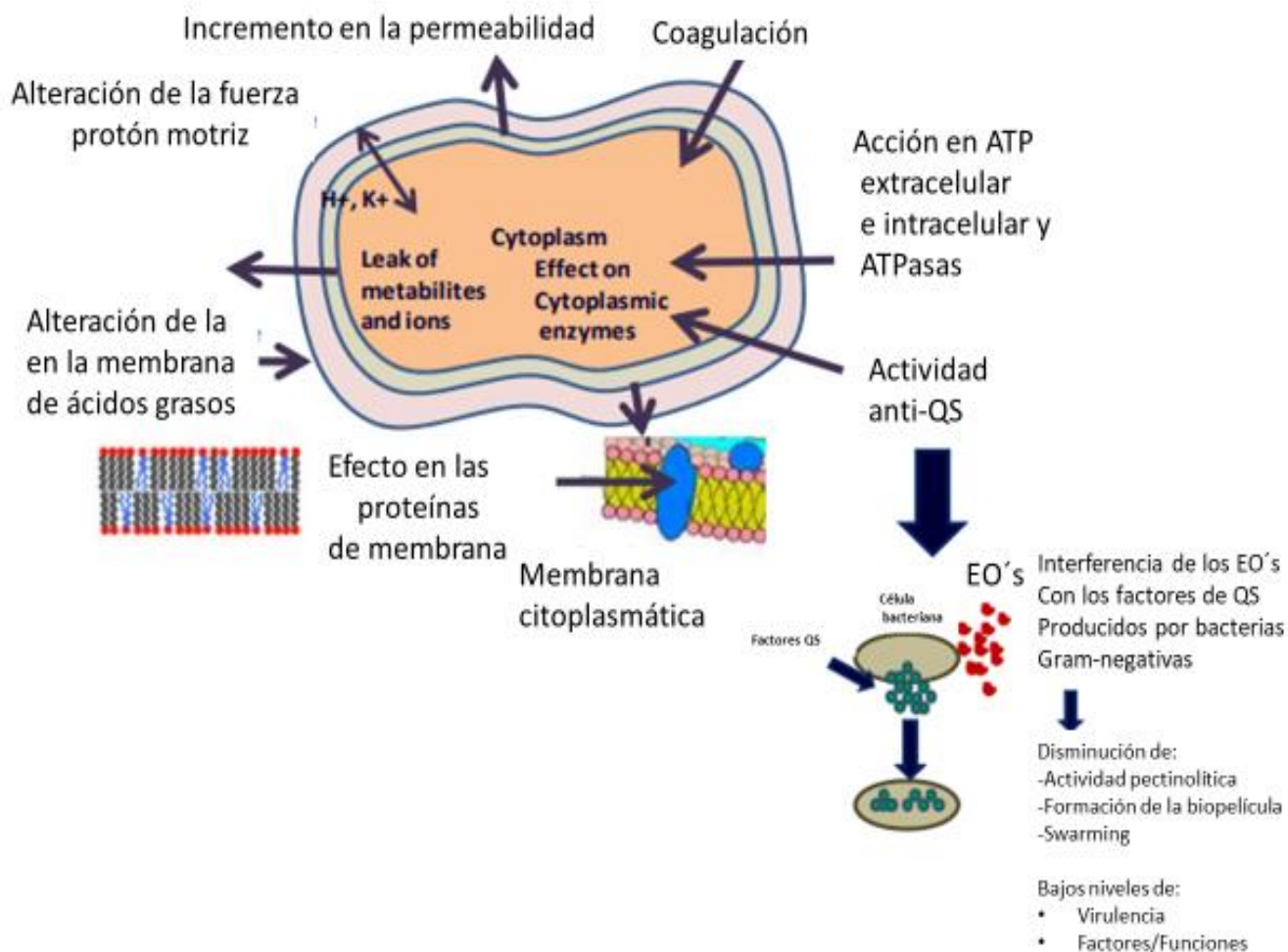


Figura 7. Mecanismos de acción de los aceites esenciales en las bacterias Gram negativas (Tomada de Nazzaro *et al.*, 2013).

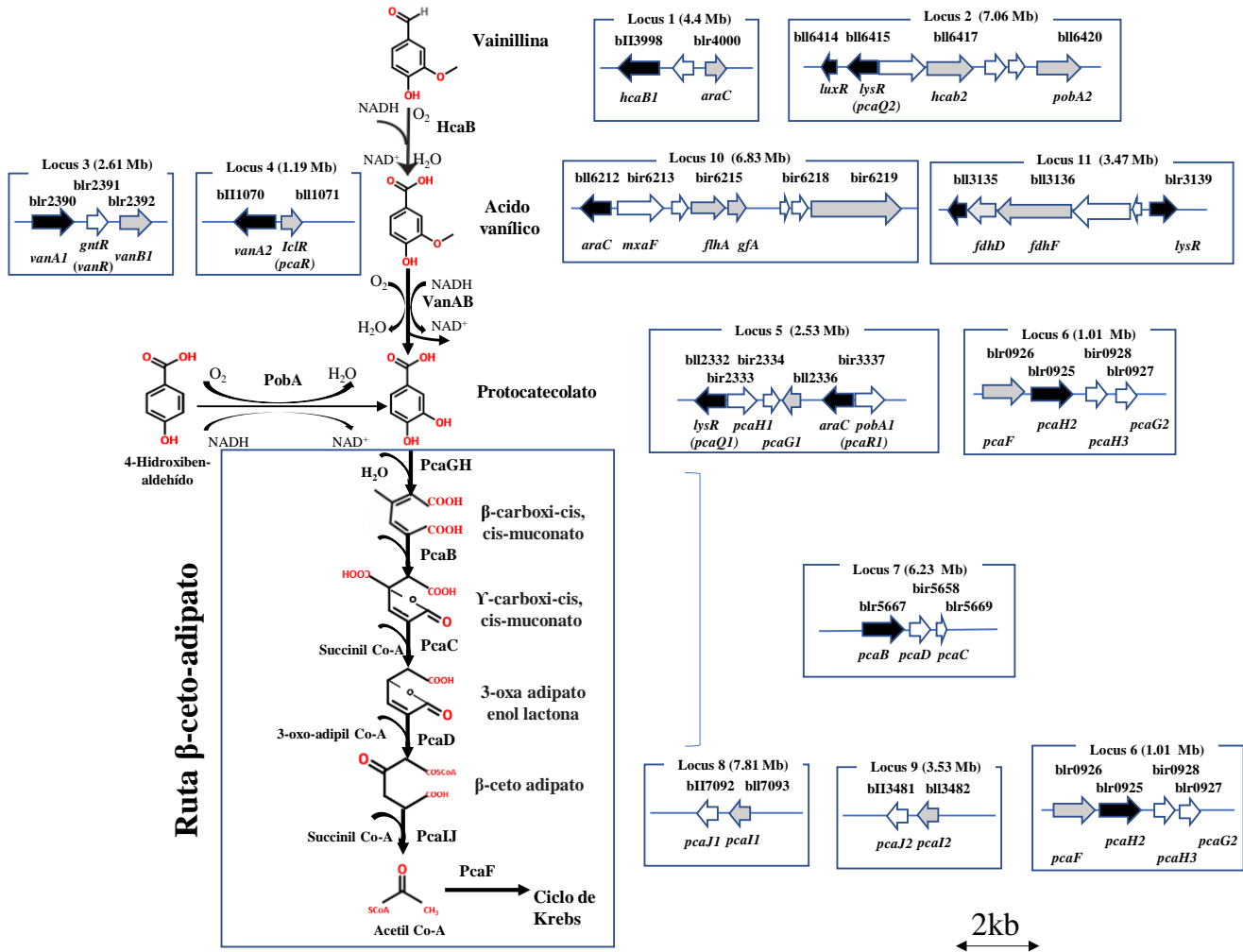


Figura 8. Mecanismo de resistencia y las enzimas implicadas en el mecanismo de degradación de los CAs en las bacterias Gram negativas (Adaptada de Ito *et al.*, 2006). HcaB (Vainillin oxígeno oxidoreductasa), VanA (Vanillato O-desmetilasa oxigenasa A), VanB (Vanillato O-desmetilasa oxigenasa B), PcaG (Protocatecuato 3,4-dioxigenasa), PcaH (Protocatecuato 3,4-dioxigenasa), PcaB (Cicloisomerasa 3-carboxi-cis, cis-muconato), PcaC (4-carboxi-muconolactona descarboxilasa), PcaD (3-oxoadipate enol-lactonase 1), PcaI (3-oxoadipato CoA-transferasa), PcaJ (3-oxoadipato CoA-transferasa), PcaI (3-oxoadipato CoA-transferasa) y PcaF (Beta-cetoadipil-CoA tiolasa).

2.7 Regulación de los procesos bacterianos

El mecanismo de *Quorum Sensing* (QS) en bacterias es de importancia ya a que está involucrado con los procesos bacterianos que son de interés en aplicaciones biotecnológicas. A continuación, se describen el mecanismo del QS, las rutas bioquímicas implicadas, la clasificación de los autoinductores y los procesos bacterianos asociados a la liberación de sustratos, bioconversión a CAs y la resistencia a los CAs pertenecientes a la familia de los monoarilos.

2.8 El mecanismo del *Quorum Sensing*

Con el QS se produce la comunicación entre microorganismos, por medio del reconocimiento de señales químicas conocidas como Autoinductores (AI) (De Kievit y Iglewski, 2000). La finalidad del QS es la producción y liberación de moléculas autoinductoras (AI), en función de la densidad celular. Es decir, las bacterias detectan la acumulación del umbral de concentración del AI regulando su expresión genética y su comportamiento en respuesta a la señal, por medio de la proteína reguladora LuxR o sus homólogos. Esta respuesta coordinada permite a los microorganismos responder frente a los cambios que se producen en el medio ambiente, reaccionando de manera rápida adaptándose y favoreciendo la sobrevivencia. Entre los procesos que son modulados por la presencia de los autoinductores se encuentran: La síntesis de factores de virulencia, la síntesis de péptidos antimicrobianos, la competencia, la nodulación, la producción de pectinasas, la esporulación y la formación de biopelículas (Lu *et al.*, 2005 y Bai y Rai, 2011).

2.10 La clasificación y las funciones de los autoinductores

Las bases de datos indican que hay alrededor de 1382 moléculas señal, que se relacionan con el mecanismo del QS, de las cuales se tienen 182 moléculas únicas, que son producidas por 215 organismos, pertenecientes a varios sistemas de señalización (Rajput *et al.*, 2016). Entre las moléculas de señalización o autoinducciones (AI) más comunes y que son producidas por microorganismos se tienen: a) Las acil homoserina lactonas (AHLS) conocidas como autoinductor-1 (AI-1), cuya estructura química es derivada de los ácidos grasos y es producida por bacterias Gram negativas; b) La molécula furanosil borato di-éster que corresponde al autoinductor-2 (AI-2) y es sintetizado por bacterias Gram positivas y Gram negativas. Ambas utilizadas en la comunicación intra e inter-especies; c) Los autoinductores peptídicos (APIs) que son producidos por las bacterias Gram positivas y participan en la comunicación inter-especies (Reading y Sperandio, 2006 y Lade *et al.*, 2014), d) El autoinductor-3 (AI-3), cuya estructura química es epinefrina/norepinefrina y su función es facilitar la comunicación entre reinos (Federle y Bassler, 2003), e) El tirosol y las oxilipinas también son moléculas autoinductoras en hongos y levaduras (Madhani, 2011), f) El hidroxiresolsinol, g) Las pironas, h) Los factores difusibles de señalización, i) Las quinonas y j) Las dicetopiperazinas). En la figura 9 se muestran las familias de los autoinductores más estudiados. Toda esta colección

de moléculas autoinductoras se han encontrado en los diferentes phylums (Actinobacteria, alfa, beta, gamma y epsilon proteobacteria, bacteroides, firmicutes, fusobacterium y euriarchaeota) (Rajput *et al.*, 2016).

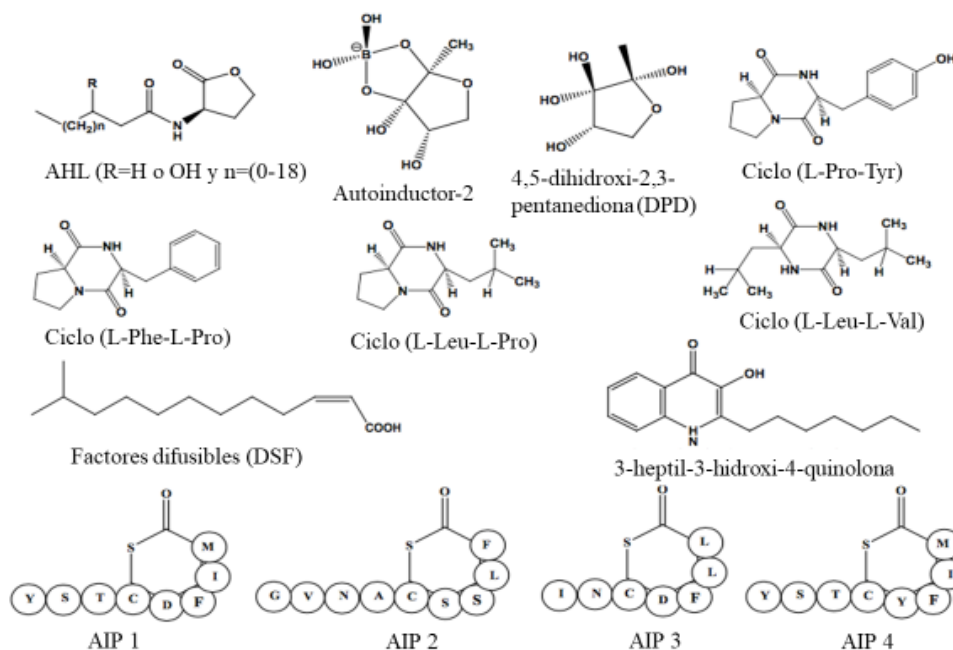


Figura 9. La estructura química de las familias de los autoinductores. AIP (autoinductor peptídico familias 1, 2, 3 y 4) (Tomada de Lade *et al.*, 2014).

2.11 La familia de las Acil Homoserina Lactonas (AHLS) o del Autoinductor-1

Existen diferentes tipos de AHLS dependiendo de la longitud de la cadena lateral (R) del grupo acilo. De manera general pueden contener de 4 a 12 carbonos, aunque se han identificado las AHLS con 18 carbonos y el sustituyente en el carbono 3 es un grupo carbonilo o hidroxilo. Asimismo, las AHLS con cadena corta son capaces de difundirse por transporte pasivo a través de la membrana bacteriana en comparación con las AHLS de cadena larga que requieren de sistemas de transporte de membrana (Dirix *et al.*, 2004).

Las AHLS son sintetizadas por las proteínas LuxI que son codificadas por el gen *luxI* o sus genes homólogos. Inicialmente la proteína LuxI cataliza la unión de la molécula S-adenosil metionina (SAM) con la proteína transportadora del grupo acilo (Acil-ACP), por medio de un enlace amida formado por los grupos Acil-ACP y el amino de la SAM (Figura 10). El intermediario (Acil-ACP-SAM) junto con la 5-metil tioadenosina lleva a cabo reacciones de lactonización favoreciendo la síntesis de las AHLS (Bandara *et al.*, 2012). Por otro lado, se reporta

que el número de bacterias que producen el AI-1 es de aproximadamente 100 especies, algunas poseen un sistema homólogo a LuxI/LuxR (Lindemann *et al.*, 2011).

El mecanismo general del QS involucrado en las bacterias Gram negativas que producen las AHLs, se encuentra estudiado en el modelo bacteriano de *Vibrio fischeri* (Figura 11). Los principales elementos del QS en *V. fischeri*, así como en otras bacterias son: 1) El autoinductor-1, 2) La proteína autoinductor sintasa (LuxI), 3) La proteína reguladora LuxR que detecta y responde a las AHLs y 4) Los genes que se activan en respuesta a la detección de las AHLs (Tomada de Waters y Bassler, 2005 y Nazzaro *et al.*, 2013).

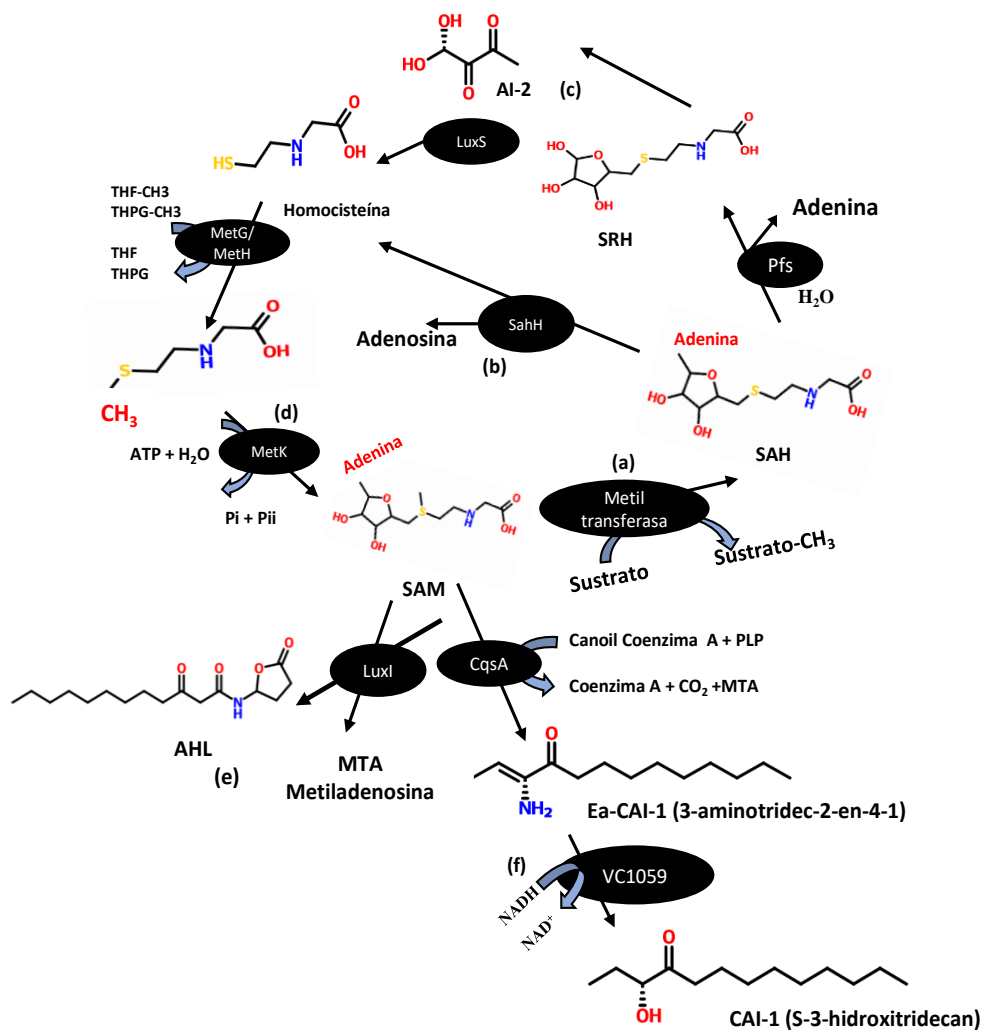


Figura 10. La ruta bioquímica de la síntesis de las AHLs en las bacterias Gram negativas (Tomada de Pereira *et al.*, 2013).

Se ha encontrado que los géneros de *Salmonella* y *Escherichia*, presentan un sistema “incompleto de QS”, el cual consta de una proteína SdiA que es el receptor del tipo LuxR Solo, pero no existe la proteína AHL sintasa. El regulador SdiA ha sido considerado como un ejemplo de un receptor capaz de detectar señales autoinductoras de otras especies bacterianas y como respuesta se favorece la expresión de ciertos genes como *srgE*, *rcK* y el operón *lsrACDBFGE* que codifican para un efector del sistema de secreción tipo III, la resistencia a la destrucción del complemento del sistema inmune y el conjunto de genes relacionados con la vía de síntesis, detección y respuesta al AI-2 (Miller y Bassler, 2001).

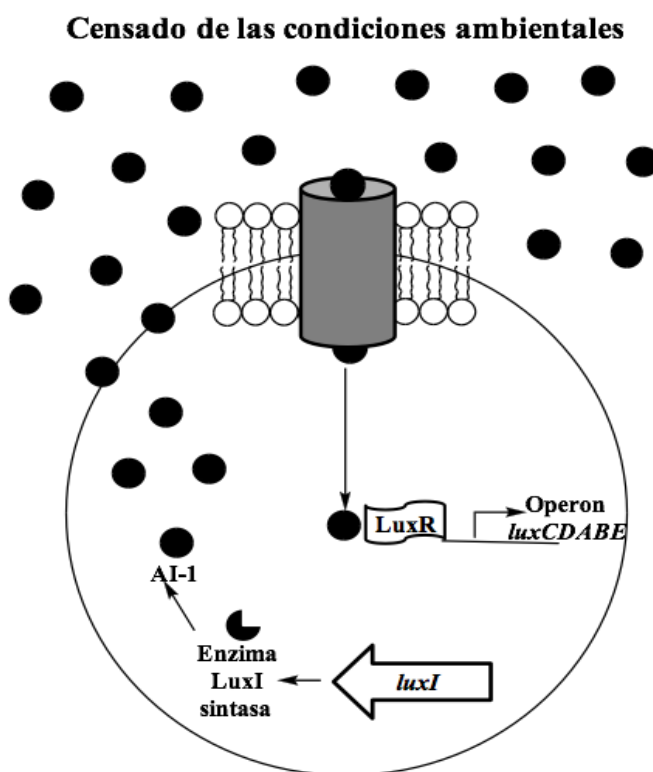


Figura 11. El mecanismo del QS en las bacterias Gram negativas en la familia de las acil homoserina lactonas “AHLS” (esferas negras), dependiente del sistema LuxI/LuxR en el modelo de *Vibrio fischeri* (Modelo basado en los estudios de Miller *et al.*, 2002).

2.12 Los biosensores del AI-1

Las moléculas autoinductoras de la familia del AI-1 son frecuentemente detectadas usando cepas biosensoras. La elección del biosensor es importante porque algunas cepas poseen mejor sensibilidad y rango de detección a las AHLS como *Agrobacterium tumefaciens* cepa KYC55 y *Agrobacterium tumefaciens* cepa WCF47 a diferencia de

los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *P. aeruginosa* PA14-R3, *S. meliloti sinI::lacZ* y *E. coli JM109* (Rai *et al.*, 2015).

2.13 El sistema QS de un componente en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno oportunista altamente adaptable al medio ambiente debido a que posee un genoma muy grande y dinámico. El 10% de los genes codifican para elementos reguladores que incluyen un complejo sistema de múltiples señales del QS. La detección de Quorum es importante en la regulación de la mayoría de los genes relacionados con diversos procesos fisiológicos, la producción de los factores de virulencia, la motilidad, la formación de biopelículas y la expresión de bombas de flujo que regulan la entrada y salida de antibióticos. Mientras que, las moléculas autoinducidas del QS, están involucradas en las interacciones huésped-microorganismo (Williams y Camara, 2009).

En *P. aeruginosa*, el mecanismo QS está formado por dos principales sistemas canónicos de QS (LasI/LasR y RhII/RhlR) y un sistema incompleto de QS conocido como QscR (Lee y Zhang, 2014). A continuación, se describen los procesos regulados por el QS en el sistema LasIR. La proteína LasI cataliza la producción de la molécula N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-AHL), la cual se acopla con el regulador transcripcional LasR, que permite que la proteína se una a promotores regulados por QS, regulando varios factores de virulencia como *lasA* (estafilidosina), *lasB* (elastasa), *aprA* (proteasa alcalina), *toxA* (exotoxina A) y *hcnABC* (cianuro de hidrógeno sintasa). El circuito LasIR induce un ciclo de retroalimentación positiva produciendo las AHLs y también induce el circuito de QS secundario conocido como el sistema RhlR, que sintetiza la N-butiril-L-homoserina lactona (C₄-AHL) y el receptor RhlR. Así, la molécula C₄-AHL se acumula en un umbral de concentración adecuado y se une al RhlR, que induce la expresión de *lasB* (elastasa B), *rhlAB* (genes de síntesis de ramnolípidos), *rhlI* (autoinductor sintasa), *rpoS* (el factor sigma de la fase estacionaria), *lecA* (lectina tipo I), *lecB* (lectina tipo II), *hcnABC* y los genes implicados en la producción de la piocianina (Winzer *et al.*, 2000). En la figura 12 se pueden observar los 2 sistemas canónicos del QS en *P. aeruginosa* y los factores de virulencia regulados por ambos sistemas.

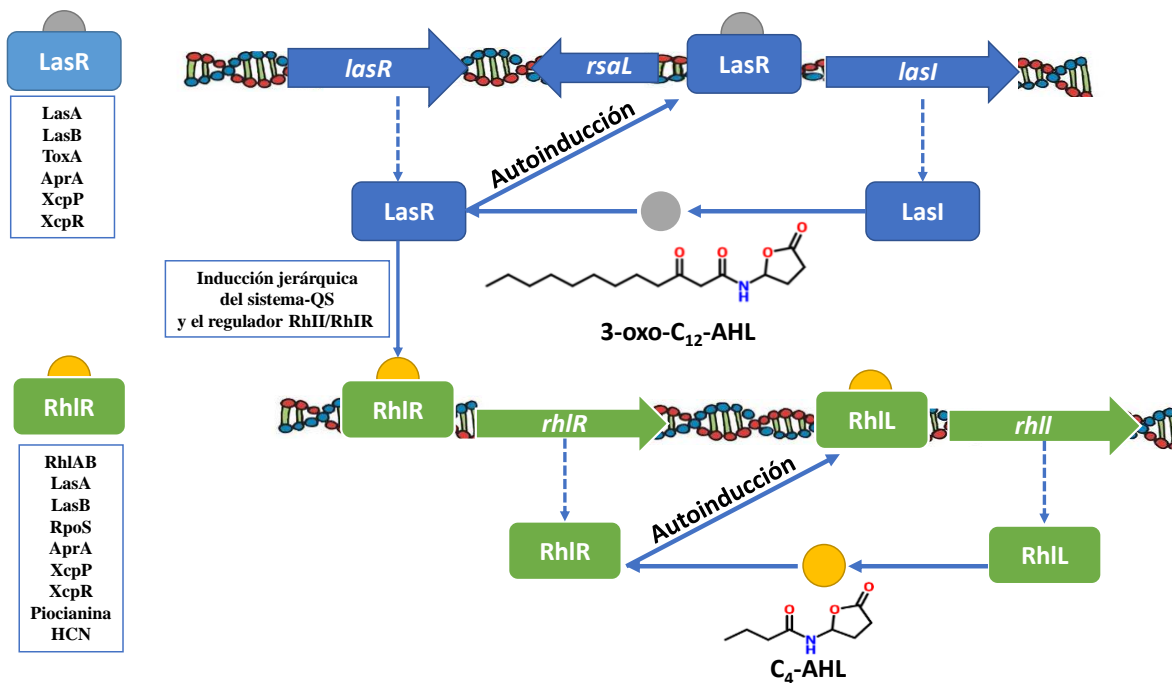


Figura 12. El sistema canónico del QS y algunos factores de virulencia activados por los reguladores LasR y RhIR en presencia de las moléculas autoinductoras: C₄-AHL y C₁₂-AHL (Adapta de Jimenez *et al.*, 2012). LasA (elastasa A), LasB (elastasa B), ToxA (toxina dermonecrotica), AprA (metaloproteasa), XcpP (sistema de secreción tipo II proteína N) y XcpR (sistema de secreción tipo II proteína E), RhlAB (hidrolasa alfa y beta), RpoS (sigma factor de la RNA polimerasa), AprA (metaloproteasa), XcpP (sistema de secreción tipo II proteína N), piocianina y HCN (cianuro de hidrogeno).

2.14 El sistema QS en el género *Enterobacter* y *Citrobacter*

Hay una carencia de estudios con respecto a los mecanismos moleculares del sistema QS en ambos géneros, pero se sabe que el QS se encuentra relacionado con algunos fenotipos como la biopelícula y la capacidad de producir AHLS de diferente longitud (C₆-AHL a C₁₄-AHL) mediante el gen autoinductor sintasa *croI* y *entI*, respectivamente (Pruitt *et al.*, 2006 y Rajput *et al.*, 2016). Además, ambos géneros tienen la capacidad de producir AHLS de diferente longitud (C₆-AHL a C₁₄-AHL). También, el género *Enterobacter* posee un regulador del tipo LuxR Solo denominado SdiA. Mientras que, en el género *Citrobacter* no se ha estudiado el regulador a detalle. Pero en la colección de los genomas se confirma la presencia de reguladores del tipo SdiA (Pruitt *et al.*, 2006, Rajput *et al.*, 2016, Goh *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2017 y Pundir *et al.*, 2017).

2.15 Los procesos regulados por el QS en bacterias Gram negativas

El mecanismo de QS se relaciona con varios procesos bacterianos llevando a cabo sus mecanismos de defensa y la obtención de nutrientes. Como ejemplo, los estudios que demuestran que los endófitos son un grupo de microorganismos que residen intra o intercelularmente con tejidos (raíces, hojas y tallos) de las plantas hospederas sin mostrar indicios de enfermedad. Pocos estudios sugieren el mecanismo de interacción entre planta-endófito o fruto-endófito además de los genes reguladores involucrados (Patel *et al.*, 2014 y Mookherjee *et al.*, 2017). Algunos fenotipos y procesos bacterianos regulados por el QS son la formación de biopelícula, la producción de toxinas, la síntesis de exopolisacáridos, los factores de virulencia y la movilidad. Todos estos fenotipos son características esenciales estableciendo interacciones simbióticas y patogénicas con algunos hospederos eucariotas (Waters y Bassler, 2005).

En el presente estudio, se planteó analizar tres diferentes procesos bacterianos relacionados con la producción de EP, bioconversión del AF y la resistencia a los CAs en las bacterias Gram negativas que han sido aisladas de las vainas de vainilla. Los microorganismos al presentar esta característica poseen la capacidad de participar en la producción de los CAs, mediante la producción de las EP con la finalidad de hidrolizar la pared celular vegetal y posteriormente hacer uso de las enzimas involucradas en la bioconversión de sustratos a los CAs (Pirhonen *et al.*, 1993 y Brencic y Winans, 2005). Lo cual, a su vez activará los mecanismos de resistencia en respuesta a las altas concentraciones de los CAs como el AV, la vainillina, el AF y el PHB (Ito *et al.*, 2006). Por lo anterior se propone que existe una relación entre los procesos anteriormente mencionados y el mecanismo de QS.

2.16 Relación del QS con la producción de enzimas pectinolíticas en las bacterias Gram negativas

Algunas bacterias Gram negativas normalmente se asocian con el deterioro de la pared celular vegetal y producen las AHLs, que pueden ser detectadas en una serie de productos alimenticios. Las enzimas que desempeñan un papel en el deterioro de la pared celular vegetal son las proteasas, lipasas, celulasas y pectinasas. Estas últimas, son las más importantes durante la descomposición de la pared celular vegetal y se producen bajo el control de los sistemas de percepción del QS en muy pocos modelos Gram negativos (Wevers *et al.*, 2009). Ejemplos de lo anterior son el patógeno *Erwinia carotovora* cuyo sistema QS regula la producción de enzimas extracelulares (pectinasas y celulasas) (Pirhonen *et al.*, 1993, Brencic y Winans, 2005 y Lee Dong Hwan *et al.*, 2013). Otro ejemplo, es la cepa

P. aeruginosa PA14, cuyo regulador transcripcional LasR detecta la 3-oxo-C₁₂-AHL y puede regular a la pectinasa PelA (Ueda y Wood, 2009). En los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* se ha estudiado sobre la producción de las moléculas autoinductoras, pero no se ha estudiado la relación del QS y la AP (Base de datos de NCBI y UniProt, 2019).

2.17 Relación del QS, bioconversión del AF y la resistencia a los CAs en las bacterias Gram negativas

En los géneros bacterianos *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* no se ha documentado la relación del proceso de bioconversión con el modelo del QS (Base de datos de NCBI y UniProt, 2019). Pero en el modelo *E. coli* la bioconversión se ha relacionado con la vía de activación del ciclo de activación del metilo (CAM) al sobreexpresar los genes autoinductor sintasa (*mtan* y *luxS*) observando un aumento en la producción de vainillina (Kunjapur *et al.*, 2016). Otros autores han reportado que algunos de los CAs como la vainillina son inhibidores del QS (Choo *et al.*, 2006 y Lade *et al.*, 2014). Y en otros casos. Lo anterior permite comprender que los CAs poseen múltiples papeles en la activación e inhibición de algunos procesos relacionados con el QS.

ANTECEDENTES DIRECTOS

3.1 Aislamiento de los microorganismos del proceso del curado de *V. planifolia*

En México el proceso de obtención de la vainilla es artesanal, que lleva alrededor de 6 meses exponiendo las vainas al sol (curado). Durante dicho proceso se han aislado los microorganismos que predominan en las vainas durante varias etapas del proceso del curado de la vainilla y las enterobacterias más frecuente aisladas fueron *Citrobacter* y *Enterobacter* (Luna-Guevara *et al.*, 2014). También, se ha encontrado que *Pseudomonas* contribuye a la bioconversión de sustratos a CAs (Zamzuri *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que las bacterias Gram positivas como *Bacillus vanillea* XY18 puede contribuir a la bioconversión de los CAs (Chen *et al.*, 2015).

3.2 Procesos involucrados en la producción de compuestos aromáticos en las bacterias Gram positivas y Gram negativas

3.2.1 Actividad pectinolítica

En ambos grupos bacterianos (Gram positivas y Gram negativas) ha sido posible la detección de la actividad pectinolítica. Se han encontrado varias familias de enzimas pertenecientes a los 3 principales grupos (Pundir *et al.*, 2017). Tanto las bacterias Gram negativas y Gram positivas pueden ser endófitas, y poseen la habilidad de producir

enzimas pectinolíticas que hidrolizan la pared celular vegetal, liberando sustratos o precursores que son utilizados en reacciones enzimáticas bioconvirtiendo al ácido vanílico y vainillina (Röling *et al.*, 2001 y Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

En los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* se han reportado las temperaturas óptimas de máxima actividad pectinolítica a partir de 37, 40, 45, 50, 55 y 60 °C (Soares *et al.*, 2001, Seo *et al.*, 2010, Rehman *et al.*, 2014, Darah *et al.*, 2015, Kaur y Gupta, 2017, Pundir *et al.*, 2017, Jing-ping *et al.*, 2018, Thite y Nerurkar, 2018, Tripathi *et al.*, 2018 y Ram *et al.*, 2019).

3.2.2 Producción del ácido vanílico

El género *Bacillus* se ha aislado de las etapas del curado de la vainilla. También, *Bacillus* degrada una gran variedad de compuestos aromáticos como el ácido cinámico, 4-coumárico, 3-fenilpropionico, ácido 3-(p-hidroxifenil propiónico), ácido ferúlico, ácido benzoico y ácido 4-hidroxibenzoico. De los cuales el ácido ferúlico es uno de los sustratos más estudiados en cuanto al proceso de bioconversión, debido a que es posible metabolizarlo mediante un mecanismo de descarboxilación no oxidativa con la formación de intermediarios como el ácido 4-hidroxi-3-metoxifenil-b-hidroxi-3-propionico, vainillina y ácido vanílico. Por otro lado, el isoeugenol puede ser metabolizado por medio de la ruta epóxido diol. Existen estudios descriptivos de las condiciones de bioconversión, tal es el ejemplo de *Bacillus coagulans* BK07 en donde se describe que tiene la capacidad de descarboxilar el ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol, un intermediario que se bioconvierte a vainillina y posteriormente oxidado produciendo el ácido vanílico, que finalmente es desmetilado al ácido protocateico (Labuda, 2011 y Dunlap, 2015). Por otro lado, ha sido posible aislar a los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* a partir de muestras de suelo, raíces de vainas de vainilla y durante el proceso del curado identificando la producción del compuesto aromático ácido vanílico (Li *et al.*, 2008 y Zamzuri *et al.*, 2014). Adicionalmente, en el género *Citrobacter* solo se ha reportado la capacidad de asimilar el ácido ferúlico bajo condiciones *in vitro* (Ammar *et al.*, 2005).

3.2.3 Resistencia a los compuestos aromáticos

Al género *Bacillus* no se le han determinado a detalle los mecanismos de resistencia a los CAs, pero se sabe que producen una cantidad considerable de compuestos aromáticos por lo tanto se puede inferir que hay un cierto nivel de resistencia a los CAs (Gu *et al.*, 2015).

Mientras que en los géneros *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* hay estudios de resistencia a los compuestos aromáticos (CAs) como el ácido vanílico (AV), PHB y la vainillina. Esto debido a que poseen vías de degradación de los CAs, mediante la descarboxilación de algunos precursores y compuestos intermediarios (Harazono *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2011, Yemiş *et al.*, 2011, Cava *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2015, Pundir *et al.*, 2017, Kallscheuer *et al.*, 2018 y Sannino *et al.*, 2018). Para los microorganismos es posible emplear 5 posibles vías de degradación de los CAs: (A) la deacetilación no β -oxidativa (dependiente de la CoA), (B) la deacetilación β -oxidativa (dependiente de la CoA), (C) la descarboxilación no oxidativa, (D) la deacetilación independiente de CoA y la reducción de la cadena lateral (Labuda, 2010).

3.2.4 Cuantificación de las moléculas autoinductoras

Con respecto a la cuantificación de las moléculas autoinductoras se tienen los trabajos de Fuqua y Winans, 1996, Zhu *et al.*, 1998, Kawauchi *et al.*, 2008 y Morohoshi *et al.*, 2008 en los que se ha identificado una amplia gama de moléculas (C₄-AHL a C₁₄-AHL) por medio de biosensores basados en la cepa *Agrobacterium tumefaciens*. Por otro lado, se ha cuantificado el contenido total de las AHLs en los cultivos de las bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*. Utilizando la herramienta biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pcF218) (pcF372), el cual contiene el gen *luxR* en el plásmido pcF218 y en un segundo plásmido pcF372 el promotor *traI* fusionado al gen reportero *lacZ*, permitiendo la expresión de la β -galactosidasa produciendo un pellet azul, en la presencia de las AHLs producidas por los microorganismos de estudio mediante técnica colorimétrica (Luna-Guevara *et al.*, 2011).

3.2.5 Mecanismos QS y procesos bacterianos relacionados con la producción de los CAs

De acuerdo con lo reportado en la bibliografía, no existen estudios que sugieran que las bacterias aisladas de *V. planifolia* tengan un papel importante en los procesos bacterianos relacionados con la producción de los CAs y a su vez estén regulados por el sistema QS de un solo componente correspondiente a la familia de las AHLs. Solo se

describen estudios en los que se involucra la regulación de la AP en *P. aeruginosa*, la producción de AV en *E. coli* y un represor transcripcional presente en bacterias Gram negativas que relaciona el mecanismo de QS con la regulación de la producción de los CAs (Fibriansah *et al.*, 2012 y Durante-Rodríguez *et al.*, 2018).

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio es de relevancia debido a que actualmente son pocos los informes sobre la contribución de los microorganismos aislados durante las diferentes etapas del proceso tradicional del curado de *V. planifolia*, en la producción de los compuestos aromáticos (CAs).

También, se desconocen estudios que aborden sobre los procesos relacionados con la producción del AV y los posibles mecanismos de regulación de los CAs como el proceso de QS.

La utilidad del presente estudio es describir la contribución *in vitro* de los microorganismos aislados de vainilla, en la producción del AV y su relación con los mecanismos de regulación, con el propósito de proponer una aplicación biotecnológica a futuro con los datos obtenidos.

HIPÓTESIS

Los microorganismos aislados de las vainas curadas de *V. planifolia* poseen la habilidad de contribuir a la producción de los CAs por medio de 3 procesos bacterianos (la actividad pectinolítica (AP), la bioconversión, la resistencia a los CAs) y posiblemente alguno de los procesos bacterianos este regulado por el mecanismo de *Quorum Sensing* (QS).

OBJETIVO GENERAL

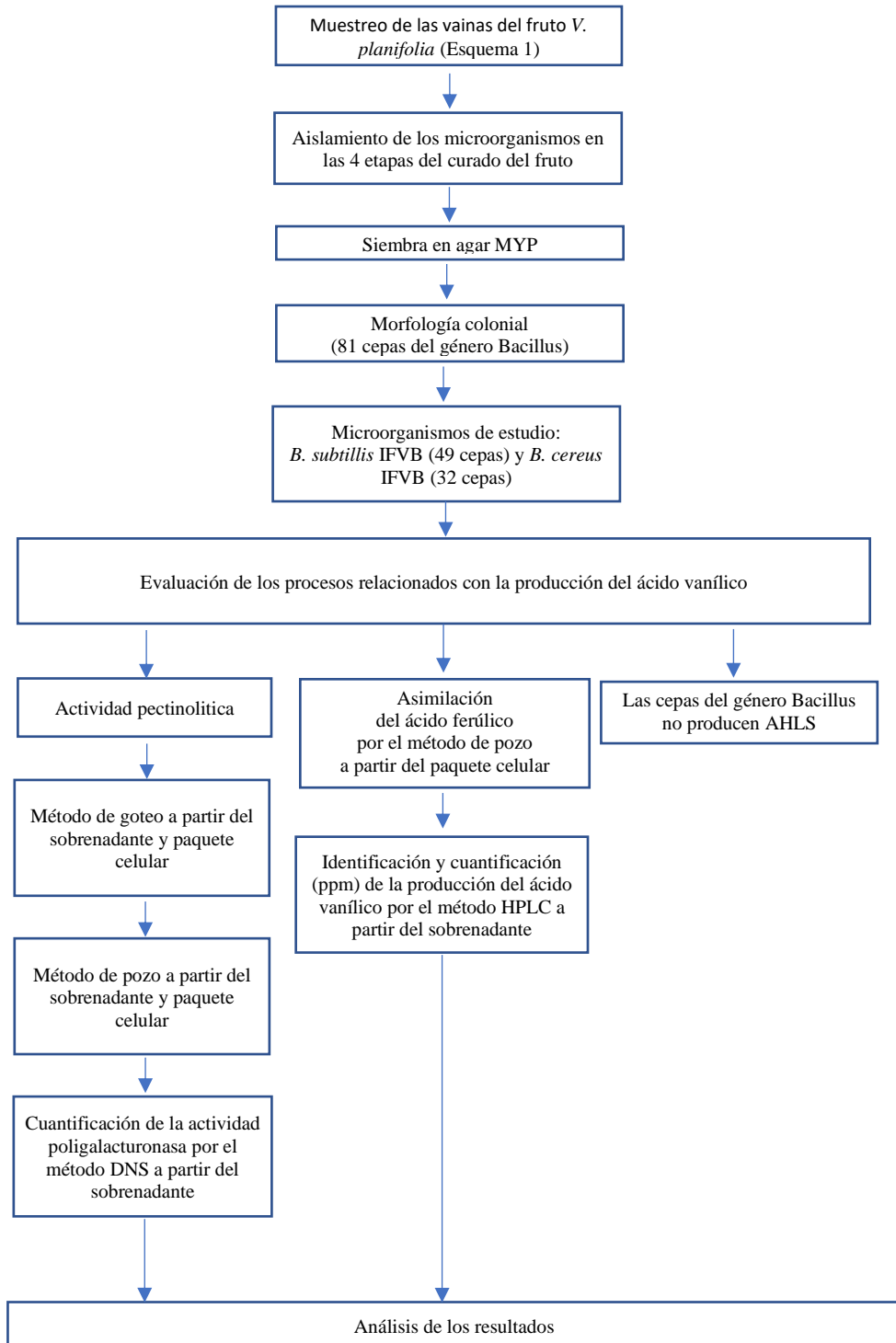
Evaluar en las bacterias aisladas de *V. planifolia* Jacks ex Andrews, los procesos bacterianos como la actividad pectinolítica, la bioconversión, la resistencia a los CAs, la producción de las AHLs, el efecto de la C₈-AHL en la producción de las enzimas pectinolíticas y la producción del compuesto aromático ácido vanílico (AV).

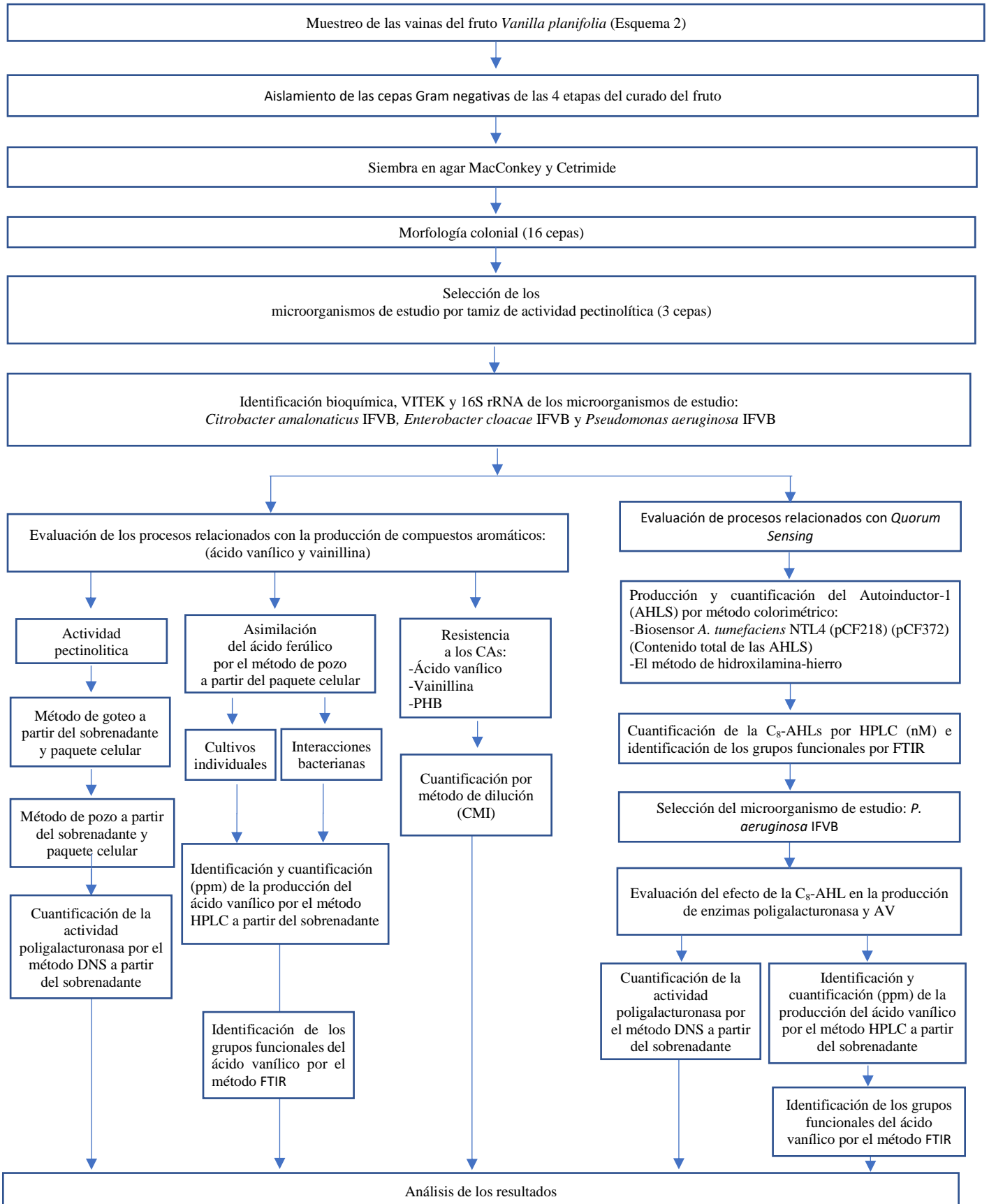
OBJETIVOS PARTICULARES Y ESPECÍFICOS

1. Identificar y seleccionar los microorganismos aislados a partir de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla.
2. Evaluar la actividad pectinolítica, la bioconversión y la resistencia a los compuestos aromáticos en los microorganismos de estudio.

3. Evaluar la producción y caracterizar el AI en las cepas de estudio.
4. Evaluar en un modelo bacteriano el efecto del AI en la actividad pectinolítica y en la producción del ácido vanílico.

ESQUEMA DE TRABAJO





MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Material vegetal

Las vainas de vainilla (*V. planifolia ex. Andrews*) fueron obtenidas de las diferentes etapas del proceso del curado y fueron colectadas de varias localidades de la región de Totonacapan (Latitud 20°, 23', 35.6'' y longitud 97°, 19', 34.72'') en el estado de Puebla y Veracruz (México), en el periodo de noviembre 2016 al mes de abril del 2017. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en bolsas de poliestireno para su posterior uso.

9.2 Aislamiento e identificación de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las bacterias Gram negativas se aislaron utilizando medio selectivo MYP (Manitol-Yema de Huevo-Polimixina). Las colonias se diferenciaron en base a su cambio de coloración en el medio. Las colonias de color amarillo serán identificadas como *Bacillus subtilis* y las colonias rosas como *Bacillus cereus* (Slepecky *et al.*, 2006).

Por otro lado, las bacterias Gram negativas fueron aisladas de las vainas de vainilla e identificadas por su morfología colonial en medio selectivo MacConkey y Cetrimide, tinción de Gram, pruebas bioquímicas (IMViC) y para conocer el género bacteriano se utilizó el sistema VITEC automatizado (bioMerieux, México) y se confirmó por medio de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA. El ADN fue extraído y utilizado como templete en la amplificación del gen 16S rRNA, utilizando los siguientes cebadores 16UN27F (5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1392R (5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3'). El producto de amplificación fue de 1365 pb y los productos de PCR fueron purificados utilizando el protocolo y las condiciones de manufactura del kit de purificación (QIAquick, Qiagen, Alemania). La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos, México).

Las secuencias parciales del gen 16S rRNA fueron comparadas con la base de datos del centro nacional de información biotecnología (NCBI) utilizando la herramienta BLAST. Finalmente, el análisis filogenético de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA de las bacterias Gram negativas se llevó a cabo en base a Torre-Ruiz *et al.*, (2016).

Evaluación de los procesos involucrados en la producción de los compuestos aromáticos (CAs)

En la tabla 4, se observan los métodos, los tipos de muestras y los parámetros requeridos para evaluar los procesos bacterianos involucrados en la producción de los CAs.

Tabla 4. Métodos y condiciones de estudio en la evaluación de los procesos involucrados en la producción de los CAs por las bacterias Gram negativas aisladas a partir de vainas de vainilla

Proceso	Método	Tipos de muestra	Parámetros de medición
Actividad pectinolítica (AP)	Por goteo	Sobrenadante/ Pellet	IAP
	Por pozo DNS, Miller	Sobrenadante	U·mL ⁻¹
Bioconversión del ácido ferúlico (BAF)	Por pozo	Pellet	IBAF
	HPLC/FTIR	Sobrenadante	P, R, Pr/%T
Resistencia a los compuestos aromáticos (RAC)	Espectrofotométrico	Cultivos de bacteria	CMI (µg·mL ⁻¹)

DNS. Ácido Dinitrosalicílico, FTIR (Espectroscopia Infrarroja por la transformada de Fourier). T. Transmitancia, ppm. (partes por millón); HPLC Cromatografía líquida de alto rendimiento, CMI Concentración mínima Inhibitoria, IBAF. (Índices de bioconversión del ácido ferúlico). IAP (Índice de actividad pectinolítica), P: concentración máxima del AV (ppm de AV), R: rendimiento del AV basado en el coeficiente de utilización del sustrato (ppm del AV/ppm del AF) y Pr: productividad del AV (ppm del AF/L*h).

9.3 Actividad pectinolítica (AP)

Se empleó un volumen de 10 mL de medio de crecimiento soya tripticaseína (TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland), fue inoculado con 10 µL de las bacterias Gram negativas del vial de criopreservación e incubado a 37 °C por 24 h alcanzando una concentración de 10³ UFC·mL⁻¹. El cultivo bacteriano fue centrifugado a 13000 rpm por 10 min y el paquete celular fue resuspendido en 150 µL de Tris-HCL buffer (50 mM y pH 7.0). El sobrenadante fue recuperado y pellet con metanol (1:2 v/v) y el extracto metanoico fue centrifugado a 13000 rpm por 10 min y el paquete celular fue resuspendido en el mismo buffer.

Con la ayuda de una punta estéril, se hizo un pozo de 9 mm de diámetro justo en el centro de la placa de agar medio MM-VP suplementado con 0.5% de pectina (Chatterjee *et al.*, 1995). Cada pozo fue inoculado con 150 µL del cultivo bacteriano (sobrenadante y pellet) e incubado a 37 °C durante 96 h. Para revelar la actividad pectinolítica, la placa Petri de agar MM-VP se cubrió con 10 mL de colorante Rojo Congo (RC) durante toda la noche y después de ese tiempo se colocaron 10 mL de solución de NaCl (5 M). La cual fue utilizada en la remoción del colorante en un periodo de 1-3 días, hasta observar zonas claras alrededor de la gota y el pozo. El diámetro de la zona clara fue considerado como criterio en la determinación de la AP de las cepas bacterianas (Attri y Garg, 2014). La AP se expresó en índices de actividad pectinolítica (IAP) (Eq 1).

IAP=Diámetro de la zona de hidrolisis/Diámetro del pozo y gota.....Ecuación 1

9.4 Producción de enzimas poligalacturonasas (PGsa)

Los pre-cultivos bacterianos fueron preparados en 3 mL de medio TSB para cada bacteria Gram negativa, inoculados a 37°C con 150 rpm durante 16-18 h de monitoreo. Posteriormente, un volumen de 100 µL del pre-cultivo (10^2 - 10^3 UFC·mL⁻¹) fue inoculado en 100 mL de medio TSB (contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL) e incubado a 37°C durante 24 h con agitación constante. El cultivo fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue filtrado con un Millipore® Stericup™ (0.45 µM), en condiciones de esterilidad. Después la muestra fue precipitada con 2 volúmenes de metanol, centrifugada a 10000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido se re-suspendió en 1 mL de buffer Tris-HCL 50 mM y pH: 7.0. El concentrado fue conservado en frío (-20 °C) hasta su uso en la cuantificación de la actividad poligalacturonasa por el método DNS.

9.5 Medición de la actividad enzimática

La actividad poligalaturonasa (APGs) fue analizada por método espectrofotométrico DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) de acuerdo con Miller, 1959. Se utilizó una curva estándar de calibración con el sustrato D-ácido poligalacturónico (D-APG) (Sigma–Aldrich Co. LLC, St Louis, Missouri, USA) (0.025-0.25 mg·mL⁻¹). La concentración del sustrato en los experimentos de la APGs fue 0.25 mg·mL⁻¹. La actividad específica (U=1 unidad de APGs) fue definida como la cantidad de enzima liberada en 1 µmoL de PGsa por unidad de tiempo por unidad de volumen (Demir y Tari, 2016).

9.6 Bioconversión del ácido ferúlico a los CAs

9.6.1 Ensayo en placa

Para la determinación de la AAF en las bacterias Gram negativas, 20 mL del cultivo bacteriano fueron centrifugados a 13000 rpm por 10 min y el pellet fue lavado y resuspendido en buffer de Tris-HCL 50 mM, pH 7.0. Las placas Petri de agar fueron preparadas en medio mínimo producción de vainillina (MM-VP) y 1.5% de agar, suplementados con AF (0.1 %) y glucosa (2%). Posteriormente, en la placa Petri de agar MM-VP se hizo un pozo o cavidad cilíndrica con ayuda de una punta estéril y se llenó con 150 µL de muestra y se incubaron a 37°C por un rango de tiempo 12-24 h hasta observar un cambio de color (verde al amarillo) indicando la AAF y glucosa en el medio. El

diámetro de la zona amarilla alrededor del pozo fue medido en cada una de las muestras. El IBAF fue calculado por la ecuación (2) (Zamzuri *et al.*, 2014).

IBAF=Diámetro de la zona amarilla/ diámetro del pozoEcuación 2

Donde IBAF = Índice de bioconversión del AF.

9.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los microorganismos fueron crecidos en 50 mL de MM-VP adicionado con AF al 0.1 % (v/v) y glucosa (2%) e incubada en un agitador orbital a 30°C, 180 rpm y 12 h de incubación en el monitoreo de ácido vanílico (*B. subtilis* IFVB, *C. amalonaticus* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *P. aeruginosa* IFVB) y 24 h en el monitoreo de vainillina (*E. cloacae* IFVB). La preparación de las muestras, reacciones y alícuotas fueron preparadas de acuerdo con Barghini *et al.*, (1998). Todas las alícuotas consideradas en la cuantificación de AV se tomaron de forma directa sin concentrar (10 mL) y las muestras para la cuantificación de vainillina se concentraron en rotavapor de un volumen inicial de 300 mL a volumen final de 5 mL. El sobrenadante obtenido de cada una de las muestras fue pellet con 2 volúmenes de etanol, se filtro con un Millipore® Stericup™ (0.2 µM). Entonces, una alícuota de 2 mL de muestra se analizó para la identificación y la cuantificación de del sustrato (AF) y del bioproducto (AV) por HPLC. El estándar de AF y AV fueron obtenidos a partir de Sigma–Aldrich Co. LLC, St Louis, Missouri, USA. El agua y acetonitrilo grado HPLC (E. Merck, Darmstadt, Alemania) fueron utilizados como una fase móvil. Los estándares de concentración y muestras fueron estimados por HPLC con un cromatógrafo Agilent modelo 1200, USA utilizando un detector UV-visible. El protocolo de elaboración de la curva de concentración de los estándares (ppm) y las muestras obtenidas de las bacterias Gram negativas fueron eluidas con un gradiente de concentración en acetonitrilo y agua (A:B), las concentraciones variaron de la siguiente manera: 15, 20, 40, 40 y 85 durante 15 min y a una velocidad de flujo de 0.8 mL·min⁻¹.

A partir de una solución stock (1000 µg·mL⁻¹) se prepararon diferentes diluciones y fueron empleadas en una curva de concentración de los estándares de AF, AV (1-50 µg·mL⁻¹) y C₈-AHL (1mM). La determinación fue hecha por duplicado (R²=0.95). El volumen de inyección de las muestras fue 10 µL y la fase móvil fue acetonitrilo/agua en base al protocolo de Barghini *et al.*, 1998. La separación de las muestras fue en una columna Supelcosil LC-18-S

(150 mm X 4.6 mm; Supelco Inc., Bellefonte, Pa.) con un protector de cartucho de 1-cm (Phase Separations Ltd., UK) a 37°C. La detección de las muestras se midió a una longitud de onda de 254 nm (AV y AF) y 240 nm (C₈-AHL). Las áreas de los picos y las representaciones gráficas fueron generadas con el programa Origin versión 8. Las concentraciones de AF y AV fueron cuantificadas, expresadas en ppm y los tiempos de retención de AV y AF (1.5 y 2.0 min, respectivamente) y el C₈-AHL se encontró a 2.1 min (Lau *et al.*, 2013). Mientras que, el rendimiento (R) y la productividad (P) de los CAs fueron medidos con las siguientes ecuaciones (3) y (4) (Zamzuri *et al.*, 2014):

Rendimiento (R) = Concentración del bioproducto (ppm)/ Concentración del sustrato (ppm).....Ecuación 3

Productividad (Pr) = Concentración del bioproducto (ppm)/Máximo tiempo del rendimiento (h)... Ecuación 4

9.7 Determinación de los grupos funcionales del AV y la C₈-AHL usando espectrometría Infrarroja con la Transformada de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales de los CAs obtenidas a partir de los microorganismos fueron analizados por espectrometría FTIR (Perkin Elmer Precisely, Salem Massachusetts USA) utilizando la técnica de reflectancia atenuada total (ATR) como una forma de muestreo. Las muestras de 50 µL fueron colocadas en la placa de vidrio ATR (cristal de ZnSe) del equipo. Tomando como línea base el espectro de la placa de vidrio de ATR sin muestra, la cual resta la absorción del ambiente. El tiempo de integración utilizado fue de 60 s (1 s por escaneo) y el espectro obtenido representa la media de todos los escaneos. El análisis fue realizado en la región infrarroja intermedia (400-4,000 cm⁻¹) con una resolución de 4 cm⁻¹. La adquisición y procesamiento de los datos fue realizada con el programa Spectrum 5.3.0 (Perkin-Elmer Precisely, Salem Massachusetts, USA). Con el objetivo de identificar los grupos funcionales y las muestras del estándar del AV (Sigma-Aldrich, Co. LLC, St Louis, Missouri, USA). Los datos obtenidos de FTIR fueron obtenidos de Microsoft Excel y graficados en el programa Origin versión 8 obteniendo la representación del espectro IR.

9.8 Determinación de la resistencia a los CAs

Los stocks de AV, vainillina y HBA (0.2 g·mL⁻¹) fueron utilizados en los experimentos de resistencia (Sigma-Aldrich, América). Se elaboraron varias diluciones de compuestos orgánicos y las concentraciones ensayadas fueron de 6-200000 µg·mL⁻¹. Un inóculo de 5 x10⁵ UFC·mL⁻¹ (50 µL) fue homogeneizado en medio TSB con las diferentes diluciones de cada compuesto orgánico, incubado a 37 °C de 18 a 24 h. La CMI fue determinada como la más baja

dilución, sin mostrar crecimiento visible y fueron definidas como la concentración de los CAs que inhibió el crecimiento bacteriano de las cepas Gram negativas (Cava *et al.*, 2012).

9.9 Cuantificación de la producción del autoinductor-1 de los microorganismos de estudio

Se considerarán cultivos en medio rico (TSB) para obtener mayor producción del autoinductor (Miller *et al.*, 2002). El monitoreo de las muestras de los cultivos bacterianos fue en los tiempos de monitoreo de 2, 4, 8, 12, 24 y 28 h. El crecimiento microbiano se cuantificó mediante diluciones seriadas en medio TSB con su antibiótico correspondiente. El recuento de las colonias fue elaborado después de 24 h de incubación a la temperatura correspondiente.

9.10 Lisado libre de células del microorganismo reportero *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372)

50 μL de la cepa *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) se inóculo en 250 mL de medio mínimo AT, cuya formulación consiste en glucosa 2 %, KH_2PO_4 (0.079M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.015 M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 mM), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.06mM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.027 mM) y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0071 mM) disueltos en agua destilada y con un ajuste a pH 7.0 con NaOH 1 N, se adicionó estreptomicina ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y tetraciclina ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). La temperatura de incubación fue 30°C , con agitación constante por 18 h, alcanzando la fase temprana exponencial y después se colectó por centrifugación (12000 rpm y 10 min). Los sedimentos se recolectaron y re-suspendieron en 5 mL de buffer KH_2PO_4 (100 mM y pH 7.4), se sonicaron tres veces por 30 s y se centrifugó a 12000 rpm, 4°C por 30 min, removiendo los fragmentos celulares. Los sobrenadantes se alicuotaron en tubos de 1 mL y almacenaron a -80°C hasta su uso en los bioensayos.

9.11 Extractos del autoinductor-1 (Acil Homoserina Lactonas, AHLs)

Se empleó un volumen de 10 mL de medio de crecimiento soya tripticaseína (TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland), el cual fue inoculado con 10 μL de las bacterias Gram negativas del vial de criopreservación e incubado a 37°C por 24 h alcanzando una concentración de $10^3 \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Se utilizaron 10 mL obtenidos del sobrenadante de un cultivo de 24 h de incubación de cada una de las cepas Gram negativas. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces consecutivamente con 10 mL de acetato de etilo (acidificado con 0.5% de ácido fórmico). Los extractos se evaporaron con nitrógeno de alta pureza hasta su totalidad y se re-

suspendieron con 1 mL de buffer KH_2PO_4 (20 Mm y pH 7.0) y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Rasch *et al.*, 2005).

9.12 Detección de AHLs por bioensayo

Se utilizó una placa de 96-pozos donde se depositaron: 50 μL del extracto con AHLs, 50 μL del lisado libre de células del microorganismo reportero y 100 μL de KH_2PO_4 (20 mM y pH 7.0), mismos que se homogeneizaron e incubaron a 30°C durante 2 h. Posteriormente, se adicionó el sustrato cromogénico 1 μL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactopiranosido) ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), volviéndose a homogeneizar e incubar a 30°C por 1 h. La reacción colorimétrica se monitoreó a una absorbancia de 635 nm, las mediciones se realizaron por triplicado con un lector de placas Multiskan Ascent Marca Thermo. Los índices de inducción de la actividad de expresión de la β -galactosidasa se expresaron como ID.

9.13 Análisis de datos

Las muestras (pellet y sobrenadante), los métodos (goteo y pozo) y las bacterias Gram positivas (*B. subtilis* IFVB y *B. cereus* IFVB) y Gram negativas (*P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB) fueron considerados recursos de variación. Los resultados fueron analizados utilizando un modelo equivalente al análisis balanceado completamente al azar. La comparación de medias entre los tratamientos fue realizada por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis estadístico fue realizado con el programa Statistix 10. Todos los resultados reportados son las medias de los duplicados en 2 experimentos independientes.

RESULTADOS

10.1 Aislamiento y selección de las cepas bacterianas Gram positivas de las vainas de vainilla durante las etapas del curado.

Se aislaron 81 cepas Gram positivas de las vainas de vainilla de las diferentes etapas del curado y regiones (Rancho Snta. Beatriz, Papantla, Ayotoxco y Pantepec, pertenecientes a los estados de Puebla y Veracruz). Con la colección de cepas se hizo un tamiz por dos métodos (goteo y pozo) con el objetivo de buscar dos procesos bacterianos relacionados con la liberación de precursores de los CAs: (1) la actividad pectinolítica (AP) y (2) la asimilación del AF (AAF). En las tablas 5 y 6 se presentan los resultados de los métodos de goteo y pozo.

Tabla 5. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género *Bacillus* en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de goteo)

Etap	Procedencia	Aislamiento	Especie
1	Pantepec	22	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Primera de Mayo	23	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Ayotoxco	24	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Papantla	26	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Ayotoxco	103	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Ayotoxco	104	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	105	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Pantepec	209	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	120	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	121	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	122	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Pantepec	35	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Primera de Mayo	38 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Papantla	39 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Ayotoxco	40 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Primera de Mayo	50 (77)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	51 (77)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Papantla	52 (77)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
2	Pantepec	54	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	64	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	67	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	70 (2)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Ayotoxco	137	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Ayotoxco	160	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Ayotoxco	161	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	200 (59)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	201 (59)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	200 (59.1)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	201 (59.1)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	200 (60)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	201 (60)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	200 (61)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	201 (61)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Papantla	201	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	202	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Ayotoxco	204	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Ayotoxco	205	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
2	Pantepec	207	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Ayotoxco	31	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	32	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB

Tabla 5. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género *Bacillus* en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de goteo) (continuación)

Etapas	Procedencia	Aislamiento	Especie
3	Rancho Snta. Beatriz	33 (101)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	33 (130)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	34 (102)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	34 (103)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
3	Pantepec	36	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Pantepec	37	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primero de Mayo	38 (94)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primero de Mayo	38 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primero de Mayo	38 (98)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Papantla	39 (103)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Papantla	39 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Pantepec	53 (101)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
3	Ayotoxco	133 101)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Papantla	39 (98)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Ayotoxco	40 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Ayotoxco	41	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	45 (82)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (79)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Pantepec	54 (102)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (131)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Ayotaxco	40 (100)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	46 (84)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	47 (80)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	47 (79)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primero de Mayo	50 (76)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Primero de Mayo	50	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Pantepec	45 (82)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (102)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Papantla	39 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (78)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (79)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (99)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	42 (95)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (131)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (132)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Pantepec	47 (74)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	47 (80)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	45 (82)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
4	Primero de Mayo	50 (77)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB

Tabla 6. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género *Bacillus* en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de pozo)

Etapa	Procedencia	Aislamiento	Especie
1	Pantepec	22	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Primera de Mayo	23	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Ayotoxco	24	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Papantla	26	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Pantepec	35	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Ayotoxco	103	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Ayotoxco	104	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	105	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	122	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	121	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
1	Rancho Snta. Beatriz	120	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
1	Pantepec	209	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
2	Pantepec	35	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Primero de Mayo	38 (99)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
2	Papantla	39 (99)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
2	Ayotoxco	40 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Primero de Mayo	50 (77)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	51 (77)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
2	Papantla	52 (77)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
2	Pantepec	54	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	64	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	67	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	70 (2)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Ayotoxco	137	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Ayotoxco	160	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Ayotoxco	161	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	200 (59)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201 (59)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	200 (59.1)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201 (59.1)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	200 (59)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201 (59)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	200 (60)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201 (60)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	200 (61)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201 (61)	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Papantla	201	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Primera de Mayo	202	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Ayotoxco	204	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB
2	Ayotoxco	205	<i>Bacillus subtillis</i> IFVB

Tabla 6. Resultados positivos de AP y AAF a partir de los aislamientos del género *Bacillus* en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (método de pozo) (continuar)

Etapas	Procedencia	Aislamiento	Especie
2	Pantepec	207	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Ayotoxco	31	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	32	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	33 (101)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	33 (130)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	34 (102)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Rancho Snta. Beatriz	34 (103)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Pantepec	36	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Pantepec	37	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primera de Mayo	38 (94)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primera de Mayo	38 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Primera de Mayo	38 (98)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Papantla	39 (103)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Papantla	39 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
3	Pantepec	53 (101)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
3	Ayotoxco	133 (101)	<i>Bacillus</i> sp. IFVB
4	Papantla	39 (97)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Ayotoxco	40 (99)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Ayotoxco	41	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	42 (95)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (130)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (131)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	43 (132)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Rancho Snta. Beatriz	44	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	45 (82)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	46 (84)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	47 (79)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (75)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	49 (79)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Primera de Mayo	50	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Primera de Mayo	50 (78)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primera de Mayo	50 (76)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB
4	Pantepec	45 (102)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	46 (84)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Pantepec	45 (81)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Ayotoxco	40 (100)	<i>Bacillus cereus</i> IFVB
4	Primero de Mayo	50 (77)	<i>Bacillus subtilis</i> IFVB

10.2 Búsqueda de la actividad pectinolítica (AP) en el género *Bacillus*

De los aislamientos de las diferentes etapas y regiones del muestreo se obtuvieron 81 cepas del género *Bacillus*. Además, se observaron 2 morfologías distinguiendo dos especies: *Bacillus cereus* IFVB (38 cepas, correspondiente al 39% de los aislamientos) que se caracterizan por mostrar una colonia definida cuya coloración en el medio es rosa (figura 13 A) y *Bacillus subtilis* IFVB (49 cepas, correspondiente al 61% de los aislamientos). *Bacillus subtilis* se caracteriza por una colonia definida cuya coloración en el medio es amarilla (figura 13 B). También se reportaron los porcentajes de frecuencia de aislamiento de las cepas de *Bacillus*. Los resultados se organizaron por cepa (*Bacillus subtilis* IFVB, *Bacillus cereus* IFVB y *Bacillus sp.* IFVB) en cada una de las etapas del beneficiado. Los porcentajes en la etapa 1 correspondieron a (77%), (15%) y (8%), en la etapa 2 (80%), (10%) y (10%), en la etapa 3 (26%), (61%) y (13%) finalmente, en la etapa 4 (47%) y (53%), respectivamente.

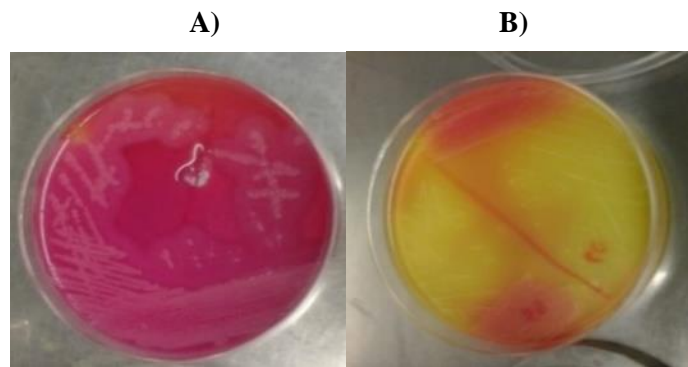


Figura 13. Identificación por morfología colonial de los géneros (A) *B. subtilis* IFVB y (B) *B. cereus* IFVB en medio MYP (Slepecky *et al.*, 2006).

10.3 Actividad pectinolítica en los aislados de *Bacillus*

El tamiz de la AP se elaboró en todas las etapas del beneficiado de la vainilla por el método de goteo. Hallando 22 cepas (1 cepa de *B. cereus* IFVB y 21 cepas de *B. subtilis* IFVB) fueron positivas a la prueba de AP. En la figura 14A se observa algunos resultados representativos de los halos de hidrólisis enzimática.

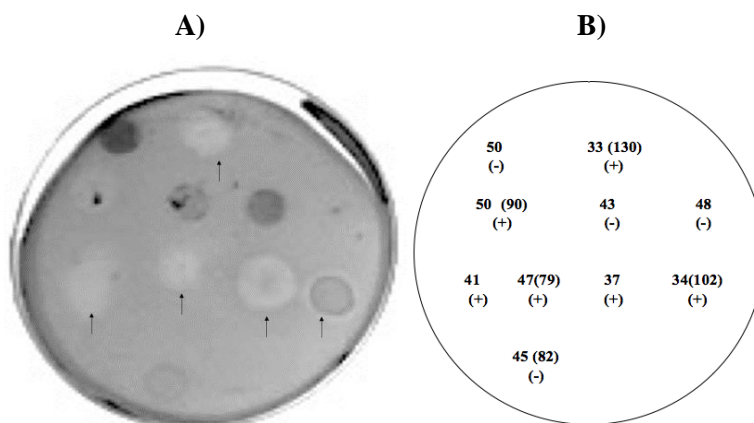


Figura 14. Selección de microorganismos por tamiz de la AP en placa Petri de agar MM-P del sobrenadante por el método de goteo de los aislados de *Bacillus* obtenidos de las diferentes etapas del proceso del curado de la vainillina. **Panel A.** Las cepas con AP presentan un halo de hidrólisis enzimática en el sitio de inoculación de la gota del extracto proteico. **Panel B.** Posición e interpretación de AP de los extractos proteicos por cepa. Códigos: 50 (*B. cereus* IFVB), 33 (130) (*B. subtilis* IFVB). 50 (90) *B. subtilis* IFVB, 43 (*B. subtilis* IFVB), 48 (*B. subtilis* IFVB), 41 (*B. cereus* IFVB), 47 (79) (*B. cereus* IFVB), 37 (*B. cereus* IFVB), 34 (102) (*B. cereus* IFVB), y 45 (82) (*B. subtilis* IFVB). Actividad pectinolítica positiva (+) y sin actividad pectinolítica (-).

En la figura 15A y 15B se observan los resultados de la determinación de la AP de las cepas de *Bacillus* por los métodos de goteo y pozo. El análisis estadístico de los resultados de AP de las cepas obtenidas de las diferentes etapas del curado de la vainilla indicó que no hay diferencias significativas en el índice de hidrólisis enzimática entre las cepas y etapas del curado de las vainas de vainilla (Tabla 7).

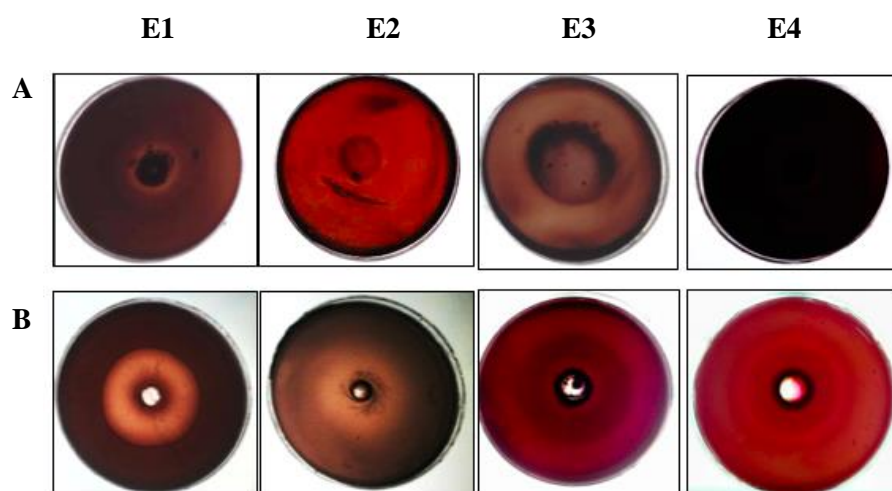


Figura 15. Prueba de actividad pectinolítica en placa Petri de agar MM-P de las cepas de *Bacillus* aisladas de *V. planifolia*. **Panel A.** Método de goteo (EA1-EA4) y **Panel B.** Método de pozo (EB1-EB4). Todos los extractos proteicos se obtuvieron de las cepas del género *Bacillus* aisladas de las diferentes etapas del proceso del curado de *V. planifolia*.

Tabla 7. Promedio de los índices de actividad pectinolítica (IAP) a partir de extractos proteicos de las cepas de *Bacillus* aisladas de las diferentes etapas del curado de *V. planifolia*

Etapa	IAP (Método de pozo)
E1	2.07±1.18 ^A
E2	1.88±0.73 ^A
E3	1.43± 0.70 ^A
E4	1.96 ± 1.42 ^A

E1= recepción, E2= matado, E3= sudado y E4= almacenamiento. ^A Letras iguales indican que no hay diferencia significativa.

10.4 Asimilación del ácido ferúlico (AAF) en el género *Bacillus*

Se analizaron 2 condiciones de monitoreo de las placas Petri de agar MMVP (37°C y 50°C). El 53% de las cepas de *Bacillus* fueron positivas demostrando que tienen la capacidad de AAF a 37°C y el 40% de las cepas AAF a 50°C. Mientras que, el 7% AAF en ambas condiciones de monitoreo (37°C y 50°C). En la figura 16A se pueden observar los resultados representativos de las cepas de *Bacillus*.

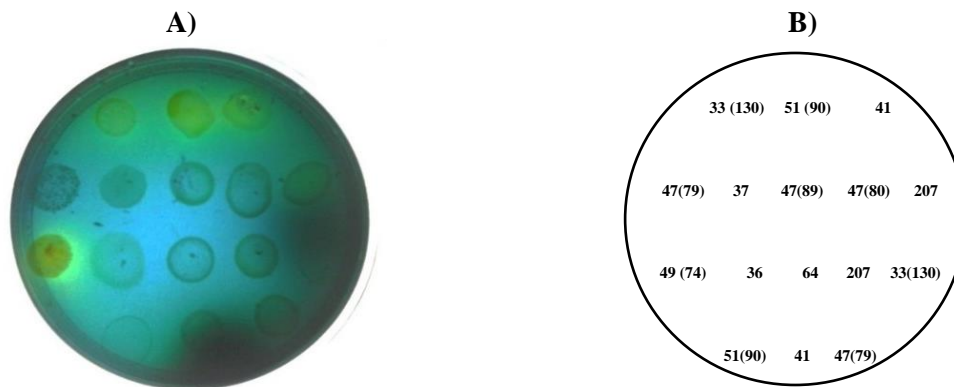


Figura 16. Selección de microorganismos *Bacillus cereus* IFVB y *Bacillus subtilis* IFVB por tamiz de la AAF en placa Petri de agar MM-VP por el método de goteo. **Panel A.** Las cepas con actividad feruloil esterasa viran el color del medio (verde al amarillo) en el sitio de inoculación de la gota del extracto proteico. **Panel B.** Posición e interpretación de los extractos proteicos por cepa y entre paréntesis la interpretación de los códigos de las cepas de estudio: 33 (130) (*B. subtilis* IFVB), 51 (90) (*B. cereus* IFVB), 41 (*B. cereus* IFVB), 47(79) (*B. cereus* IFVB), 37 (*B. cereus* IFVB), 47(89) (*B. cereus* IFVB), 47(80) (*B. cereus* IFVB), 207 (*B. subtilis* IFVB), 49 (74) (*B. subtilis* IFVB), 36 (*B. cereus* IFVB), 64 (*B. subtilis* IFVB), 207 (*B. subtilis* IFVB), 33 (130) (*B. subtilis* IFVB), 51 (90) (*B. cereus* IFVB), 41 (*B. cereus* IFVB) y 47 (79) (*B. cereus* IFVB).

Posteriormente, se calcularon los IAAF de cada una de las cepas de estudio por los métodos de goteo y pozo. Los resultados se observan en la figura 17A y 17B, donde se distingue la formación de halos de AAF en los aislamientos.

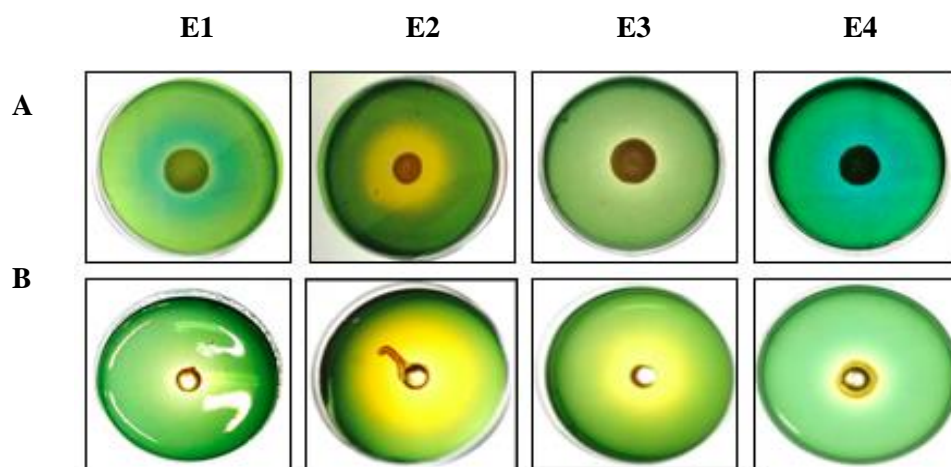


Figura 17. Prueba de confirmación de la asimilación del ácido ferúlico (AAF) en placa Petri de agar MM-VP de las cepas de *Bacillus* aisladas de *V. planifolia*. **Panel A.** Método de goteo (AE1-AE4) y **Panel B.** Método por pozo (BE1-BE4). Todos los extractos proteicos se obtuvieron de las cepas del género *Bacillus* aisladas de las diferentes etapas del sistema tradicional de la producción de la vainilla (E1= recepción, E2= matado, E3= sudado y E4= almacenamiento).

Mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos se encontró un IAAF mayor en las cepas de *Bacillus* aisladas en la etapa 2 del curado (Tabla 8). También se detectó que después de incubar 24 h las placas Petri de agar MM-VP presentaban aromas, lo cual es un indicativo de la producción de los CAs (bajo condiciones *in vitro*). Con estos datos, se concluye que los microorganismos son capaces de contribuir en el proceso de la liberación de los precursores de los CAs por acción de EP y que a su vez pueden asimilar dichos precursores y posiblemente bioconvertirlos a los CAs.

Tabla 8. Promedio de los índices de asimilación del ácido ferúlico (IAAF) en cepas del género *Bacillus* aisladas de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla

Etapa	IAAF (Método por pozo)
E1	1.63±0.77 ^{A, B}
E2	2.01±0.95 ^A
E3	1.32± 0.59 ^{B, C}
E4	0.99 ± 0.77 ^C

E1= recepción, E2= matado, E3= sudado y E4= almacenamiento. ^{AB} Letras diferentes indican que hay diferencias significativas.

10.5 Identificación y cuantificación por HPLC del ácido vanílico en el género *Bacillus*

La cepa *B. subtilis* representó a la especie aislada con mayor frecuencia de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla. El cromatograma representativo de los estándares de AF, AV y la muestra obtenida de *B. subtilis* IFVB se observa en la figura 18 con una concentración de AV de 63.74 ± 3.69 ppm.

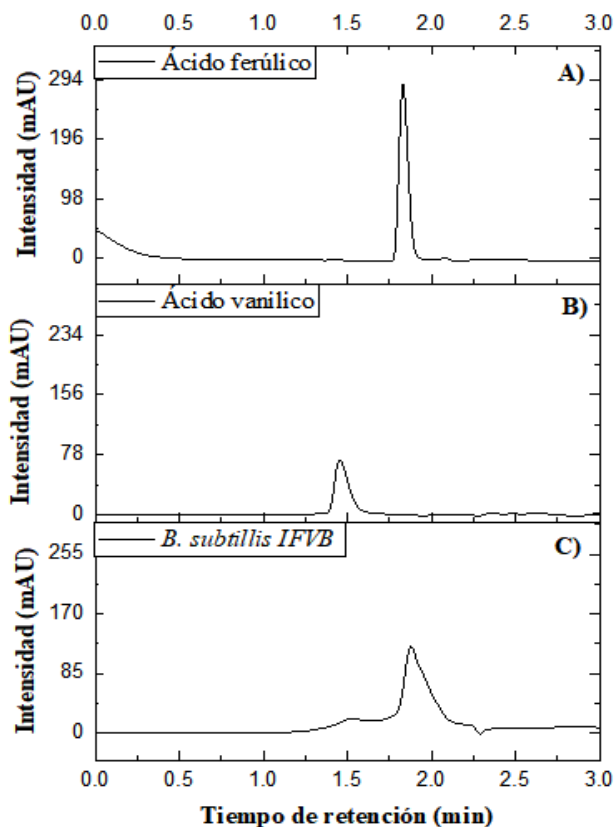


Figura 18. Cromatograma representativo de la producción de AV del AF. **Panel A:** ácido vanílico (estándar), **Panel B:** ácido ferúlico (estándar) y **Panel C:** *B. subtilis* IFVB. Tiempos de retención del ácido ferúlico=2.058 min y ácido vanílico=1.56 min DAD1 A, Sig= 254 nm.

10.6 Aislamiento y selección de las bacterias Gram negativas provenientes de las diferentes etapas del proceso del curado de *V. planifolia*

Continuando con el objetivo de encontrar microorganismos involucrados en los procesos relacionados con la producción y resistencia a los CAs, se aislaron 16 bacterias Gram negativas en medio selectivo McConkey.

Posteriormente, las cepas fueron seleccionadas por tamiz en MM-P (aislamientos 8, 10, 12, 14, 15 y 16). Las cepas mostraron halos intermedios y altos de AP en comparación con otras bacterias Gram negativas evaluadas y se seleccionaron 3 cepas (8, 11 y 12), el criterio fue que mostraron mayor intensidad del halo de AP (Figura 19 A).

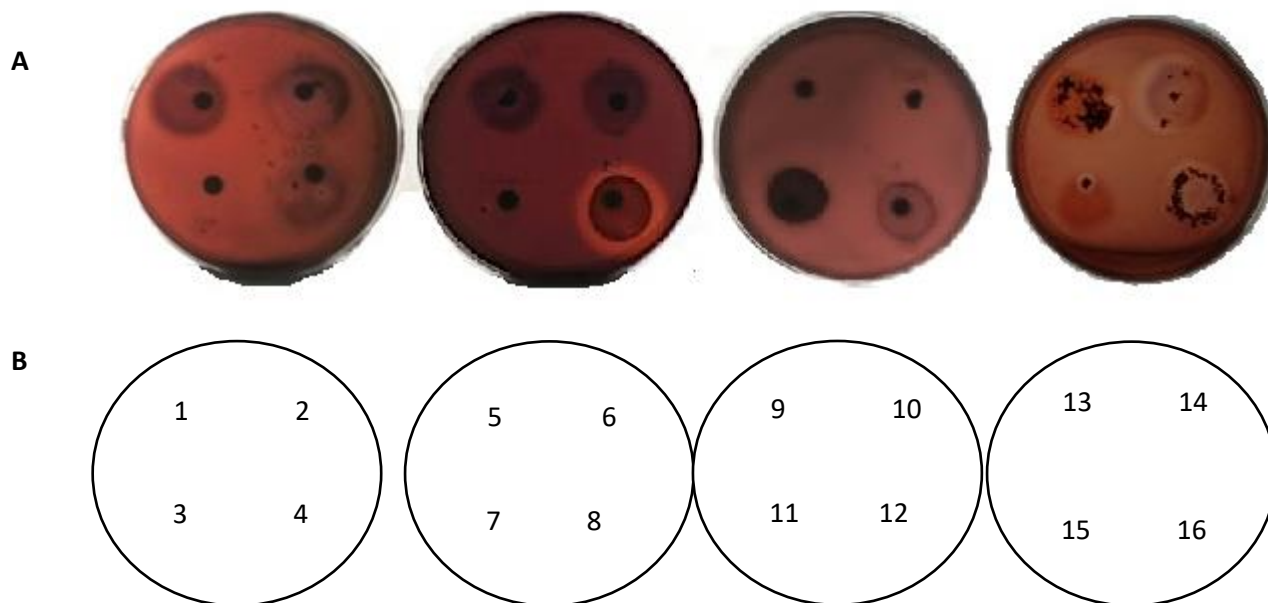


Figura 19. Selección de microorganismo por tamiz de la AP en placa Petri de agar MM-P del sobrenadante de 16 bacterias Gram negativas aisladas de las diferentes etapas del curado de las vainas de vainilla por el método de goteo. **Panel A.** Producción de la AP. **Panel B.** Orden de las muestras: Resultados negativos (Muestras 1-7), Intensidad intermedia del halo de AP (muestras 13, 14 y 16) y mayor intensidad del halo de AP (Muestras 8, 10, 11 y 12).

10.7 Identificación de las bacterias Gram negativas por pruebas bioquímicas, VITEK, confirmación del género y especie por secuenciación parcial del gen 16S del rRNA

Los aislamientos 8, 11 y 12 fueron seleccionados para continuar con el estudio, fueron sembrados por estría cruzada en medio selectivo MacConkey y Cetrímide. Se analizó la morfología colonial y cambio de pH en medio selectivo y se identificó que la cepa 8 fue resistente al medio Cetrímide y formó colonias azul-verde además produjo colonias lactosa negativa en medio MacConkey. Mientras que, la cepa 11 creció en medio MacConkey formando colonias rosas correspondientes a bacterias que son fermentadoras de lactosa. Finalmente, se encontró que la cepa 12 se distinguió por las colonias rosas o sin coloración (después de 24 h), con una morfología característica de ojo de pescado, un centro rosado rodeado por un contorno claro después de las 24 h de crecimiento correspondiente al género *Citrobacter* (Stolp *et al.*, 1981, Borenshtein *et al.*, 2006 y Grimont *et al.*, 2006).

Posteriormente, se analizaron los resultados de las pruebas bioquímicas y VITEK de cada uno de los aislados indicando que las bacterias Gram negativas pertenecen al género *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Citrobacter* sp. Estas cepas fueron designadas con los sufijos IFVB (Aislado a partir de vainas de vainilla, por sus siglas en inglés) por la procedencia de las cepas. La confirmación del género por la amplificación parcial, concentración y secuenciación del gen 16S rRNA (1365 nt) del DNA genómico de las tres cepas bacterianas (Figura 20A). El producto purificado fue enviado a la unidad de secuenciación del IBT y del Centro de detección Biomolecular. En base al análisis de los resultados de las secuencias parciales del gen 16S del rRNA, mediante la herramienta BLAST se demostró que las cepas en comparación con su ancestro en común correspondieron a los siguientes géneros y especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter amalonaticus*, mostrando una similitud del 99%, 93% y 97%, respectivamente. Con una cobertura de secuencia del 100%, 100% y 98%, en cada una de las cepas. Finalmente, las cepas se registraron con los siguientes números de acceso: MN075198.1 (*P. aeruginosa*), MN075197.1 (*E. cloacae*) y MN075204.1 (*C. amalonaticus*).

También, se elaboró un árbol filogenético con las secuencias parciales del gen 16S del rRNA, se comparó con la base de datos de NCBI y con las secuencias bacterianas relacionados con aislamientos obtenidos del fruto *V. planifolia*. Los resultados indicaron que los ancestros en común de cada una de las cepas fueron: *P. aeruginosa*, *Enterobacter* sp. cepa 14 y *C. amalonaticus* cepa SH-3 con porcentajes de similitud del 84%, 86% y 64%, respectivamente (Figuras 20B, 20C y 20D).

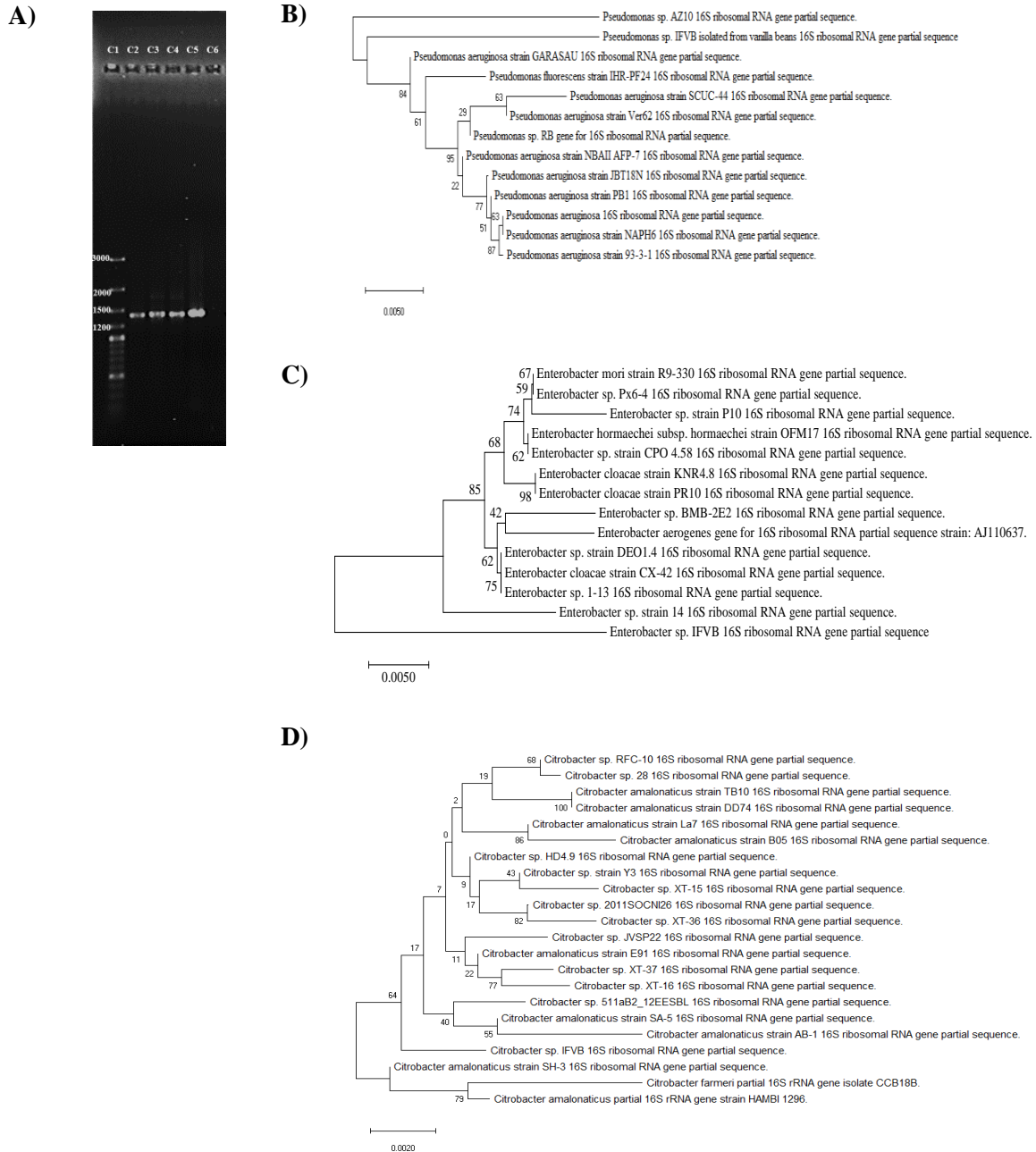


Figura 20. (A) Electroforesis en gel de los productos de PCR del gen 16S rRNA de las tres cepas Gram negativas aisladas del proceso del curado de *V. planifolia*. Carril 1. Marcador de peso molécula de 3000 pb, carril 2. Control positivo *E. coli* cepa CFT073, carril 3. *C. amalonaticus* IFVB, carril 4. *E. cloacae* IFVB, carril 5. *P. aeruginosa* IFVB y carril 6. Blanco (agua). Los productos de amplificación fueron de 1375 pb. (B) El árbol filogenético que demuestra la localización taxonómica entre las especies vecinas de *P. aeruginosa* IFVB (C) *E. cloacae* IFVB y (D) *C. amalonaticus* IFVB.

10.8 Procesos relacionados con la producción de compuestos aromáticos

10.9 Determinación de la actividad pectinolítica (AP)

La AP fue evaluada en *P. aeruginosa* IFVB. Esta cepa presentó el diámetro más alto de AP usando el pellet por el método de pozo (4.3 cm) (Figura 24 y Panel IV). Mientras que los resultados de la cepa de *E. cloacae* IFVB variaron a partir de 1.7 a 2.9 cm y en la cepa de *C. amalonaticus* IFVB cuyos diámetros cambiaron de 1 a 4 cm (Figura 21, Panel V y VI).

Comparando con los resultados respecto a los 2 tipos de muestra utilizados en cada método, los diámetros de la AP de la cepa de *E. cloacae* IFVB fueron observados en el sobrenadante por los métodos de goteo y pozo. Por otro lado, los diámetros máximos de la AP en *C. amalonaticus* IFVB fueron 2.2 y 4 cm en el pellet y el sobrenadante por los métodos de goteo y pozo, respectivamente confirmando que el mejor método fue por pozo (Figura 22).

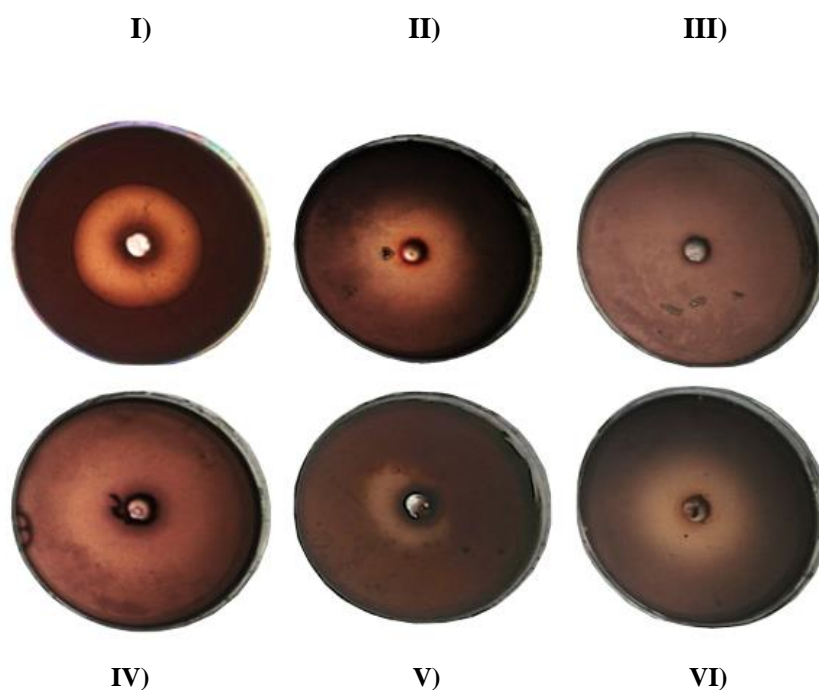


Figura 21. La determinación de la actividad pectinolítica (AP) en placa Petri de agar MM-P de las bacterias Gram negativas aisladas de las vainas de vainilla. Imagen de la AP obtenida del sobrenadante (I, II y III) y del pellet (IV, V y VI) por el método de pozo. Las cepas de *P. aeruginosa* IFVB (Panel I y IV), *E. cloacae* IFVB (Panel II y V) y *C. amalonaticus* IFVB (Panel III y VI).

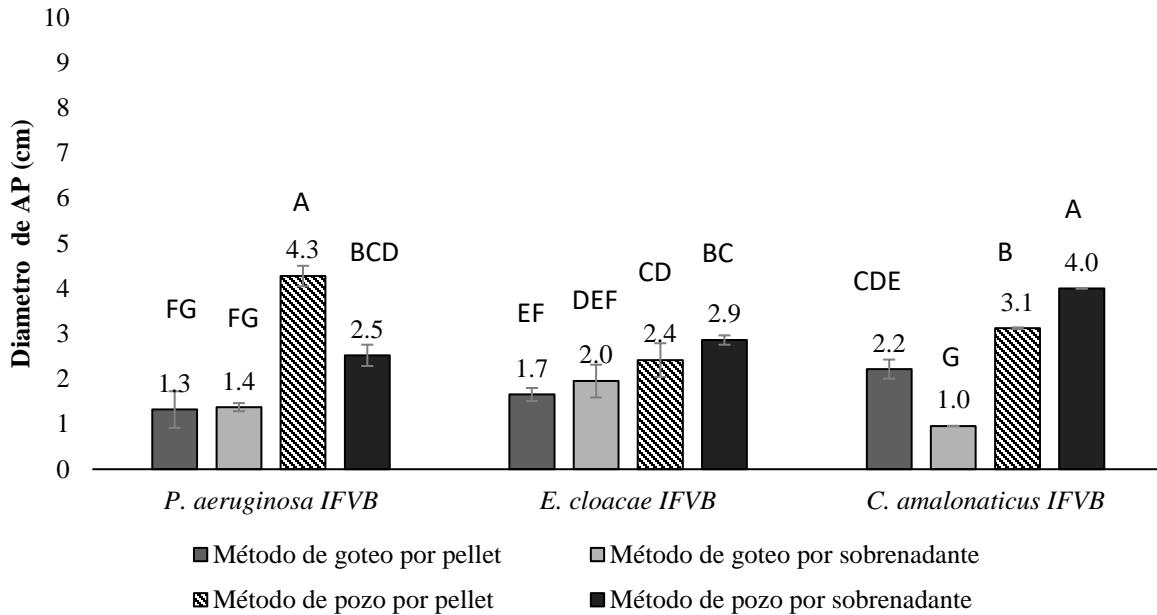


Figura 22. El diámetro de AP (cm) obtenido del pellet y el sobrenadante, por los métodos de goteo y pozo en placa Petri de agar MM-P. La media estándar de desviación fue n=3. Las letras en mayúscula indicaron diferencias significativas entre los métodos y microorganismos ($p \leq 0.05$).

La segunda evaluación de la AP consistió en cuantificar la actividad enzimática y fue expresada como Índices de inducción de AP (IAP). La cepa *P. aeruginosa* IFVB mostró el más alto IAP por el método por pozo utilizando el pellet. Mientras que, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB mostraron el más alto IAP en el sobrenadante usando el mismo método (Tabla 9).

Tabla 9. El índice de actividad pectinolítica (IAP) fue evaluado por los métodos de goteo y pozo en placa Petri de agar MM-P de las bacterias Gram negativas aisladas de las vainas de vainilla

Método 1: goteo

Fuente	<i>P. aeruginosa</i> IFVB	<i>E. cloace</i> IFVB	<i>C. amalonaticus</i> IFVB
Sobrenadante	1.53±0.26 ^{FG}	2.16±0.12 ^{DEF}	1.06±0.01 ^G
Pellet	1.47±0.25 ^{FG}	1.84±0.40 ^{EF}	2.47±0.02 ^{CDE}

Método 2: pozo

Sobrenadante	2.8±0.10 ^{BCD}	3.17±0.40 ^{BC}	4.45±0.01 ^A
Pellet	4.75±0.45 ^A	2.68±0.23 ^{CD}	3.46±0.23 ^B

Los valores de la derivación de la media estándar (n=3). Las letras en mayúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las letras en negritas indican los valores altos.

Finalmente, la AP fue cuantificada por el método DNS y los resultados de *P. aeruginosa* IFVB demostraron la actividad poligalacturonasa (APGs) de $104.11 \pm 10.92 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ en 24 h de incubación. Mientras que, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB presentaron valores más altos respecto a *P. aeruginosa* IFVB, pero similares entre ellas ($76.07 \pm 12.47 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $70.31 \pm 3.64 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente) (Figura 23).

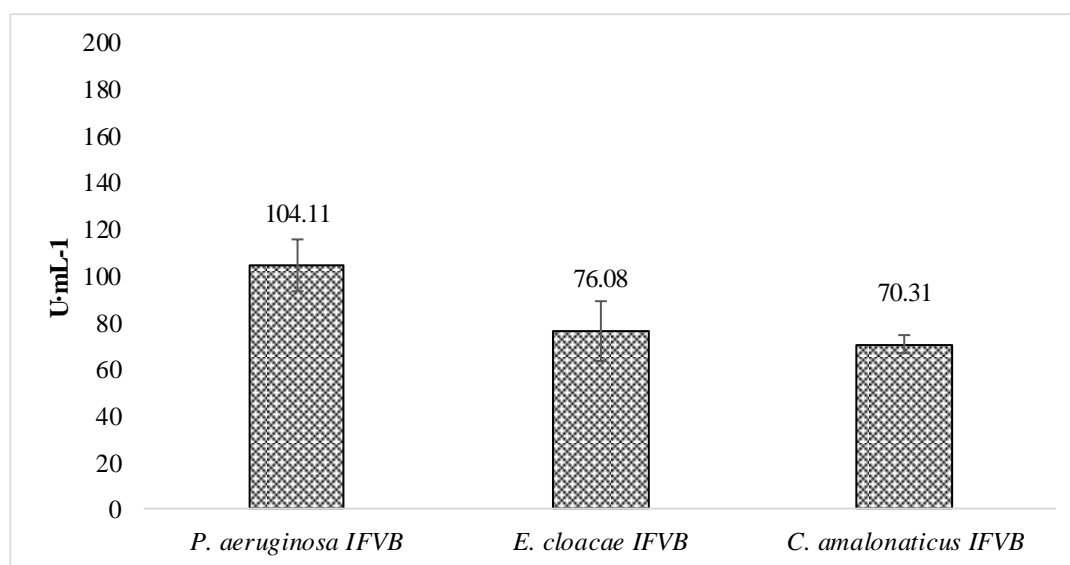


Figura 23. Determinación de la APG por método DNS de las cepas Gram negativas aisladas del proceso del curado de las vainas de vainilla.

10.10 La asimilación del ácido ferúlico (AAF) por HPLC

Para la determinación del segundo proceso bacteriano se realizó un tamiz usando extractos proteicos de los diferentes aislados de las bacterias Gram negativas provenientes de las etapas del curado de las vainas de vainilla usando el método de goteo y se encontraron resultados positivos representados como halos amarillos después de la incubación del medio conteniendo como sustrato AF (Figura 24A). Entre los aislamientos se encontraron los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Klebsiella* y algunas cepas cuyo género no fue identificado.

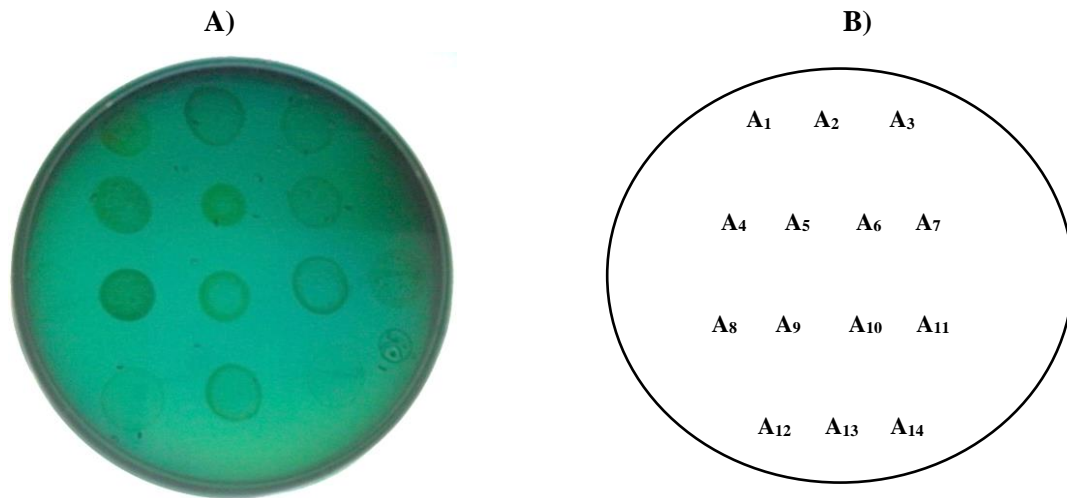


Figura 24. Selección de microorganismos Gram negativos por tamiz de la AAF en placa Petri de agar MM-VP por el método de goteo usando extractos proteicos de las bacterias Gram negativas obtenidas de las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla **Panel A**. Las cepas que llevan a cabo AAF viran el color del medio de verde al amarillo en el sitio de inoculación de la gota del extracto proteico. **Panel B**. Posición e interpretación de los extractos proteicos por cepa. Códigos: A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, A₇, A₈, A₉, A₁₀, A₁₁, A₁₂, A₁₃ y A₁₄. A=Aislado.

Los resultados de AAF fueron confirmados por el ensayo en placa Petri en agar MM-VP por el método de pozo y se determinó el índice de AAF o IAAF. Los valores de IAAF de las 3 bacterias evaluadas presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) utilizando este método, *E. cloacae* IFVB y *P. aeruginosa* IFVB alcanzaron los valores más altos de IAAF (4.38 ± 0.11 y 4.37 ± 0.23) respecto a los obtenidos por *C. amalonaticus* IFVB (2.70 ± 0.32) (Figura 25A, 25B y 25C). Finalmente, el IBAF no han sido reportado en otros estudios. Este índice podría ser propuesto como un método cuantitativo para comparar la capacidad de asimilación de algunos de los CAs producidos por diferentes microorganismos.

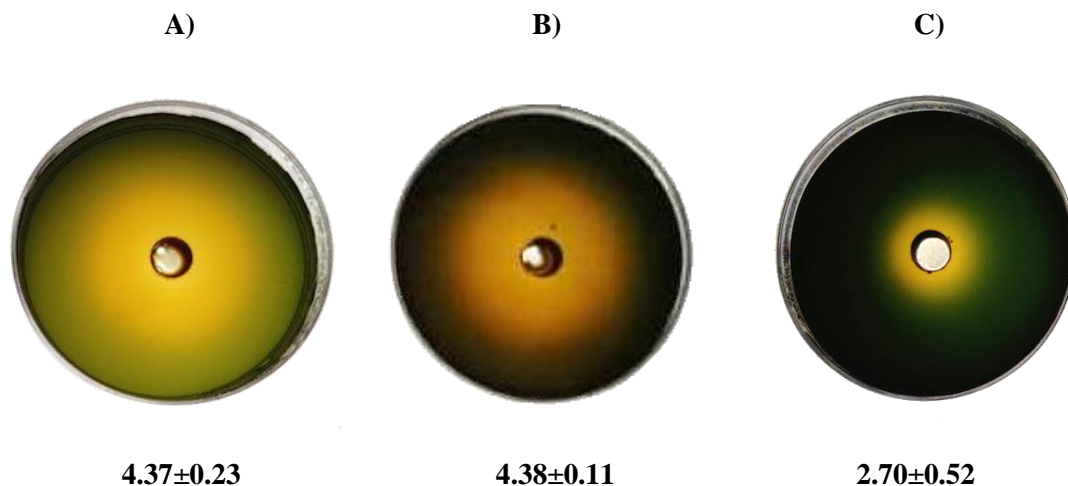


Figura 25. Determinación de la AAF de las cepas Gram negativas por el método de pozo en placa Petri de agar MM-VP. Suplementado con AF (A) *P. aeruginosa* IFVB, (B) *E. cloacae* IFVB y (C) *C. amalonaticus* IFVB.

10.11 Producción e identificación del ácido vanílico (AV) por HPLC

Las bacterias Gram negativas fueron analizadas por su habilidad de producir CAs en el medio MM-VP usando las células en reposo (Barghini *et al.*, 1998 y Zamzuri *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos por HPLC demostraron que, bajo las condiciones de células en reposo, en presencia del AF (como precursor), la cepa de *P. aeruginosa* IFVB que fue de 0.971 ± 0.1700 ppm de AV ($R=0.0034$ y $P=26.9$), para *E. cloacae* IFVB fue de 4.349 ± 0.084 ppm de AV ($R=0.013$ y $P=26.9$) y *C. amalonaticus* IFVB produjo una concentración de 2.1185 ± 0.1018 ppm de AV ($R=0.0065$ y $P=26.9$) (Figura 26-I). Todas las bacterias Gram negativas produjeron AV durante la fase exponencial (19.11 ± 0.70 , 18.24 ± 1.41 y 15.23 ± 0.2 UFC·mL⁻¹, Figura 26B). Los resultados confirmaron que el mayor potencial de bioconversión del AF al AV correspondieron a las cepas de *P. aeruginosa* IFVB y *E. cloacae* IFVB en comparación con la cepa de *C. amalonaticus* IFVB.

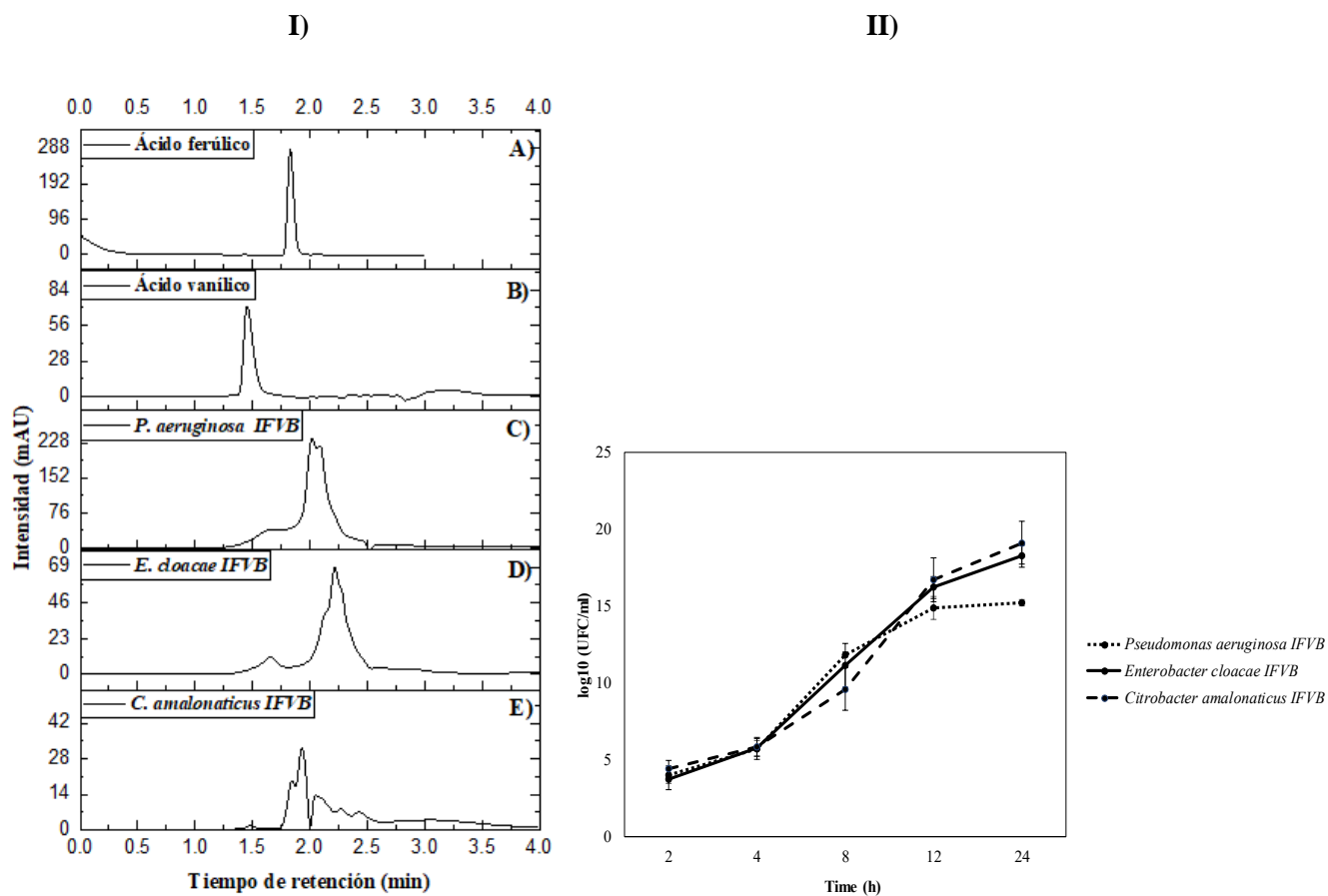


Figura 26 (I) Cromatogramas del estándar de AV, AF y la producción del AV en *P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB (cultivos individuales) y **(II)** Curvas de crecimiento de las cepas Gram negativas.

10.12 Identificación de los grupos funcionales del AV por metodología FTIR

Para la caracterización del AV producido por las 3 bacterias Gram negativas se utilizó la técnica FTIR. Las principales bandas de absorción del espectro FTIR del AV fueron identificadas y comparadas con las muestras de las 3 bacterias aisladas de estudio (Figura 27).

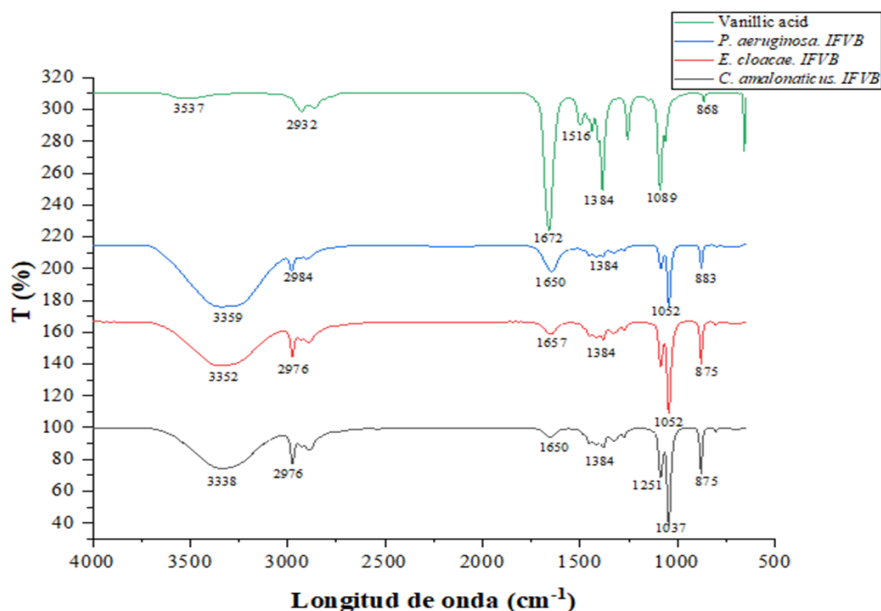


Figura 27. La identificación de los grupos funcionales del AV por la técnica FTIR en las bacterias Gram negativas. Los valores son expresados en porcentaje de transmitancia y son el promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar.

La identificación de los grupos funcionales se basó en el estándar de AV (3537, 1384, 1089 y 868 cm^{-1}), que correspondieron los grupos funcionales -OH, -CH₃, -COO y -C=C del anillo aromático. Las muestras analizadas mostraron valores similares de frecuencia (cm^{-1}): (I) *P. aeruginosa* IFVB (3359, 1384, 1052 y 883 cm^{-1}), (II) *E. cloacae* IFVB (3352, 2977, 1384, 1052 y 875 cm^{-1}) y (III) *C. amalonaticus* IFVB (3338, 1384, 1037 y 875 cm^{-1}). Esos valores corroboran la producción de AV en las 3 bacterias.

10.13 La resistencia a los compuestos aromáticos (CAs)

Otro factor importante en los microorganismos aislados del proceso del curado de las vainas de vainilla que contribuye a la producción de los CAs es la resistencia. Las bacterias analizadas en este estudio fueron resistentes a los 3 CAs propuestos como los principales componentes en el aroma de las vainas de vainilla (Tabla 10). Los resultados de la CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraron que las 3 bacterias fueron resistentes a la vainillina (VR). Sin embargo, la bacteria que más se distinguió fue *P. aeruginosa* IFVB (CMI, 390.62 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Mientras que, los resultados de *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB fueron los mismos (CMI, 195.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Además, la resistencia al ácido vanílico (AV) indicó que *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB presentaron los valores más altos de resistencia (CMIs, 781.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabla 10). Finalmente, los resultados de resistencia al 4-PHB fueron las mismas en todas las cepas Gram negativas (CMI, 781.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabla 10).

Tabla 10. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a los CAs en las bacterias aisladas de las vainas de vainilla.

Aromático	<i>P. aeruginosa</i> IFVB ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>E. cloacae</i> IFVB ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>C. amalonaticus</i> IFVB ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Vainillina (V)	390.62±0.01	195.31±0.04	195.31±0.04
Ácido vanílico (AV)	390.62±0.02	781.25±0.02	781.25±0.06
4- ácido-p-hidroxibenzoico (HBA)	781.25±0.04	781.25±0.02	781.25±0.02

Los valores son la media de 3 réplicas \pm desviación estándar. Las letras en negritas indican los valores más altos.

ETAPA II

11 Producción, cuantificación e identificación de grupos funcionales de moléculas autoinductoras en las bacterias Gram negativas aisladas de *V. planifolia*

El objetivo fue cuantificar la producción de las moléculas autoinductoras de las tres bacterias Gram negativas (*C. amalonaticus* IFVB, *E. cloacae* IFVB, y *P. aeruginosa* IFVB) aisladas de *V. planifolia* sometida al proceso de curado. Para lo cual, se utilizó la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372), que posee 2 plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos tetraciclina y kanamicina (pCF218) y el plásmido (pCF372) que confieren resistencia al antibiótico estreptomycin. Además, la cepa contiene el gen de la β -galactosidasa, que se encuentra fusionado a un promotor *trai* que a su vez permite la inducción de la expresión de la β -galactosidasa regulada por la presencia de la molécula señal, perteneciente a la familia del AI-1. El biosensor, en la presencia del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranososa (X-Gal), la β -galactosidasa tiene la capacidad de hidrolizar al sustrato (X-Gal), induciendo la formación de un pellet azul sólo cuando las formas activas del AI-1 se encuentran activas, que es detectable a una absorbancia de 635 nm (Kawaguchi *et al.*, 2008 y Yeon *et al.*, 2008). La metodología cuantifica el contenido total del AI-1 producido por cada uno de los microorganismos de estudio, expresándolos como Índices de inducción de la β -galactosidasa (ID). El estudio se complementó con la identificación en el cromatograma del pico correspondiente a la C₈-AHL, mediante técnica HPLC en comparación con el estándar. Finalmente, por FTIR se identificaron los grupos funcionales de la C₈-AHL.

11.1 El contenido total de la producción de las AHLs en las bacterias Gram negativas

En este estudio, se elaboró una curva patrón de concentración de la C₈-AHL (Figura 28). A partir de los datos obtenidos se calculó el índice de inducción (ID) de los extractos obtenidos de los tres géneros bacterianos de estudio. Como resultado se obtuvo que el biosensor *A. tumefaciens* cepa NTL4 (pCF218) (pCF372) fue capaz de detectar la

producción de las moléculas autoinducidas en las cepas de *P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB, cuyos ID obtenidos fueron 14.91 ± 0.61 , 5.48 ± 0.50 y 6.51 ± 0.43 , respectivamente. Los resultados obtenidos se entienden como el contenido total de AHLs obtenido en cada uno de los extractos bacterianos (Figura 29).

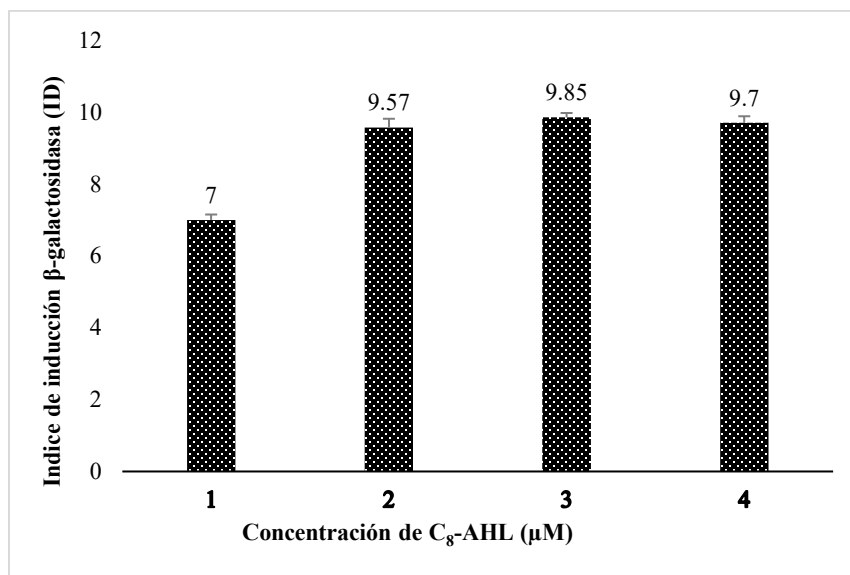


Figura 28. Curva de calibración del estándar C₈-AHL.

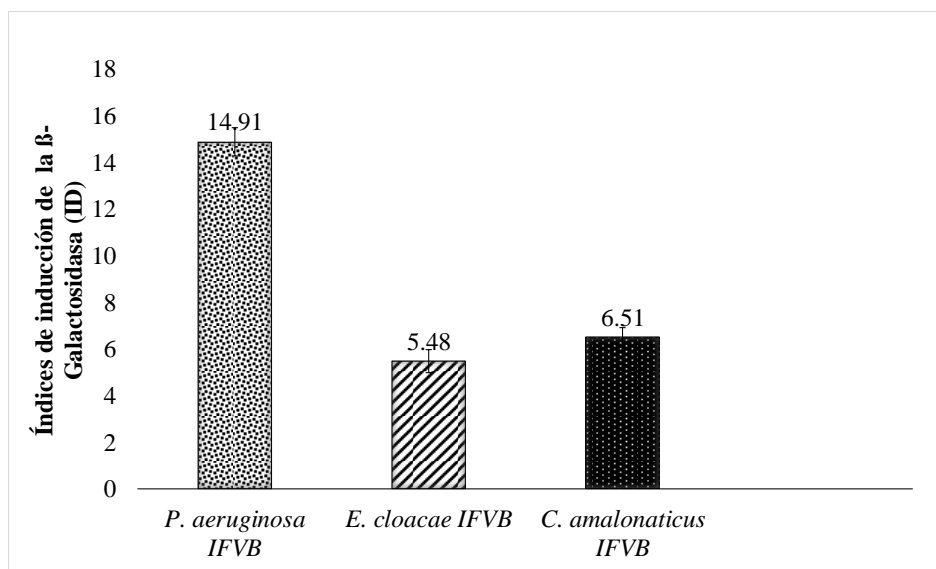


Figura 29. Determinación del índice de inducción de la β-galactosidasa (ID) por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) en respuesta a las AHLs producidas por las bacterias Gram negativas aisladas del curado de *V. planifolia*.

11.2 Identificación y cuantificación de la producción de la C₈-AHL por método HPLC

En el análisis de los resultados de HPLC se observaron diferentes señales en los cromatogramas obtenidos a partir de las cepas Gram negativas indicando varios productos: *P. aeruginosa* IFVB (7 picos), *E. cloacae* IFVB (8 picos) y *C. amalonaticus* IFVB (7 picos). Posteriormente, los resultados se compararon con el estándar de la C₈-AHL en un tiempo de retención de 2 min (Figura 30) y la bacteria que presentó la mayor concentración de C₈-AHL fue *P. aeruginosa* IFVB (1.5975 ± 0.275 nM), en comparación con *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB (0.2046 ± 0.049 nM y 1.0384 ± 0.0119 nM, respectivamente).

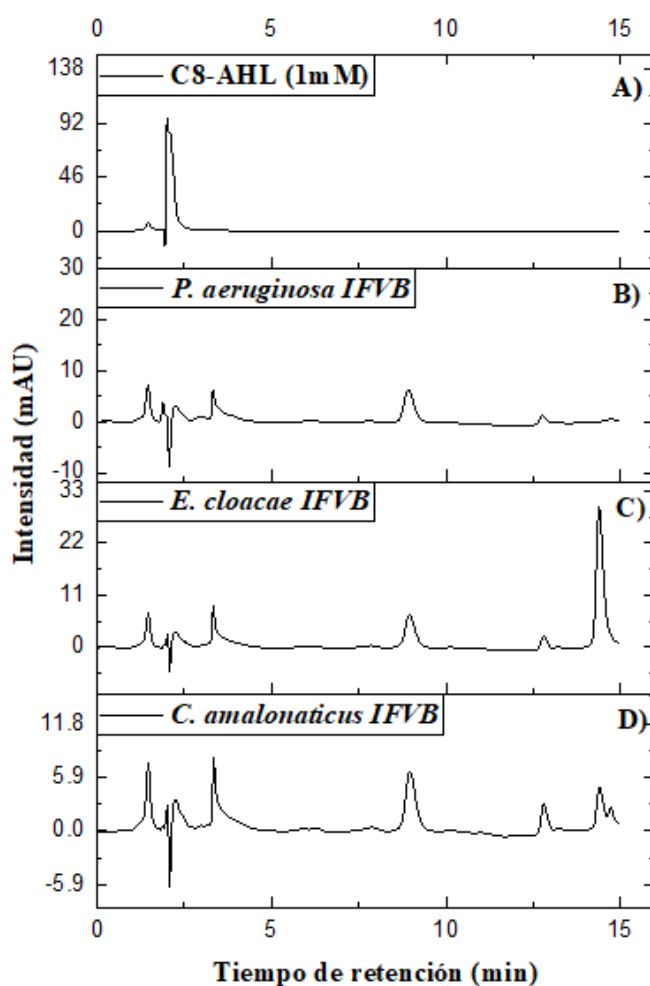


Figura 30. Cromatogramas de la producción de la molécula autoinductora C₈-AHL. (A) Estándar de referencia de la C₈-AHL (Se observa un solo pico, indicando la integridad de la molécula y se consideró el área bajo la curva en los tiempos de retención de 1.8 a 2.7 min). Monitoreo en las cepas Gram negativas: (B) *P. aeruginosa* IFVB, (C) *E. cloacae* IFVB y (D) *C. amalonaticus* IFVB.

11.3 Identificación de los grupos funcionales de la C₈-AHL por FTIR en bacterias Gram negativas

Las principales bandas de absorción del espectro FTIR de la C₈-AHL fueron identificadas y comparadas con las muestras de las 3 bacterias aisladas de estudio (Figura 31).

La identificación de los grupos funcionales se basó en el estándar de la C₈-AHL (1664, 1388, y 1252 cm⁻¹), que correspondieron al enlace R-O-R del anillo de lactona, los enlaces N=H y C=O de la cadena del acilo, demostrando ser los grupos funcionales más importantes y característicos de la C₈-AHL (Figura 31). Cada una de las muestras analizadas mostraron valores cercanos de frecuencia (cm⁻¹): (A) *P. aeruginosa* IFVB (1640, 1325 y 1242 cm⁻¹), (B) *C. amalonaticus* IFVB (1654, 1323 y 1219 cm⁻¹) y (C) *E. cloacae* IFVB (1655, 1325 y 1242 cm⁻¹). Esos valores corroboran la producción de la C₈-AHL en las 3 bacterias Gram negativas.

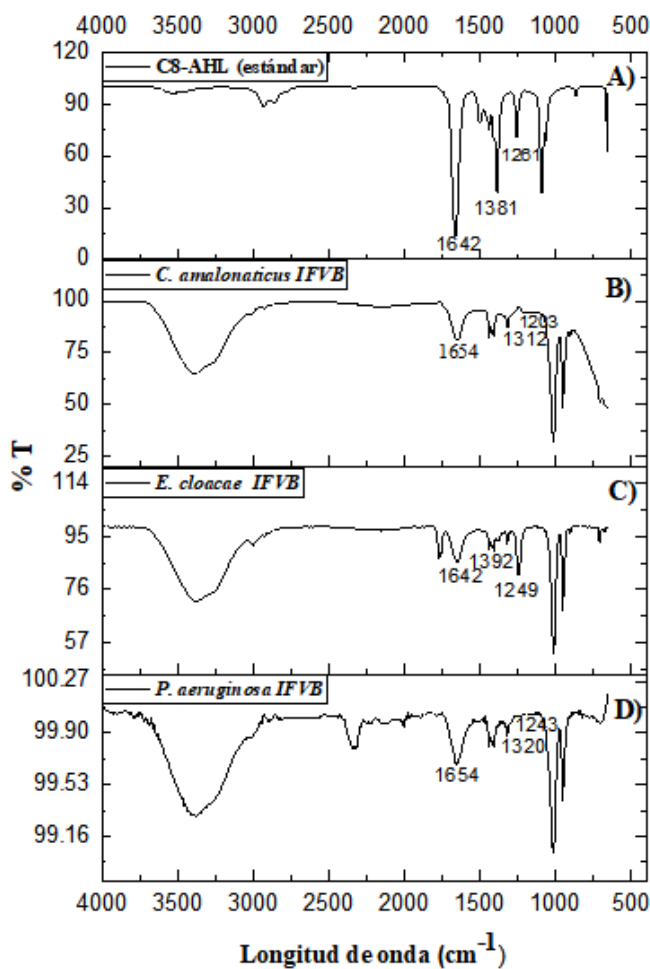


Figura 31. Identificación por FTIR de los grupos funcionales de la C₈-AHL de las 3 bacterias Gram negativas.

Posteriormente, mediante el análisis de degradación de la molécula C₈-AHL se encontró que cada uno de los microorganismos de estudio fueron capaces de degradar en diferente magnitud a la molécula autoinductora. Por otro lado, mediante HPLC se encontró que las cepas de estudio degradan 1 mM de C₈-AHL en 12 h obteniendo diferentes concentraciones 7.825±1.619, 3.645±1.520 y 4.63±1.009 nM en cada uno de los microorganismos: *P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB, respectivamente (Figura 32).

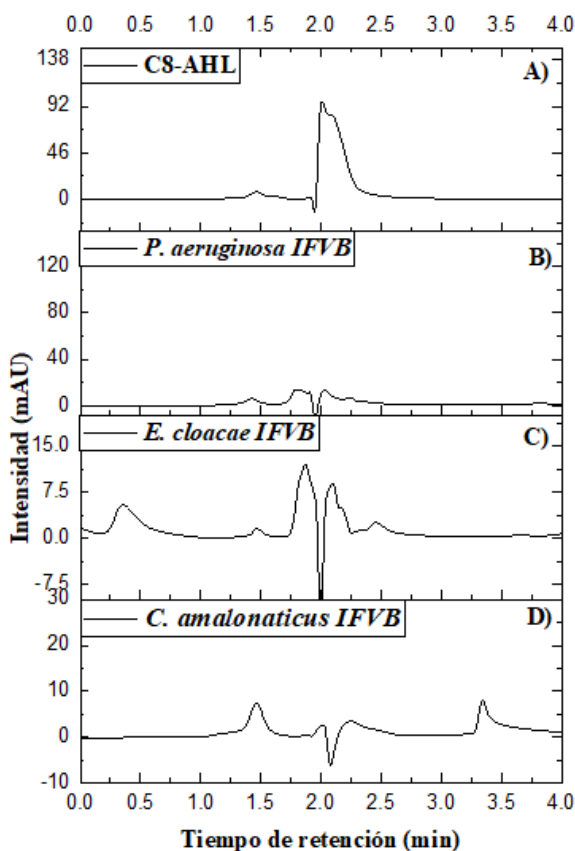


Figura 32. Cromatogramas de la degradación de la molécula autoinductora C₈-AHL. (A) Estándar de referencia de la C₈-AHL (Se observa un solo pico, indicando la integridad de la molécula y se consideró el área bajo la curva en los tiempos de retención de 1.8 a 2.7 min). Monitoreo en (B) *P. aeruginosa* IFVB, (C) *E. cloacae* FVB y (D) *C. amalonaticus* IFVB. En todos los casos se consideraron lecturas de 2 picos indicando degradación de la molécula autoinductora C₈-AHL.

ETAPA III

12 Monitoreo de la producción de las AHLS en *P. aeruginosa* IFVB

12.1 Identificación de las AHLS por métodos colorimétricos: biosensor e hidroxilamina-hierro

Para complementar el estudio se cuantificó la producción de las moléculas autoinducoras en los mismos tiempos de monitoreo que se usaron para medir la actividad poligalacturonasa (PGsa). Se encontró por el método del biosensor que la máxima producción de las AHLS fue de 11.04 ID en 8 h de incubación (fase media exponencial de crecimiento) (Figura 33).

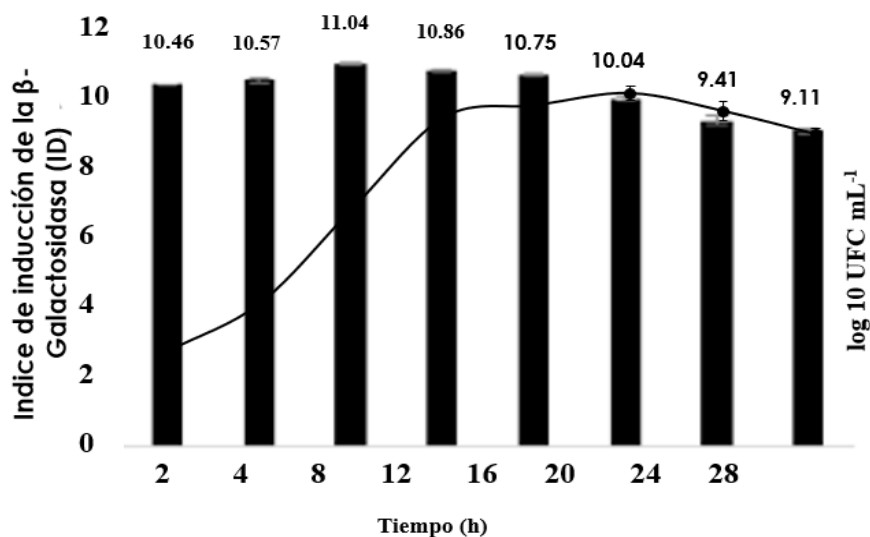


Figura 33. Cuantificación de las AHLS en *P. aeruginosa* IFVB por el biosensor *A. tumefaciens* cepa NTL4 (pCF218) (pCF372).

También, se implementó la cuantificación de las AHLS por método colorimétrico de hidroxilamina-hierro (Yang *et al.*, 2006). Cuyo principio se basa en la unión a los enlaces del anillo de lactona y el grupo amina de una molécula autoinductora (C_4 a C_{14}) y se corroboró que la máxima producción de las AHLS se llevó a cabo a las 8 h de incubación con una concentración de $1 \mu\text{M}$ (Figura 3).

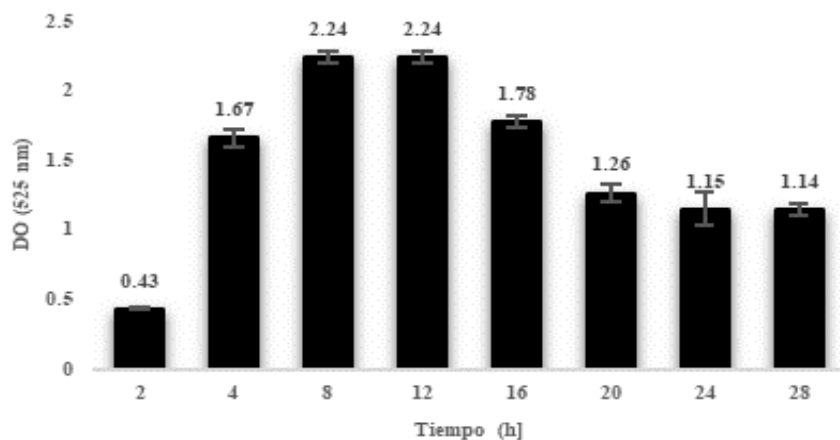


Figura 34. Determinación de los grupos funcionales del AI-1 por el método de hidroxilamina-hierro.

12.2 Monitoreo de la actividad poligalacturonasa (PGsa) y el efecto de la C₈-AHL en *P. aeruginosa* IFVB

La actividad PGsa se confirmó por el método cuantitativo DNS, utilizando el sobrenadante de *P. aeruginosa* IFVB, el cual mostró la máxima producción de unidades enzimáticas (87.57 U·mL⁻¹) a las 28 h, sin agregar la molécula autoinductora (Figura 35).

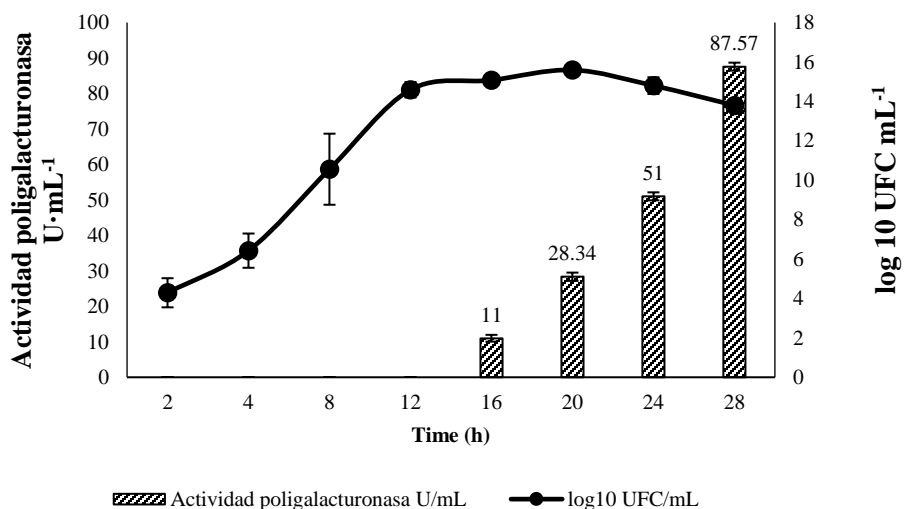


Figura 35. Actividad PGsa en *P. aeruginosa* IFVB.

Por otro lado, al adicionar la C₈-AHL se observó un incremento de la PGsa a las 2 h del monitoreo, obteniendo un incremento de la PGsa de 135.3 U·mL⁻¹ (Figura 36).

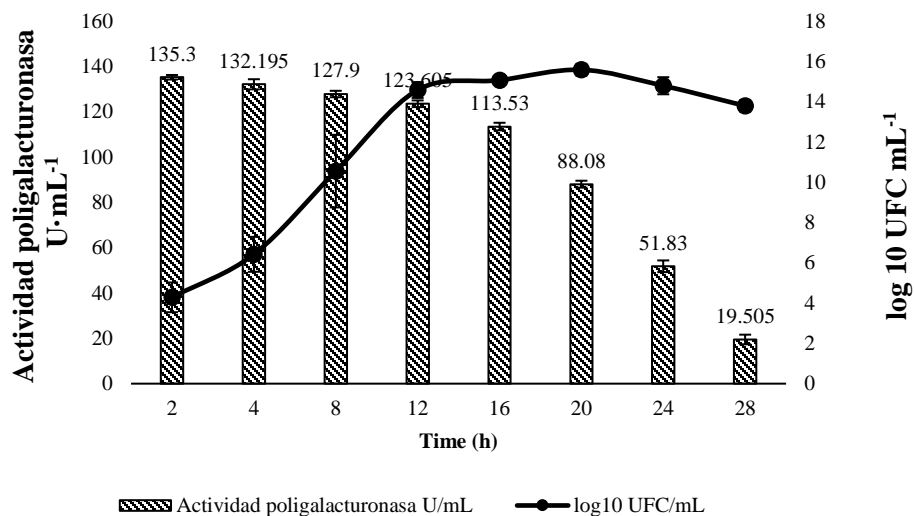


Figura 36. Efecto de la C₈-AHL en la PGsa de *P. aeruginosa* IFVB.

12.3 El efecto de la C₈-AHL en la producción del AV en las bacterias Gram negativas

Los resultados en la cepa *E. cloacae* IFVB mostraron diferencias significativas con y sin efecto de la C₈-AHL [1μM]. Las concentraciones obtenidas fueron 1.16 ± 0.0096 y 2.61 ± 0.0019 ppm, respectivamente. Los resultados demostraron que cuando se agregó la C₈-AHL, se observó un ligero aumento en la producción del AV (indicando un pulso) a las 12 h de monitoreo, pero no fue significativo (Figura 37).

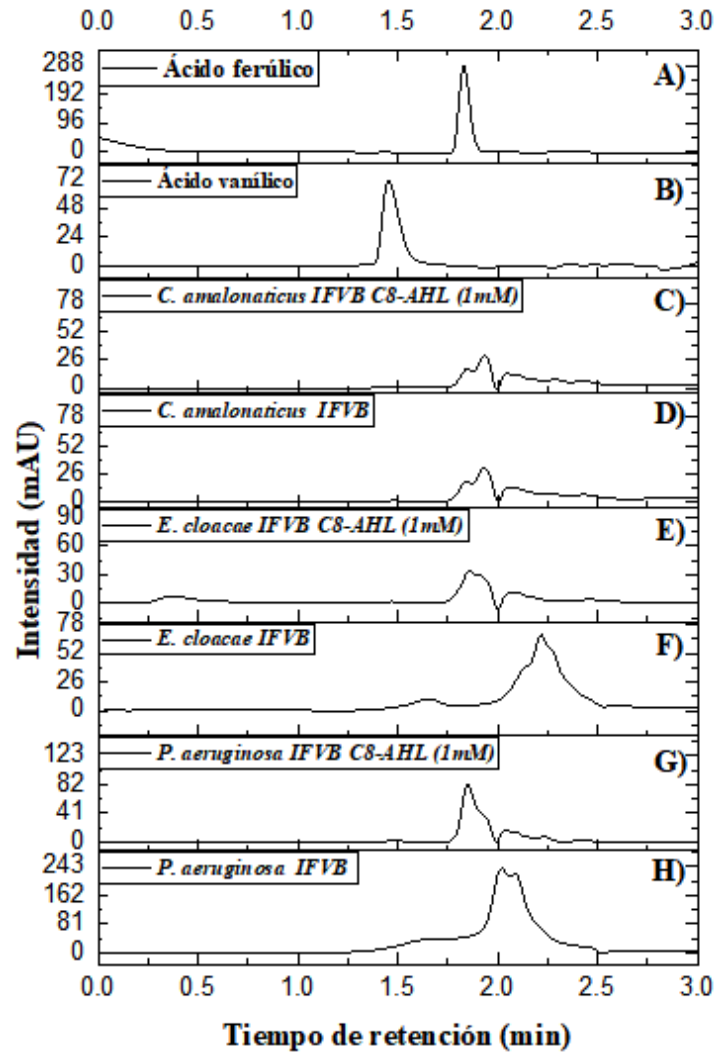


Figura 37. Cromatograma del efecto de la C₈-AHL en la producción del AV y la degradación del AF en las bacterias Gram negativas aisladas del sistema del curado de la vainilla. Análisis por método de integración. Tiempos de retención de 1.5 min (ácido vanílico), 1.8 min (ácido ferúlico) y 2.0 (C₈-AHL).

Los resultados indicaron que al adicionar autoinductor-1 (C₈-AHL) en los cultivos bacterianos no mostró efecto en la producción del AV (Tabla 11).

Tabla 11. El rendimiento y la productividad del ácido vanílico (AV) del sustrato ácido ferúlico (AF) en las bacterias Gram negativas monitoreadas a 12 h de crecimiento

Bacterias Gram negativas	Molécula Señal	AV, Pm (ppm)	Rendimiento, R= p/s	Productividad, Pr
<i>P. aeruginosa</i> IFVB	-	0.77±0.0224	0.00133	26.91
	C ₈ -AHL	0.55±0.05145	0.00068	26.91
<i>E. cloacae</i> IFVB	-	2.61±0.0019	0.00808	26.91
	C ₈ -AHL	1.16±0.0096	0.00359	26.91
<i>C. amalonaticus</i> IFVB	-	0.43±0.0298	0.00238	26.91
	C ₈ -AHL	0.22±0.0512	0.00170	26.91

C₈-AHL: octanoil-L-homoserina lactona, **P:** concentración máxima del AV (ppm AV), **R:** rendimiento del AV basado en el coeficiente de utilización del sustrato (ppm del AV /ppm del AF) y **Pr:** productividad del AV (ppm del AF/L*h). Las condiciones de estudio fueron MM-VP/AF y glucosa (2%), 30°C, 120 rpm y pH 7.0, 100 mL (1:5 v/v).

ETAPA IV

13 Producción del AV en las interacciones de las cepas Gram negativas

Se evaluó el efecto de la co-inoculación de *P. aeruginosa* IFVB-*C. amalonaticus* IFVB (Interacción I). Los resultados obtenidos mostraron que, bajo condiciones de reposo, en presencia del AF como precursor se obtuvo una máxima concentración de AV de 1.32±0.186 ppm y un rendimiento molar de 0.004% a las 12 h de monitoreo (Tabla 12). También se evaluó el efecto de la co-inoculación de *P. aeruginosa* IFVB-*E. cloacae* IFVB (Interacción II, sin efecto en la producción de AV) a las 12 h de monitoreo (Figura 38). En conclusión, la mejor interacción en la producción del AV fue *P. aeruginosa* IFVB-*C. amalonaticus* IFVB (véase en figura 38 la disminución en el pico AF y la aparición de un ligero pico de AV). Sin embargo, el efecto observado en la interacción fue antagónico ya que la concentración del AV alcanzada no fue mayor al valor correspondiente a *C. amalonaticus* (tabla 12).

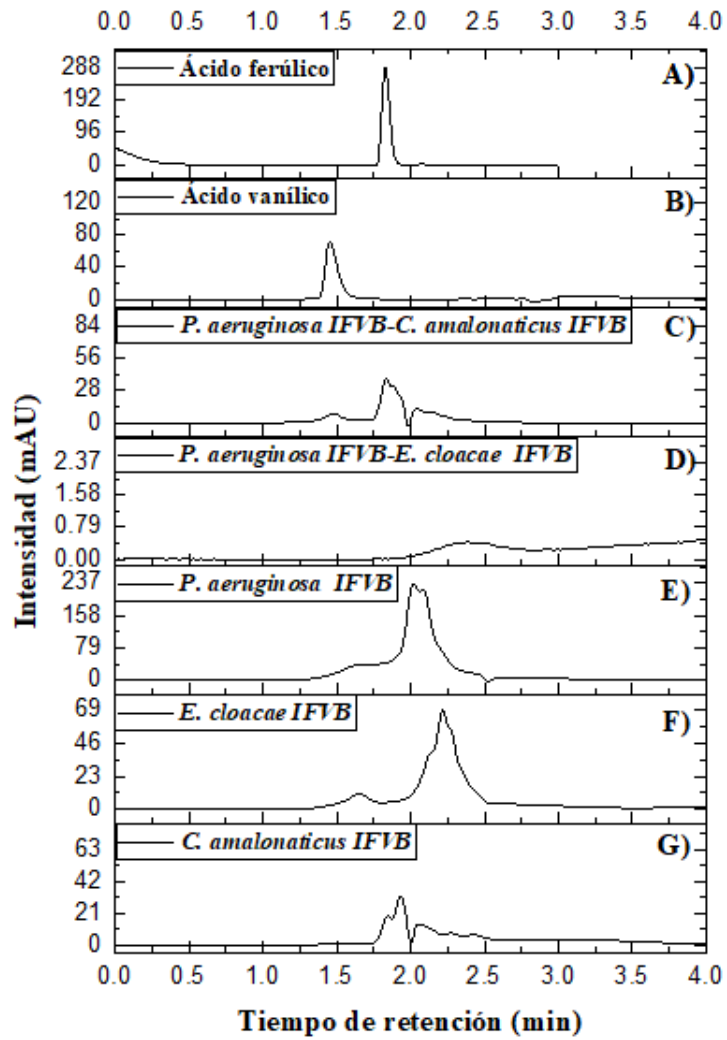


Figura 38. Cromatograma de la bioconversión del AF a compuestos aromáticos. Comparación de los cultivos individuales e interacciones. Tiempo de retención 1.5 (ácido vanílico), 1.8 (ácido ferúlico) y 2.0 (ácido vanílico).

Tabla 12. Producción, rendimiento y productividad del ácido vanílico (AV) a partir del sustrato ácido ferúlico (AF) en las bacterias Gram negativas monitoreadas a 12 h de crecimiento

Interacción bacteriana	Ácido vanílico, Pm (ppm)	Rendimiento, R p/s	Productividad, Pr
<i>P. aeruginosa</i> IFVB	0.971±0.1700	0.0034	26.909
<i>E. cloacae</i> IFVB	4.349±0.084	0.013	26.90
<i>C. amalonaticus</i> IFVB	2.1185±0.1018	0.0065	26.909
<i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>C. amalonaticus</i> IFVB (Interacción I)	1.32±0.186	0.004	26.909
<i>P. aeruginosa</i> IFVB- <i>E. cloacae</i> IFVB (Interacción II)	-	-	-

P: concentración máxima de AV (ppm AV), **R:** rendimiento del AV basado en el coeficiente de utilización del sustrato (ppm del AV/ppm del AF) y **Pr:** productividad del AV (ppm FA/L*h). Las condiciones de estudio fueron MM-VP/AF, glucosa (2%), 30°C, 120 rpm, pH 7.0, 100 mL (1:5 v/v). Todos los datos obtenidos de AV fueron monitoreados a 12 h de una muestra de 10 mL sin concentrar la muestra.

13.1 Identificación por FTIR de los grupos funcionales del AV en las interacciones de las bacterias Gram negativas

Los grupos funcionales del AV fueron identificados en las combinaciones 1 y 2 de las bacterias Gram negativas y correspondieron a los grupos en comparación con el estándar (Figura 39). La identificación de los grupos funcionales se basó en el estándar de AV (3339, 1383, 1091 y 887 cm⁻¹), que correspondieron a los grupos funcionales -OH, -CH₃, -COO y -C=C del anillo aromático. Las muestras analizadas mostraron valores similares de frecuencia (cm⁻¹): Interacción I (3353, 1376, 1090 y 877 cm⁻¹) e Interacción II (3324, 1376, 1096 y 867 cm⁻¹). Esos valores corroboran la producción de AV en las interacciones de las bacterias Gram negativas.

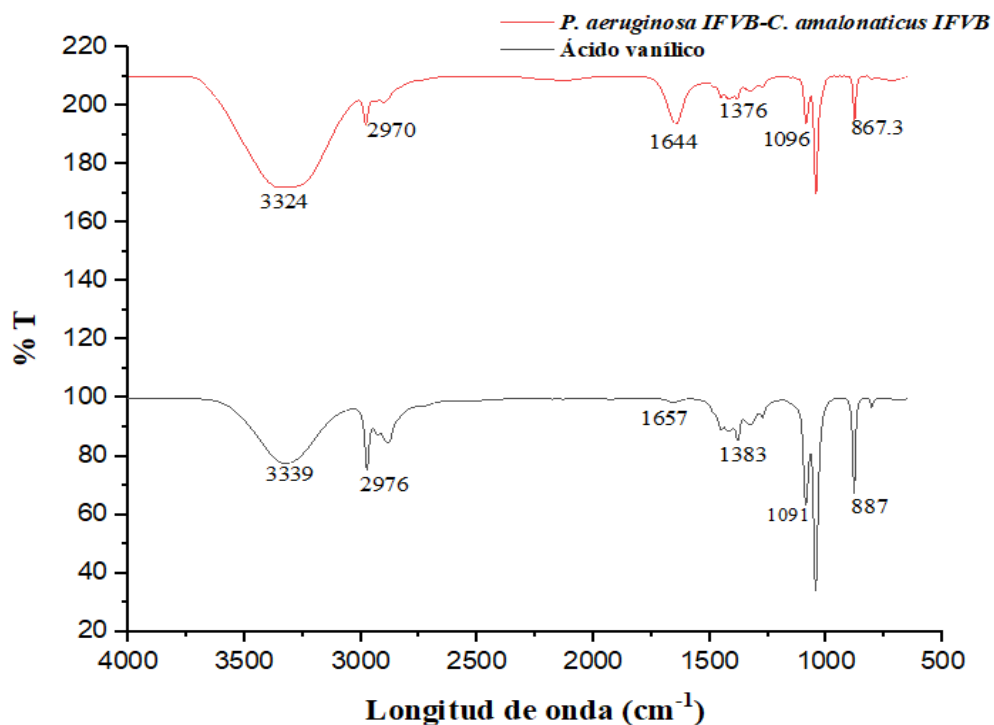


Figura 39. Identificación por FT-IR de los grupos funcionales del AV en la interacción de *P. aeruginosa* IFVB- *C. amalonaticus* IFVB (Interacción I).

DISCUSIÓN

ETAPA I

14 Aislamiento y selección de las cepas Gram positivas de las vainas de vainilla en las etapas del curado

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron de interés debido a que se observó que *B. subtilis* es una de las especies predominantes en todas las etapas del curado de las vainas de *V. planifolia*. El género *Bacillus* esta reportado como un microorganismo capaz de contribuir al contenido de CAs en las vainas de vainilla y se ha observado que el género produce CAs como la vainillina (Gu *et al.*, 2015). Uno de los microorganismos más ampliamente estudiados es *Bacillus vanillea*, nombre que ha sido acuñado porque se trata de una especie que ha sido aislada de las vainas de vainilla con características especiales, porque se puede diferenciar por el contenido de GC (98.9%) y pruebas complementarias relacionadas con el metabolismo de ácido grasos y azúcares (Chen *et al.*, 2015 y Dunlap, 2015).

14.1 Actividad pectinolítica

En los estudios de Röling *et al.*, 2001 se reportaron diferencias en la abundancia de los microorganismos, comunidades y características de las cepas que tienen un efecto en la producción de CAs e incluso en las variaciones del aroma de las vainas de vainilla. Lo anterior porque se ha encontrado que *Bacillus* produce 6 enzimas pectinolíticas que participan en la hidrólisis de la pared celular vegetal (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). En el presente estudio se evaluó la actividad pectinolítica a 2 temperaturas (37 y 50°C) y se encontró que la temperatura óptima de la AP fue de 50°C. Lo que concuerda con algunos reportes de EP en bacterias Gram positivas que presentan su máxima AP a 50°C (Soares *et al.*, 1999). Chen y col., mencionan que la sinergia entre el tratamiento químico, las reacciones enzimáticas en la pared celular de las plantas y la actividad microbiana son muy importantes en la producción del aroma de las vainas de vainilla (Chen *et al.*, 2015). También, se ha encontrado que el género *Bacillus* participa en el proceso del curado, posteriormente de la etapa del matado debido a que generan resistencia a las altas temperaturas a las que se someten las vainas de vainilla (Röling *et al.*, 2001), lo cual concuerda con los resultados obtenidos debido a que se encontró que existe mayor actividad enzimática durante la etapa del matado o hidrólisis de la pared celular de las vainas de vainilla, sugiriendo que las enzimas pectinolíticas (EP) bacterianas y la bioconversión a los CAs contribuyen a la producción de CAs.

14.2 La bioconversión de AF a los CAs

La AAF en el género *Bacillus* se evaluó a 24 h los resultados son consistentes con el reporte de Chen y cols., quienes investigaron el proceso de asimilación de la glucovainillina en un tiempo equivalente (Chen *et al.*, 2015). Otros estudios mencionan que se requiere de 2 h de incubación para asimilar fuentes de carbono (Graf *et al.*, 2016). Ambos datos fueron evaluados al inicio del presente estudio, pero en 2 h no todas las cepas de *Bacillus* tenían la capacidad de AAF, se procedió a evaluar a 24 h de incubación. Lo cual permitió observar halos amarillos más intensos en la prueba de placa Petri de agar MM-VP por método de goteo. Los resultados indicaron que el género *Bacillus* puede AAF con posible producción de diferentes metabolitos y que se requiere de 24 h de incubación. Los productos metabólicos que se han reportado del sustrato AF son el AV, vainillina, ácido protocateíco, entre otros (Gallage *et al.*, 2015). El género *Bacillus* está documentado en función de la producción de los CAs del AF, tal es el caso de *B. vanillea* (Dunlap, 2015) y *B. subtilis* B7-S (Chen *et al.*, 2015). Este último se reporta con una producción de 0.2

ppm de vainillina a las 48 h de monitoreo. En el presente estudio se observó que la especie *B. subtilis* puede bioconvertir el AF en AV (63.74 ± 3.69 ppm) en un tiempo de 24 h, demostrando ser una cepa que puede bioconvertir más rápidamente el sustrato en comparación con *B. subtilis* B7-S.

Un dato interesante es que el género *Bacillus* presentó la capacidad de producir EP y puede AAF, durante todas las etapas del curado de las vainas de la vainilla. Es decir, existe una correlación entre ambos procesos y que, durante el proceso del curado de las vainas de la vainilla, los aislados de *Bacillus* se encuentran participando en la ruptura de la pared vegetal por hidrólisis mediada por la acción de las enzimas pectinolíticas que a su vez genera la liberación de los precursores de los CAs. Como ya se ha sugerido en otros modelos bacterianos, los precursores pueden ser utilizados posteriormente en la vía metabólica de la asimilación de CAs (Ito *et al.*, 2006). Por otro lado, se observó que en las placas Petri de agar MM-VP de *Bacillus* se desprendían aromas semejantes a la vainillina, lo cual es un indicativo de la producción de CAs bajo condiciones *in vitro*. Lo anterior confirma lo reportado por Gu y cols en el 2015, respecto a que *Bacillus* tiene la capacidad de agregar atributos sensoriales a las vainas de vainilla.

14.3 Aislamiento y selección de las cepas bacterianas Gram negativas de las vainas de vainilla durante las etapas del curado

En un reporte previo, se observó que varias especies de bacterias Gram negativas fueron aisladas de las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de vainilla (Luna-Guevara *et al.*, 2016). En este estudio el análisis de resultados de crecimiento en medio selectivo, bioquímicas, VITEK y de la secuencia parcial del gen 16S rRNA mostró que las cepas aisladas de las vainas de vainilla correspondieron al género *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Citrobacter* sp. También, por medio de los árboles filogenéticos se observó que *P. aeruginosa* IFVB posee un ancestro en común (la cepa *Pseudomonas* sp. Az 10), un aislado de suelo con la capacidad de bioconvertir el AF a los CAs (Zamzuri *et al.*, 2014). Mientras que, la cepa *E. cloacae* IFVB mostró similitud con la cepa *Enterobacter* sp. Px6-4, un microorganismo de referencia aislado de las raíces de *V. planifolia* (Li *et al.*, 2008). En el caso de *C. amalonaticus* IFVB, no se tiene una cepa de referencia porque es un género poco estudiado, pero ha sido aislado con alta frecuencia en las diferentes etapas del proceso del curado de las vainas de *V. planifolia* (Luna-Guevara *et al.*, 2016). Con los antecedentes mencionados es posible relacionar las cepas Gram negativas analizadas en este estudio con otras cepas que tienen la capacidad de producir CAs. De acuerdo con Röling *et al.*, (2001) y Voragen

et al., (2009) el aroma desarrollado en las vainas de vainilla curadas se relacionó con algunos procesos bacterianos como la producción de enzimas hidrolíticas.

14.4 Actividad pectinolítica

El principal proceso involucrado es la presencia de la actividad enzimática cuyo papel es hidrolizar una gran cantidad de compuestos incluyendo la celulosa, pectina, hemicelulosa y proteínas que pueden ser liberadas de la pared celular vegetal. El mecanismo que incluye la producción y la acción de las enzimas bacterianas degradadoras de la pared celular vegetal son conocidos como “penetración activa” (Mateos *et al.*, 1992). Esta actividad enzimática en las bacterias Gram negativas ha sido evaluada por métodos cuantitativos como el método de goteo y el método por pozo, utilizando 2 diferentes muestras (pellet y sobrenadante) (Attri y Garg, 2014).

Los resultados de actividad pectinolítica (AP) demostraron que es posible evaluar el proceso por 2 métodos en placa Petri de agar MM-P. Los valores de AP en *P. aeruginosa* IFVB fueron 1000 veces mayores que los valores reportados con *Pseudomonas* sp. cepa YRR04 aislada de las raíces jóvenes de rábano utilizando el método de goteo (Seo *et al.*, 2010). Mientras que, en el género *Enterobacter* se ha confirmado el aislamiento a partir de frutos (Reddy *et al.*, 2016). Además, Seo *et al.*, (2010) estudio la producción de pectinasas en las cepas de *Enterobacter* sp. YRL y *C. freundii* YRL11. Ambos microorganismos fueron aislados de las raíces de rábano (*Yeulmu, Raphanus sativus* L.), que contienen pectina en la composición de la pared celular vegetal. Sin embargo, en este reporte no fue posible detectar la AP por el método de goteo en placa Petri de agar MMP. La AP fue cuantificada mediante IAP con la intención de facilitar la comparación entre las muestras de proteínas obtenidas de las cepas Gram negativas.

Los resultados de *P. aeruginosa* IFVB mostraron que los valores más altos de AP correspondieron al pellet comparando con los datos obtenidos del sobrenadante, sugiriendo que la AP está relacionada con las exoenzimas. También, los valores de IAP de *E. cloacae* IFVB mostraron un incremento en el sobrenadante por el método de pozo. Este resultado propuso que las enzimas pectinolíticas secretables como las pectiestearasas y la familia de las enzimas poligalacturonasas (PGasa) están involucrados en la actividad pectinolítica (Abbott y Boraston, 2008). Por otro lado, la cepa *C. amalonaticus* IFVB también presentó un elevado IAP en la muestra del sobrenadante por el método de pozo, esta actividad enzimática ha sido confirmada experimentalmente por Okolie *et al.*, (1988).

Además, la actividad PGasa fue cuantificada por el método DNS. Específicamente, *P. aeruginosa* IFVB (51 ± 10.92 U·mL⁻¹) mostro una actividad enzimática menor en comparación con otras especies de *Pseudomonas* (4.4 ± 0.1 U·mL⁻¹) que han sido aisladas del material vegetal (Sohail y Latif, 2016). Mientras que, la AP de *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB (76.07 ± 12.47 U·mL⁻¹ y 70.31 ± 3.64 U·mL⁻¹, respectivamente) fueron superiores en comparación con otros estudios (18.54 U·mL⁻¹ y 1.047 U·mL⁻¹) (Darah *et al.*, 2015 y Tripathi *et al.*, 2018).

La literatura indica que algunas familias de enzimas pectinolíticas secretables como: (a) las pectato liasa, (b) las pectin metil estearasa y (c) las enzimas PGasa han sido aisladas de bacterias Gram negativas (Abbott y Boraston, 2008). Para inferir la familia de las enzimas pectinolíticas que producen las cepas Gram negativas del presente estudio se creó un análisis bioinformático obtenido de UniProt: the universal protein knowledgebase (<https://www.UniProt.org>) (Pundir *et al.*, 2017). Encontrando que el género *Pseudomonas* produce ciertas enzimas PGasa como: (a) la poligalacturonasa (PglA), (b) el glicósido hidrolasa (PehA), (c) la exo-poli-galacturonasa (PehB), (d) la poligalacturonasa transmembranal (PehC) y (e) la exo-poli-alfa-D-galacturonosidasa (PehX) (González *et al.*, 2003 y Pundir *et al.*, 2017). También, en el género *Enterobacter* y *Citrobacter* se encontraron las siguientes enzimas: (a) la poligalacturonasa (PglA), (b) la endopoligalacturonasa (PehX) y (c) la glicósido hidrolasa de la familia 28 (AdhA) (Pundir *et al.*, 2017).

Además, los resultados de las mediciones de la AP por el método DNS indicaron que las 3 bacterias Gram negativas tienen la habilidad de degradar el APG (ácido poligalacturónico). El principal componente de la pared celular vegetal contribuyendo al fraccionamiento de la estructura del polisacárido. Este proceso causa la liberación de la glucovainillina y algunos compuestos fenólicos glucosilados como el ácido ferúlico, atrapados en la matriz de la pared celular vegetal que muestran variaciones de concentración durante el proceso del curado de las vainas de *V. planifolia* debido a los diferentes procesos a los que es sometida (Havkin-Frenkel y Belanger, 2007 y Peña *et al.*, 2016). En resumen, los resultados de la AP en las 3 bacterias Gram negativas están asociados con la degradación de la pared celular vegetal por acción de las enzimas PGasa y se relacionan con la liberación de ciertos precursores de los CAs de las vainas de *V. planifolia*.

14.5 Bioconversión del AF a los CAs

Se ha reportado que algunos precursores de los CAs como la lignina, el AF, guayacol, catecol, entre otros, son liberados y convertidos en CAs como el AV, el alcohol vanílico, AHB, PHB y la vainillina (Harazono *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2006 y Zamzuri *et al.*, 2014). Específicamente, el AF ha sido reportado como un precursor en la biosíntesis de la vainillina y la vainillina glucosídica, ambos compuestos considerados los más abundantes en el aroma de las vainas de vainilla maduras (Hernández, 2010 y Salazar *et al.*, 2012). Adicionalmente, Ammar *et al.*, (2005) reportó la capacidad de asimilación de diferentes CAs como el AF por algunas cepas Gram negativas. La contribución al contenido de la vainillina del género *Pseudomonas* es el ejemplo más estudiado y tiene la capacidad de producir altas concentraciones de vainillina ($300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Mientras que, el género *Enterobacter* fue aislado de las raíces de *V. planifolia* siendo capaz de asimilar el sustrato AF y bioconvierte al subproducto vainillina ($18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Li *et al.*, 2008 y Zamzuri *et al.*, 2014). Otros estudios indican que *Citrobacter* es la bacteria más eficiente en metabolizar el AF comparado con otras bacterias Gram negativas (Ammar *et al.*, 2005). También, Dias *et al.*, (2015) encontró que este género participa en el proceso del curado del café, en el cual se producen CAs mediante un proceso similar al curado de la vainilla. Otros estudios sugieren que la degradación del AF en los diferentes géneros bacterianos es dependiente de la AAF y la bioconversión a los CAs. Un ejemplo es *Pseudomonas* sp. Az10 aislada de suelo, con capacidad de AAF durante la fase exponencial de crecimiento (12 h), esta actividad fue determinada por el método de goteo (Zamzuri *et al.*, 2014). Por otro lado, *Enterobacter* sp. Px6-4 (es una cepa de referencia aislada de las raíces de *V. planifolia*), que presentó actividad descarboxilasa ($0.5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) y posee la habilidad de AAF en el punto de máximo crecimiento (15 h) (Li *et al.*, 2008). Mientras que, en el género *Citrobacter* se ha confirmado la asimilación y bioconversión del AF a los CAs como el AV (Ammar *et al.*, 2005).

Algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas participan durante la bioconversión del AF a los CAs como el alcohol vanílico, AV y vainillina (Vyrides *et al.*, 2015, Graf *et al.*, 2016, Mishra *et al.*, 2016 y Paz *et al.*, 2016). Los CAs producidos del AF se han estudiado a partir de las diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. por el método de células en reposo (Civolani *et al.*, 2000, Ashengroph *et al.*, 2011 y Zamzuri *et al.*, 2014) confirmando que el género es capaz de producir ácido vanílico como bioproducto y que los resultados obtenidos fueron mayores a los reportados por Civolani *et al.*, 2000.

Por otro lado, la producción del AV en la cepa *E. cloacae* IFVB fue menor en comparación con otras cepas como *Enterobacter* sp Px6-4, la cual posee la capacidad de bioconvertir a los CAs como la vainillina (18 ppm), después de 12 h de monitoreo (Li *et al.*, 2008). Mientras que, *Enterobacter soli* y *Enterobacter aerogenes* producen cantidades pequeñas de AV (1-5 ppm) en cultivos suplementados con AF (Hunter *et al.*, 2012), mismas que fueron comparables con el presente estudio, indicando diferencias entre la habilidad de las cepas que pueden bioconvertir a los CAs. En relación con el género *Citrobacter*, no se ha encontrado un reporte que permita comparar el género en la producción del AV, pero los resultados son menores en comparación con los obtenidos en *P. aeruginosa* IFVB y *E. cloacae* IFVB del presente estudio. De acuerdo con Zamzuri *et al.*, (2014) y Graf *et al.*, (2016) la producción de los CAs por los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Citrobacter* están asociados con las rutas bioquímicas involucradas en el mecanismo de bioconversión del AF a los CAs.

Los resultados del espectro FTIR del AV fueron comparados con las regiones de la longitud de onda (cm^{-1}) obtenidas de la base de datos del Instituto Nacional de estándares y tecnología (NIST) (Chu *et al.*, 1999) y los reportes de Clavijo *et al.*, (2008). En todos los casos, las 3 bacterias Gram negativas presentaron los mismos grupos funcionales que correspondieron al AV y el porcentaje de transmitancia fue diferente en las 4 regiones encontradas en las bacterias Gram negativas del presente estudio indicando diferentes concentraciones.

14.6 Resistencia a los compuestos aromáticos (CAs)

Los resultados del presente estudio demostraron la resistencia a la vainillina (RV) de *Pseudomonas* sp. IFVB, los resultados fueron consistentes con reportes previos, los valores de CMI variaron a partir de 110 a 22500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por otro lado, los resultados obtenidos de la RV del género *Enterobacter* y *Citrobacter* fueron comparables con lo obtenido por Harazono *et al.*, 2003 y Li *et al.*, 2008, cuyos valores fueron 18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. En comparación con Yemiş *et al.*, 2011, los resultados del presente estudio confirmaron la resistencia al AV en las especies de *Enterobacter* (8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). También, Harazono *et al.*, (2003), Ito *et al.*, (2006) y Pundir *et al.*, (2017). Indicaron que algunas bacterias Gram negativas como el género *Citrobacter* son ácido vanílico resistentes (AVR), porque poseen diferentes vías de síntesis de los CAs. Además, la producción del AV en el género *Pseudomonas* se confirmó la resistencia de esta bacteria a los CAs (Civolani *et al.*, 2000 y Zamzuri *et al.*, 2014). Finalmente, las cepas Gram negativas fueron resistentes al AHB (ácido hiroxibutírico) debido a su habilidad

para descarboxilar fuentes de carbono en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de acuerdo con el reporte de Cava *et al.*, 2012. Así las bacterias pueden asimilar los CAs como el AV, la vainillina y el PHB producidos en el mismo ambiente del que fueron aisladas. También, hay bacterias que producen la vainillina del precursor AF y en raras ocasiones producen PHB y utilizan los CAs como mecanismo de defensa inhibiendo el crecimiento bacteriano (Chen *et al.*, 2015, Kallscheuer *et al.*, 2018, Sannino *et al.*, 2018 y Shin *et al.*, 2018).

El perfil de resistencia a los CAs en las bacterias Gram negativas está relacionado con el proceso del curado de las vainas de vainilla. Lo anterior debido a que en cada una de las etapas del proceso del curado es posible observar que los CAs se producen en diferentes concentraciones. El proceso del curado se ha monitoreado de 8 a 10 meses y se ha observado que 4 compuestos aromáticos se producen en altas concentraciones: (1) vainillina (35% peso seco), (2) p-hidroxibenzaldehído (1.6% peso seco), (3) ácido vanílico (1.3 % peso seco) y (4) el ácido hidroxibenzoico (0.5 % peso seco) (Frenkel *et al.*, 2010). Basándose en los datos anteriores se puede deducir que los microorganismos resisten el proceso del curado por ello es posible aislarlos durante todas las etapas del proceso del curado, lo cual es consistente con los resultados de Luna-Guevara *et al.*, 2016.

ETAPA II

15 Cuantificación del AI-1 en las bacterias Gram negativas

15.1 Método colorimétrico

Los trabajos de Kawaguchi y cols. en 2008 y Singh y Greenstein en 2006 demostraron que el sistema biosensor de *Agrobacterium tumefaciens* cepa NTL4 (pCF218) (pCF372) detecta las AHLs, provenientes de los extractos de diferentes bacterias Gram negativas, reportando un índice de inducción de la β -galactosidasa (o ID) mayor de 3 (Kawaguchi *et al.*, 2008 y Singh y Greenstein, 2006). Lo cual indica la autoinducción del promotor *traR* fusionado al gen de la β -galactosidasa en el sistema biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372). El ID se considera como el contenido total de las AHLs y está relacionado con las diferentes AHLs que produce la bacteria de estudio. También, se ha informado que el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) detecta moléculas autoinductoras, mediante la activación de la enzima β -galactosidasa cuyo producto es cuantificable por método colorimétrico (Rai *et al.*, 2015 y Rajput *et al.*, 2016). En general, las AHLs están ampliamente distribuidas en los diferentes géneros de las bacterias Gram negativas, como ejemplos: la C₆-AHL (73 géneros), la C₈-AHL (56

géneros), la C₁₀-AHL (24 géneros) y la C₁₂-AHL (21 géneros) (Rajput *et al.*, 2016). La identificación y cuantificación de la C₈-AHL en las bacterias Gram negativas se elaboró por el método HPLC.

Posteriormente, en los cromatogramas se observaron diferentes señales en *C. amalonaticus* IFVB (7), *E. cloacae* IFVB (8) y *P. aeruginosa* IFVB (7) indicando que se produjeron varios compuestos. Los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* sintetizan las N-acil homoserin lactonas (AHLS) y la longitud de la cadena lateral varía de C₄ a C₁₄ (Hardman *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 2000, Deep *et al.*, 2011, Lade *et al.*, 2014 y Rajput *et al.*, 2016). Algunas especies como *C. freundii* ST2 y *C. amalonaticus* son cepas multiproductoras de las AHLS (C₆-AHL, C₈-AHL, C₁₀-AHL y C₁₂-AHL) (Steindler y Venturi, 2007, Goh *et al.*, 2016, Rajput, Kaur y Kumar, 2016, Huang *et al.*, 2017). El género *Enterobacter* produce la C₄-AHL, C₆-AHL y C₈-AHL (Campbell, Lin, Geske, y Blackwell, 2009, Lau *et al.*, 2013 y Rajput *et al.*, 2016). Y en el caso de *P. aeruginosa* produce 4 moléculas autoinductoras (C₄-AHL, C₈-AHL, C₁₀-AHL y C₁₂-AHL) (Lee y Zhang, 2014). Todos las AHLS tienen una función específica como reguladores y moduladores del mecanismo QS y contribuyen al contenido total de las AHLS (Jiménez *et al.*, 2012).

La información anterior contribuye a la comprensión del contenido total de las AHLS de cada una de las bacterias Gram negativas aisladas de *V. planifolia*. Por otro lado, las diferencias en la concentración de las AHLS en el presente estudio se deben a que cada bacteria modula la síntesis de las AHLS en función de las fases de crecimiento y los procesos bacterianos que son necesarios en la supervivencia bacteriana (Yates *et al.*, 2002, Hooi *et al.*, 2004 y Rajput *et al.*, 2016). También, se ha informado que el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) detecta moléculas autoinductoras, mediante la activación de la enzima β -galactosidasa cuyo producto es cuantificable por método colorimétrico (Rai *et al.*, 2015 y Rajput *et al.*, 2016).

15.2 Producción de las AHLS en las bacterias Gram negativas

Los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* producen la C₈-AHL bajo condiciones de alta densidad celular en medio mínimo M9 suplementado con 0.5% de glucosa e incubado a 37 °C (Rasch *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2006, Steindler y Venturi, 2007, Goh *et al.*, 2016, Rajput *et al.*, 2016 y Huang *et al.*, 2017) lo cual es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio.

En los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter* no se ha cuantificado el contenido total de las AHLs por lo que no hay un reporte comparable con el presente estudio. Por otro lado, el género *Pseudomonas* se ha cuantificado el contenido de AHLs en un rango de 3 nM a 10 μ M (Pearson *et al.*, 1995 y Kirisits *et al.*, 2007). La C₈-AHL se ha cuantificado en la fase estacionaria de crecimiento (25 y 220 nM), la cual fue similar a lo reportado por algunos autores (Yates *et al.*, 2002, Bruhn *et al.*, 2005, Gowda y Marie, 2014 y Yunos *et al.*, 2014).

La C₈-AHL tiene su importancia en el mecanismo del QS en los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* porque la molécula regula ciertos procesos bacterianos y la comunicación intraespecie con otras bacterias Gram negativas (Faure y Lang, 2014). Además, pocos estudios relacionan la C₈-AHL con el QS en los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*. En el género *Enterobacter* la C₈-AH regula el sistema de secreción de tipo VI, *copA* (transportador de cobre) y *ferE* (gen relacionado con el aumento de la longitud de la cadena del antígeno O). Mientras que, en el género *Citrobacter* la C₈-AH regula la producción de la biopelícula y la virulencia (Coulthrust *et al.*, 2007 y Sabag-Daigle *et al.*, 2015). El género *Pseudomonas* las proteínas reguladoras (LasR, QscR, PsaR₁ y PsaR₃) censan en diferente magnitud a la C₈-AHL. A la fecha, el regulador LasR regula fenotipos de virulencia en respuesta a la molécula señal C₄-AHL, el represor QscR regula el sistema QS canónico de *P. aeruginosa* y responde preferencialmente a la molécula autoinductora C₁₀-AHL. Ambos reguladores transcripcionales son los más estudiados. Pero no hay información del papel de la C₈-AHL en este microorganismo. Mientras que, los reguladores LuxR Solo (PsaR₁ y PsaR₂), regulan fenotipos de virulencia en *P. syringae*, un patógeno de Kiwi (Kawaguchi *et al.*, 2008, Patel *et al.*, 2014 y Chugani *et al.*, 2015).

15.3 Identificación de los grupos funcionales de la C₈-AHL por FTIR

Mediante el análisis de FTIR fue posible identificar los grupos funcionales característicos de la 3-oxo-C₈-AHL (los grupos R-O-R del anillo de lactona, el enlace NH y CO) en las 3 bacterias de estudio lo cual fue consistente con el estándar de acuerdo con las cartas de interpretación de Derrick *et al.*, 2000 y los reportes de Cámara *et al.*, 1998, Aghadosi *et al.*, 2015, Modarresi *et al.*, 2016 y Singh *et al.*, 2017.

15.4 Degradación de la C₈-AHL en las bacterias Gram negativas

Existen factores fisicoquímicos involucrados en la producción de las AHLs como la composición del medio, temperatura y el pH. Los nutrientes en el medio de crecimiento (LB y medio mínimo M9) también son un factor

importante en la producción de moléculas autoinducidas, como ejemplo se encuentran *Aeromonas hydrophila* (Medina-Martínez *et al.*, 2006) y *Yersinia enterocolitica* (Medina-Martínez *et al.*, 2007). También, las condiciones ambientales son importantes en la producción de las AHLs como la temperatura de incubación. Ejemplos son las bacterias *E. carotovora* subsp. *carotovora* cepa EC153 (35°C) y *Aliivibrio salmonicida* (6, 12 y 16°C) (Hasegawa *et al.*, 2005, Decho *et al.*, 2009 y Hansen *et al.*, 2015). Además, el pH es otro factor involucrado en la producción y estabilidad de las AHLs, debido a que el anillo de lactona es muy sensible a los cambios de pH en el medio y se reporta que a pH ácido pueden hidrolizarse (Steindler y Venturi, 2007). También, el hospedero afecta la producción de las moléculas autoinducidas como ejemplo los estudios cinéticos de la síntesis y el decaimiento de la concentración de las moléculas señal en *E. coli* que se sitúan en diferentes zonas del intestino de algunos mamíferos. Sin embargo, a la fecha no se ha documentado que se produzcan las AHLs (Swearingen *et al.*, 2013).

En el género *Pseudomonas* se ha encontrado que la degradación de la C₈-AHL es afectada por el cambio de pH, por la disminución del pH en solución acuosa. Además, a temperaturas de 22 y 37°C se hidroliza el anillo de lactona (Yates *et al.*, 2002).

En resumen, las variables físicas, químicas y biológicas afectan la producción, estabilidad y distribución de las moléculas autoinducidas producidas por las bacterias Gram negativas (Horswill *et al.*, 2007). Otros autores han encontrado que la vida media de las AHLs es de 7 días (Trovato *et al.*, 2014). Además, las bacterias producen AHL-lactonasas que degradan a las AHLs e hidrolizan el anillo de lactona. También, las AHL acilasas y las oxidoreductasas degradan las AHLs del lado de la cadena lateral (Fetzner, 2015). En el género *Enterobacter* se reportan enzimas AHL-lactonasas (Rajesh y Rai, 2015) y en *Pseudomonas* también hay informes, de la producción de enzimas degradadoras de AHLs (Koul y Kalia, 2017), y en el género *Citrobacter* hay pocas secuencias en las bases de datos correspondientes a la familia de las AHL-lactonasas y la acilasa (*aiiA*), de las cuales se reportan los ensayos de actividad enzimática en las cepas *Citrobacter gillenii* y *Citrobacter rodentium* (Swearingen *et al.*, 2013, Pundir *et al.*, 2017 y Torabi Delshad *et al.*, 2018).

ETAPA III

16 Cuantificación del autoinductor y la actividad poligalacturonasa (APGs) en *P. aeruginosa* IFVB

En base a los resultados observados se observó que la cepa *P. aeruginosa* IFVB fue capaz de producir la molécula AHL. La cual se observó que produjo los mas altos induces de inducción en fase media logarítmica. Lo cual es comparable con estudios que se han hecho en cepas Gram negativas, en las cuales se ha observado un comportamiento parecido (Yeon et al., 2008 y Kawaguchi et al., 2008).

La importancia biológica de la PGsa encontrada en *P. aeruginosa* IFVB sugiere que posee la habilidad de hidrolizar la pared celular vegetal del fruto del que fue aislada (*V. planifolia*), liberando ciertos precursores aromáticos que contribuyen al perfil aromático de las vainas de vainilla. Un ejemplo, el AF que fue objeto de estudio. También, los resultados demostraron que la concentración de la PGsa en *P. aeruginosa* IFVB aumentó durante la fase estacionaria de crecimiento. En *E. carotovora* la actividad enzimática es regulada por el factor transcripcional RpoS, indicando que la actividad enzimática está en función de las fases del crecimiento (Eriksson et al., 1998).

16.1 Efecto de la C₈-AHL en la actividad poligalacturonasa (APGs) en *P. aeruginosa* IFVB

En el ensayo se adicionó la C₈-AHL, la selección de la concentración de la C₈-AHL (1μM) fue en base a previos estudios en *E. carotovora* y la regulación de la APGs (Burr et al., 2006). Como resultado, se observó un aumento en la APGs durante las primeras horas del monitoreo (4-12 h) (Figura 37). Lo cual sugiere que la C₈-AHL está participando en la regulación de la producción de las enzimas PGs y la relación con el sistema QS de *P. aeruginosa* IFVB. A la fecha, se tiene poca evidencia de la relación entre las enzimas PGs y el sistema QS en el género *Pseudomonas*. Con los resultados se estableció una relación de la APGs con el sistema QS mediante la señal autoinductora (C₈-AHL). Un estudio en *Pseudomonas* sp. cepa StFLB209 (aislada a partir de hojas de papa), demostró que al adicionar la C₈-AHL al medio líquido, aumenta la concentración de las enzimas como la pectato liasa. Además, se sugiere que los genes *ppuI*, *rsaL* y *ppuR* están relacionados con el QS de *Pseudomonas* y las moléculas autoinductoras C₆-AHL, C₈-AHL y C₁₂-AHL favorecen la actividad enzimática (Kato et al., 2015 y Morohoshi et al., 2008).

16.2 Modelo propuesto de la APGs y QS en *P. aeruginosa* IFVB

P. aeruginosa produce una amplia gama de reguladores negativos que regulan la síntesis de la familia de las AHLs (C₄-AHL, C₈-AHL, C₁₀-AHL y C₁₂-AHL). La producción de la molécula C₈-AHL está poco documentada en el género, pero se ha observado que activa procesos bacterianos en menor grado por la afinidad del regulador transcripcional por la molécula autoinductora (Figura 43). Pero, el adiconamiento de la C₈-AHL puede llegar a bloquear la unión de las moléculas autoinductoras C₄-AHL, C₁₀-AHL y C₁₂-AHL con los reguladores del QS, reflejando un efecto en la AP.

Por otro lado, la familia de los superreguladores del QS es muy extensa y se conocen al menos 4 reguladores transcripcionales que posiblemente regulan la actividad pectinolítica, con la capacidad de unirse a la molécula C₈-AHL. (1) los reguladores del sistema canónico (LasR) y (2) el sistema incompleto del QS (QscR, PsaR₁ y PsaR₂). También, el regulador RpoS participa en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios como las enzimas pectinolíticas. En la tabla 13, se presentan de manera detallada la familia de los superreguladores del QS en el género *Pseudomonas* abarcando el regulador transcripcional, el sistema de regulación, mecanismo, los dominios de unión a la C₈-AHL, el sistema de co-regulación, la respuesta a la C₈-AHL y el docking molecular.

Tabla 13. Mecanismos de regulación de QS en el género *Pseudomonas*

Regulador	Regulación	Mecanismo		Dominios	Co-regulación	Respuesta a la C ₈ -AHL	Docking
LasR	Positiva	Regulador transcripcional de QS "Sistema 1"		Unión a AHL	QscR	40%	Si
RhlR	Positiva	Regulador transcripcional de QS "Sistema 2"		Unión a AHL	QscR	-	-
QscR	Positivo/negativo	Anti-activador de LasR y RhlR	Represor transcripcional	Unión a AHL	LasR/RhlR	14%	Si
RpoS	Negativa	Regulador transcripcional de <i>lasR</i> y <i>rhlR</i>	Represor transcripcional	-	LasR/RhlR	-	-
PsaR ₁	-	-	-	Unión a AHL	-	94%	Si
PsaR ₃	-	-	-	Unión a AHL	-	96%	Si

Fuente. Williams *et al.*, 2007, Lee y Zhang., 2014, Patel *et al.*, 2014, Rajput *et al.*, 2016 y Pundir *et al.*, 2017.

Con los datos anteriores fue posible inferir un modelo teórico (Figura 40) basándose en los datos publicados de los reguladores transcripcionales (LasR/RhlR) y la proteína LuxR Solo (QscR), los estudios de los genes fusionados de los reguladores transcripcionales y el análisis de docking molecular de la C₈-AHL con los reguladores transcripcionales.

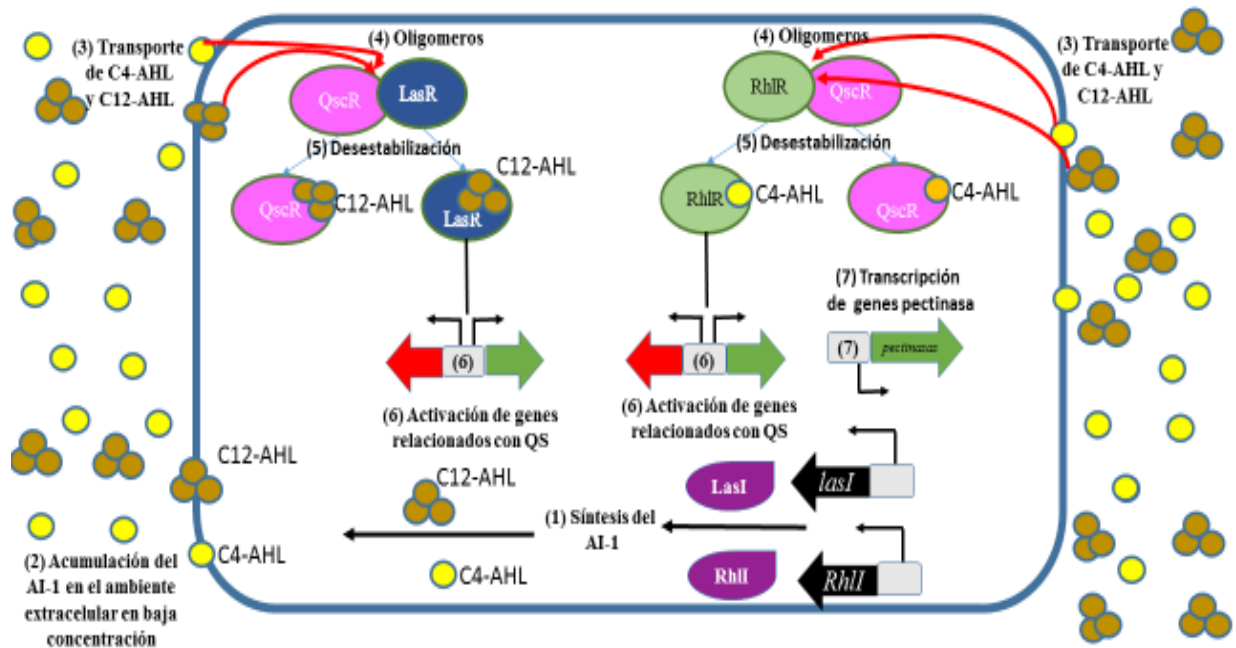


Figura 40. Sistema canónico del QS en *P. aeruginosa* cuando producen las moléculas C₄-AHL y C₁₂-AHL (Modelo propuesto a partir de Williams *et al.*, 2007, Lee y Zhang., 2014, Patel *et al.*, 2014, Rajput *et al.*, 2016 y Pundir *et al.*, 2017).

La figura 41 representa las fases tempranas del crecimiento, saturando con la C₈-AHL y a baja densidad celular. Los reguladores LasR/RhlR y QscR pueden censar la C₈-AHL, mediante un posible mecanismo de regulación. El cual da inicio con el regulador maestro QscR que en fases tempranas del crecimiento no permite la síntesis de la molécula autoinductora C₁₂-AHL y por lo tanto la activación de los genes regulados por la C₁₂-AHL, y a su vez censura la molécula C₈-AHL en bajos porcentajes (14%) (Williams *et al.*, 2007, Lee y Zhang., 2014, Patel *et al.*, 2014, Rajput *et al.*, 2016 y Pundir *et al.*, 2017).

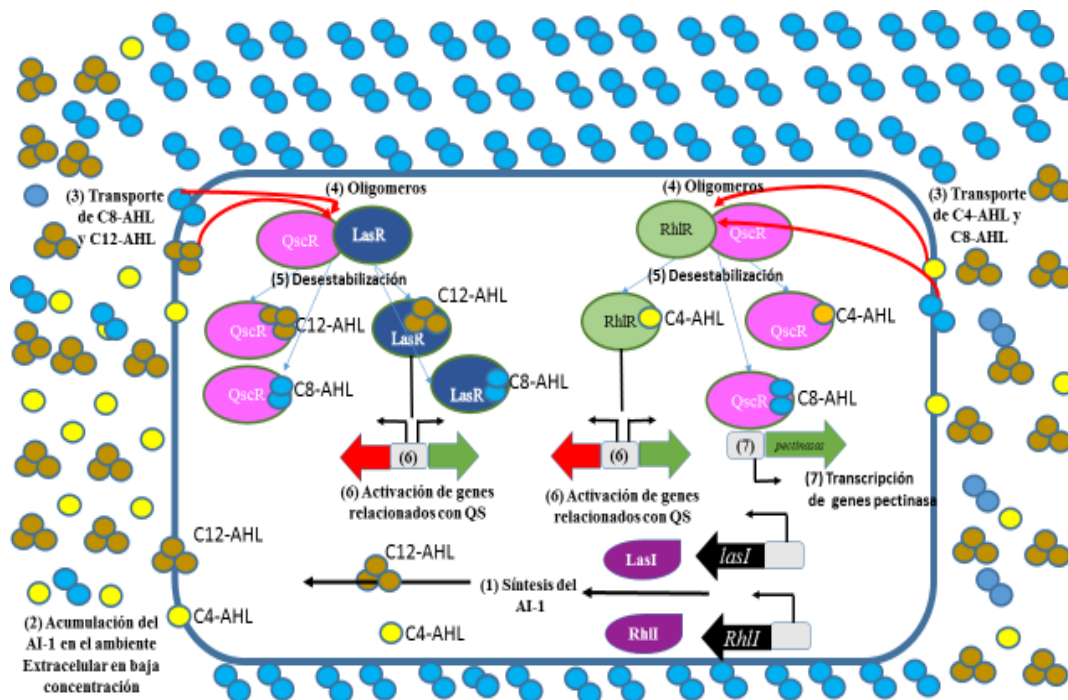


Figura 41. Modelo teórico del QS en *P. aeruginosa* cuando se satura con $1\mu\text{M}$ de la $\text{C}_8\text{-AHL}$ (círculos dobles en azul) y su efecto en la actividad pectinolítica en un sistema canónico regulado por LasR , RhIR y QscR (Modelo propuesto a partir de Williams *et al.*, 2007, Lee y Zhang., 2014, Patel *et al.*, 2014, Rajput *et al.*, 2016 y Pundir *et al.*, 2017).

Lo anterior explicaría la disponibilidad de los reguladores transcripcionales censando a la molécula $\text{C}_8\text{-AHL}$. Por otro lado, en otras cepas como *P. syringae*, se ha demostrado que hay reguladores del tipo LuxR Solo (PsaR_1 y PsaR_3) que responden a la $\text{C}_8\text{-AHL}$, que mediante el análisis docking molecular se ha demostrado que la $\text{C}_8\text{-AHL}$ tiene una afinidad con ambos reguladores es mayor al 94% (Patel *et al.*, 2014).

16.3 Efecto de la $\text{C}_8\text{-AHL}$ en la producción del AV de las bacterias Gram negativas

En el presente estudio, no fue posible determinar el efecto de la $\text{C}_8\text{-AHL}$ en las bacterias Gram negativas de estudio. Aunque se ha encontrado que las bacterias Gram negativas se ha encontrado que la molécula $\text{C}_8\text{-AHL}$ regula procesos bacterianos como el sistema de secreción del tipo VI, *copA* (transportador de cobre), la colonización de plantas de maíz y el gen *ferE* al adicionar la $\text{C}_8\text{-AHL}$ (Sabag-Daigle *et al.*, 2015). En *P. aeruginosa* se ha encontrado que la $\text{C}_8\text{-AHL}$ es censada por los reguladores transcripcionales del QS en diferente forma (Patel *et al.*, 2015) y además regula el catabolismo de fuentes de carbono (Wagner *et al.*, 2003). Por otro lado, existe un estudio de *E.*

coli en el que se propuso la correlación del QS y los CAs, en el cual se sugiere el efecto de la sobreexpresión de los genes *mtn* y *luxS* cuando se suplementa con metionina, observando un aumento en la disponibilidad de SAM en el ciclo de activación del metilo (la ruta bioquímica involucrada en la biosíntesis de moléculas autoinductoras y el ácido vanílico). En el estudio se encontró que la cepa recombinante produjo vainillina en una concentración de $419 \pm 58 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en un tiempo de 72 h (Kunjapur y Prather, 2016). Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron menores a los reportados, debido a que las condiciones fueron diferentes a las reportadas en la cepa recombinante de *E. coli*. Con lo anterior, se recomienda explorar diferentes condiciones, tiempos de monitoreo y escalamiento de los cultivos con la adición de la C₈-AHL en cada una de las cepas.

ETAPA IV

17 Producción del AV durante las interacciones bacterianas

17.1 Interacción I: *P. aeruginosa* IFVB-*C. amalonaticus* IFVB

Los resultados del presente estudio de AAF, producción de los CAs y perfiles de resistencia demostraron que *P. aeruginosa* IFVB-*C. amalonaticus* IFVB y producen el AV. Pero no se encontró efecto en la producción del compuesto aromático AV, debido a que se observó menor producción del AV en comparación con los cultivos individuales (Figura 38 y Tabla 12). Por lo tanto, la disminución del AV en los microorganismos de estudio posiblemente fue por efecto antagónico de los microorganismos, debido a que tienen la capacidad de producir exoproductos (bacteriocinas y sideróforos) y son resistentes a algunos antibióticos (Šmarda *et al.*, 2007).

17.2 Interacción II: *P. aeruginosa* IFVB-*E. cloacae* IFVB

Las condiciones de estudio no permitieron comparar los resultados con los experimentos individuales debido a que no se encontró efecto de la C₈-AHL en la producción del compuesto aromático AV (Figura 38 y Tabla 12). Por lo anterior, se recomienda explorar diferentes condiciones, tiempos de monitoreo y escalamiento de los cultivos con la adición de la C₈-AHL en cada una de las cepas de estudio para mejorar el rendimiento de la producción del AV.

17.3 Identificación de los grupos funcionales del AV identificados por la metodología FTIR en los experimentos individuales e interacciones

Los resultados del espectro IR del AV se compararon con la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), el reporte de Clavijo *et al.*, (2008) y las tablas de correlación de Derrick *et al.*, 2000. En todos los casos, las bacterias Gram negativas presentaron los mismos grupos funcionales correspondientes al AV, ya sea en cultivos individuales e interacciones (Figura 30 y 42). Concluyendo que las bacterias del presente estudio bioconvierten el sustrato AF al subproducto AV. Una característica importante en la adaptación al ciclo de vida saprófito e interacción con las vainas de *V. planifolia*, lo cual facilita la adquisición de capacidades de biosíntesis de los CAs que contribuyen al aroma característico de las vainas de vainilla, como se ha descrito en otros microorganismos que interactúan con plantas, suelo y frutos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, *B. cereus* IFVB, *B. subtilis* IFVB, *P. aeruginosa* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB fueron los 4 géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia de las diferentes etapas del proceso tradicional del curado de las vainas de *V. planifolia* Jacks ex Andrews.
2. El mejor método para cuantificar la actividad pectinolítica y la asimilación del ácido ferúlico de las cepas en estudio, fue el método por pozo en placa.
3. *P. aeruginosa* IFVB fue la bacteria que mejor hidrolizó la pectina y produjo la mayor concentración del AV por método de pozo y pellet.
4. Todos los géneros bacterianos de estudio presentaron actividad pectinolítica y bioconvirtieron el ácido ferúlico al ácido vanílico.
5. *B. subtilis* IFVB produjo la mayor concentración del AV en comparación con las tres bacterias Gram negativas analizadas.
6. Los tres géneros Gram negativos analizados, *C. amalonaticus* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *P. aeruginosa* IFVB, produjeron enzimas poligalacturonasas. *P. aeruginosa* IFVB fue capaz de hidrolizar con mayor actividad enzimática el APG.

7. *E. cloacae* IFVB bioconvirtió AF y produjo la mayor concentración de AV en comparación con *C. amalonaticus* IFVB y *P. aeruginosa* IFVB.
8. Los tres géneros Gram negativos mostraron diferentes perfiles de resistencia al ácido vanílico, p-hidroxibenzaldehído y vainillina. Mientras que, *E. cloacae* IFVB y *C. amalonaticus* IFVB son las más resistentes a los tres compuestos aromáticos.
9. *C. amalonaticus* IFVB, *E. cloacae* IFVB y *P. aeruginosa* IFVB produjeron la molécula C₈-AHL.
10. Específicamente, *P. aeruginosa* IFVB produjo los índices más altos de inducción y concentración de C₈-AHL. Mientras que, *E. cloacae* IFVB fue la bacteria que degradó con mayor facilidad esta molécula autoinductora.
11. Puede sugerirse que los procesos de actividad poligalacturonasa en el modelo bacteriano *P. aeruginosa* IFVB, están relacionados con el mecanismo de *Quorum sensing*.
12. La mejor interacción para evaluar la producción de AV durante las interacciones fue *P. aeruginosa* IFVB-*E. cloacae* IFVB.

PERSPECTIVAS

1. Cuantificar la actividad poligalacturonasa en las cepas representativas del género *Bacillus* por método colorimétrico DNS en base a las etapas del curado.
2. Cuantificar el AV por metodología HPLC y la identificación de los grupos funcionales del AV por FTIR en las cepas representativas del género *Bacillus* en base a las etapas del curado.
3. Identificar la CMI (AV, V y PHB) en las cepas representativas del género *Bacillus* en base a las etapas del curado.
4. Monitorear la actividad poligalacturonasa en diferentes tiempos de monitoreo en *B. subtilis* IFVB, *C. amalonaticus* IFVB y *E. cloacae* IFVB por método colorimétrico DNS en base a las etapas del curado.
5. Se sugiere proponer metodologías colorimétricas cuantitativas para describir las enzimas que participan en la bioconversión del sustrato AF al AV para conocer el papel biológico de *B. subtilis* IFVB, *P. aeruginosa* IFVB y *E. cloacae* IFVB en la producción de CAs.

6. Se recomienda cuantificar el transcripto de las enzimas poligalaturonasa por RT-PCR producidas por *P. aeruginosa* IFVB para confirmar el adiconamiento de la C₈-AHL.
7. La búsqueda por PCR de los genes que participan en la bioconversión del AF al AV y en la hidrólisis del sustrato ácido poligalacturónico en los microorganismos de estudio.
8. La búsqueda por PCR de los genes autoinductor sintasa, así como el regulador homólogo a LuxI/LuxR de las cepas Gram negativas.
9. Se sugiere proponer metodologías para conocer el metabolismo de los microorganismos de estudio y las enzimas que participan en la bioconversión del sustrato AF a los productos de la bioconversión del AV para conocer el papel de cada uno de los microorganismos en la producción de los CAs bajo condiciones *in vitro*.
10. Se sugiere proponer metodologías para encontrar la relación del QS con la producción del AV en los microorganismos de estudio.
11. Se sugiere proponer metodologías para encontrar la relación de QS con la producción de las enzimas PGs en *P. aeruginosa* IFVB.

REFERENCIAS

1. Abbott DW and Boraston AB. 2008. Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72, 301–16.
2. Ammar E, Nasri M and Medhioub, K. 2005. Isolation of *Enterobacteria* able to degrade simple aromatic compounds from the wastewater from olive oil extraction. *World J Microbiol Biotechnol.* 21, 253-259.
3. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., and Momenbeik, F. 2011. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. *New biotechnology.* 28, 656-664.
4. Attri S and Garg G. 2014. Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. *J Innov Biol.* 1, 45–50.
5. Bai, A. J., and Rai, V. R. 2011. Bacterial *Quorum Sensing* and food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 183-193.
6. Bandara, H. M. H. N., Lam, O. L. T., Jin, L. J., and Samaranayake, L. 2012. Microbial chemical signaling: a current perspective. *Critical reviews in microbiology*, 38(3), 217-249.
7. Barghini, P., F. Montebove, M. Ruzzi, and A. Schiesser. 1998. “Optimal Conditions for Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by *Pseudomonas fluorescens* BF13 Cells.” *Applied Microbiology and Biotechnology.* 49(3): 309–14.
8. Barret, M., Egan, F., Moynihan, J., Morrissey, J. P., Lesouhaitier, O., and O’Gara, F. 2013. Characterization of the SPI-1 and R sp type three secretion systems in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Environmental microbiology reports*, 5(3), 377-386.
9. Borenshtein, Diana; Schauer and David B. 2006. El género *Citrobacter*. *Los procariotas: Volumen 6: Proteobacterias: subclase gamma*, pág. 90-98.

10. Brennic, A. and Winans, S.C. 2005. Detection of and response to signals involved in host–microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155–194.
11. Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buchholtz, C., Larsen, J. L., and Gram, L. 2005. *Quorum Sensing* signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of aquatic organisms*, 65(1), 43-52.
12. Burr, T., Barnard, A. M., Corbett, M. J., Pemberton, C. L., Simpson, N. J., and Salmond, G. P. 2006. Identification of the central Quorum Sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Molecular microbiology*, 59(1), 113-125.
13. Calisti, C., Ficca, A. G., Barghini, P., and Ruzzi, M. 2008. Regulation of ferulic catabolic genes in *Pseudomonas fluorescens* BF13: involvement of a MarR family regulator. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 475-483.
14. Càmara, M., Daykin, M., and Chhabra, S. R. 1998. Detection, Purification, and Synthesis of n-acylhomoserine Lactone *Quorum Sensing* Signal Molecules. In *Methods in Microbiology* (Vol. 27, pp. 319-330). Academic Press.
15. Campbell, J., Lin, Q., Geske, G. D., and Blackwell, H. E. 2009. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type *Quorum Sensing* by cyclic dipeptides. *ACS chemical biology*, 4(12), 1051-1059.
16. Cases, I., and De Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nature Reviews Microbiology*, 3(2), 105.
17. Castañón-Rodríguez, J. F., Pérez-Rodríguez, N., de Souza Oliveira, R. P., Aguilar-Uscanga, M. G., and Domínguez, J. M. 2016. Use of Vine-Trimming Wastes as Carrier for *Amycolatopsis* sp. to Produce Vanillin, Vanillyl Alcohol, and Vanillic Acid. *Current microbiology*, 73(4), 561-568.
18. Cava R RM, Taboada RA, Valverde F MT and Marín IF. 2012. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2120–31.
19. Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, *et al.* 1995. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol.* 61, 1959–67.
20. Chen, C., Pan, J., Yang, X., Xiao, H., Zhang, Y., Si, M., Shen, X., and Wang, Y. 2017. Global transcriptomic analysis of the response of *Corynebacterium glutamicum* to ferulic acid. *Archives of microbiology*. 199, 325-334.
21. Chen, P., Yan, L., Wu, Z., Li, S., Bai, Z., Yan, X., ... and Li, H. 2016. A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid. *Scientific reports*, 6, 20400.
22. Chen, Y. G., Gu, F. L., Li, J. H., Xu, F., He, S. Z., and Fang, Y. M. 2015. *Bacillus vanillea* sp. nov., isolated from the cured vanilla bean. *Current microbiology*, 70(2), 235-239.
23. Cho, D. H., Lee, Y. J., Um, Y., Sang, B. I., and Kim, Y. H. 2009. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. *Applied microbiology and biotechnology*. 83, 1035-1043.
24. Choo, J. H., Rukayadi, Y., & Hwang, J. K. 2006. Inhibition of bacterial *Quorum Sensing* by vanilla extract. *Letters in applied microbiology*, 42(6), 637-641.
25. Chu, P. M., Guenther, F. R., Rhoderick, G. C., and Lafferty, W. J. 1999. The NIST quantitative infrared database. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*. 104, 59.
26. Chugani, Sudha, and Everett P. Greenberg. 2015. “Corrigendum: An Evolving Perspective on the *Pseudomonas aeruginosa* Orphan *Quorum Sensing* Regulator QscR.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00181/abstract>.
27. Civolani, C., Barghini, P., Roncetti, A. R., Ruzzi, M., and Schiesser, A. 2000. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Applied and environmental microbiology*. 66, 2311-2317.
28. Clavijo, E., Menéndez, J. R., and Aroca, R. 2008. Vibrational and surface-enhanced Raman spectra of vanillic acid. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of*

- Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and Brillouin and Rayleigh Scattering. 39, 1178-1182.
29. Coulthrust, Sarah J. *et al.* 2007. "Quorum Sensing Has an Unexpected Role in Virulence in the Model Pathogen *Citrobacter Rodentium*." EMBO Reports 8(7): 698–703.
 30. Darah I, Nisha M and Lim SH. 2015. Polygalacturonase production by calcium alginate immobilized *Enterobacter aerogenes* NBO₂ cells. Applied biochemistry and biotechnology. 175, 2629-2636.
 31. De Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. 2000. Bacterial *Quorum Sensing* in pathogenic relationships. Infection and immunity, 68(9), 4839-4849.
 32. Decho, A. W., Visscher, P. T., Ferry, J., Kawaguchi, T., He, L., Przekop, K. M., ... and Reid, R. P. 2009. Autoinducers extracted from microbial mats reveal a surprising diversity of N-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. Environmental microbiology, 11(2), 409-420.
 33. Deep, Antariksh, Uma Chaudhary, and Varsha Gupta. 2011. "Quorum Sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. Journal of Laboratory Physicians, 3(1): 4. <http://www.jlponline.org/text.asp?2011/3/1/4/78553>.
 34. Delaquis, P., Stanich, K., and Toivonen, P. 2005. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. Journal of food protection, 68(7), 1472-1476.
 35. Demir H and Tari C. 2016. Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. J. Sci. Food Agric. **96**, 3575-3582.
 36. Derrick, M. R., Stulik, D., and Landry, J. M. 2000. Infrared spectroscopy in conservation science. Getty Publications. pp. 95
 37. Dias, M., Miguel, M. G. D. C. P., Duarte, W. F., Silva, C. F., and Schwan, R. F. (2015) Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. Annals of microbiology. 65, 851-864.
 38. Díaz, Eduardo, and María A. Prieto. 2000. "Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants." Current Opinion in Biotechnology 11.5: 467-475.
 39. Dirix, G., Monsieurs, P., Dombrecht, B., Daniels, R., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Michiels, J. 2004. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. Peptides, 25(9), 1425-1440.
 40. Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., and Kim, S. J. 2015. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65(10), 3487-3492.
 41. Durante-Rodríguez, G., Gómez-Álvarez, H., Nogales, J., Carmona, M., and Díaz, E. 2018. One-Component Systems that Regulate the Expression of Degradation Pathways for Aromatic Compounds. Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions, 137-175.
 42. Eriksson, A. R., Andersson, R. A., Pirhonen, M., and Palva, E. T. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Molecular plant-microbe interactions, 11(8), 743-752.
 43. Faure, D., and Lang, J. 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. Frontiers in plant science, 5, 14.
 44. Federle, M. J., and Bassler, B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. The Journal of clinical investigation, 112(9), 1291-1299.
 45. Fetzner, S. 2015. Quorum quenching enzymes. Journal of biotechnology, 201, 2-14.
 46. Fibriansah, G., Kovács, Á. T., Pool, T. J., Boonstra, M., Kuipers, O. P., and Thunnissen, A. M. W. 2012. Crystal structures of two transcriptional regulators from *Bacillus cereus* define the conserved structural features of a PadR subfamily. PloS one, 7(11), e48015.
 47. Frenkel, Ch, AS. Ranadive, J Tochihiuitl-Vázquez and D Havkin-Frenkel. 2010. Chapter 6. Curing of vanilla. In Handbook of vanilla science and technology. p 79-103.

48. Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual review of microbiology*, 50(1), 727-751.
49. Gallage, N. J., and Møller, B. L. 2015. Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular plant*, 8(1), 40-57.
50. Ghazala, I., Sayari, N., Romdhane, M. B., Ellouz-Chaabouni, S., and Haddar, A. 2015. Assessment of pectinase production by *Bacillus mojavensis* I4 using an economical substrate and its potential application in oil sesame extraction. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7710-7722.
51. Goh, S. Y., Khan, S. A., Tee, K. K., Kasim, N. H. A., Yin, W. F., and Chan, K. G. 2016. *Quorum Sensing* activity of *Citrobacter amalonaticus* L8A, a bacterium isolated from dental plaque. *Scientific reports*, 6, 20702.
52. González ET and Allen C. 2003. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Molecular plant-microbe interactions*. 16, 536–44.
53. Gowda, L. K., and Marie, M. A. M. 2014. Role of quorum-sensing molecules in infections caused by Gram-negative bacteria and host cell response. *Reviews in Medical Microbiology*, 25(3), 66-70.
54. Graf, Nadja, Marian Wenzel, and Josef Altenbuchner. 2016. “Identification and Characterization of the Vanillin Dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(8): 3511–21.
55. Grimont, Francine and Grimont, Patrick AD. 2006. The genus *enterobacter*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, p. 197-214.
56. Grove, A. 2013. MarR family transcription factors. *Current biology*, 23(4), R142-R143
57. Gu F, Chen Y, Fang Y, *et al.* 2015. Contribution of *Bacillus* isolates to the flavor profiles of vanilla beans assessed through aroma analysis and chemometrics. *Molecules*. 20, 18422–36.
58. Hansen, H., Purohit, A. A., Leiros, H. K. S., Johansen, J. A., Kellermann, S. J., Bjelland, A. M., and Willassen, N. P. 2015. The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida*. *BMC microbiology*, 15(1), 69.
59. Harazono, K., Yamashita, N., Shinzato, N., Watanabe, Y., Fukatsu, T., and Kurane, R. 2003. Isolation and characterization of aromatics-degrading microorganisms from the gut of the lower termite *Coptotermes formosanus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 67, 889-892.
60. Hardman, Andrea M., Gordon S A B Stewart, and Paul Williams. 1998). “*Quorum Sensing* and the Cell-Cell Communication Dependent Regulation of Gene Expression in Pathogenic and Non-Pathogenic Bacteria.” *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 74(4): 199–210.
61. Hasegawa, H., Chatterjee, A., Cui, Y., and Chatterjee, A. K. 2005. Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the *Quorum Sensing* signal, N-acyl homoserine lactone, and extracellular proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8), 4655-4663.
62. Havkin-Frenkel D and Belanger FC. 2010. *Handbook of vanilla science and technology*. John Wiley and Sons. p. 62 y 82.
63. Heravi, K. M., Lange, J., Watzlawick, H., Kalinowski, J., and Altenbuchner, J. 2015. Transcriptional regulation of the vanillate utilization genes (vanABK operon) of *Corynebacterium glutamicum* by VanR, a PadR-like repressor. *Journal of bacteriology*, 197(5), 959-972.
64. Hernández-Hernández, J. 2010. Mexican vanilla production. *Handbook of vanilla science and technology*. 1-25.
65. Hooi, D. S W *et al.* 2004. “Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules.” *Infection and Immunity* 72(11): 6463–70.
66. Horswill, A. R., Stoodley, P., Stewart, P. S., and Parsek, M. R. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on *Quorum Sensing* in structured microbial communities. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), 371-380.

67. Hoskisson, P. A., and Rigali, S. 2009. Variation in form and function: the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Advances in applied microbiology*, 69, 1-22.
68. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., and Shevchik, V. E. 2014. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental microbiology reports*, 6(5), 427-440.
69. Hunter, William J., Daniel K. Manter, and Daniel Van Der Lelie. 2012. "Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*." *Current Microbiology*. 65(6): 752–57.
70. Ito N, Itakura M, Eda S, *et al.* 2006. Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. *Microbes Environ.* 21, 240–50.
71. Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., and Quax, W. J. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76(1), 46-65.
72. Jing-ping, G. E., Wen-xiang, P. I. N. G., Yuan, G. A. O., Hong-zhi, L. I. N. G., and Gang, S. O. N. G. 2008. Isolation, Identification, and Phyletic Analysis of a Pectinase-Producing Bacterial Strain HDYM-02 [J]. *Journal of Microbiology*, 6.
73. Kallscheuer, N., and Marienhagen, J. 2018. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids. *Microbial cell factories*. 17, 70.
74. Kamimura, N., Takahashi, K., Mori, K., Araki, T., Fujita, M., Higuchi, Y., and Masai, E. 2017. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism. *Environmental microbiology reports*, 9(6), 679-705.
75. Karishma, M., Trivedi, V. D., Choudhary, A., Mhatre, A., Kambli, P., Desai, J., and Phale, P. S. 2015. Analysis of preference for carbon source utilization among three strains of aromatic compounds degrading *Pseudomonas*. *FEMS microbiology letters*, 362(20), fnv139.
76. Kato, T., Morohoshi, T., Someya, N., & Ikeda, T. (2015). The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates cellular motility, pectate lyase activity, and virulence in potato opportunistic pathogen *Pseudomonas* sp. StFLB209. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 79(4), 673-680.
77. Kaur, S. J., and Gupta and V. K. 2017. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Annals of microbiology*, 67(4), 333-342.
78. Kawaguchi, T., Chen, Y. P., Norman, R. S., and Decho, A. W. 2008. Rapid screening of quorum-sensing signal N-acyl homoserine lactones by an *in vitro* cell-free assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(12), 3667-3671.
79. Kirisits, M. J., Margolis, J. J., Purevdorj-Gage, B. L., Vaughan, B., Chopp, D. L., Stoodley, P., and Parsek, M. R. 2007. Influence of the hydrodynamic environment on *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 189(22), 8357-8360.
80. Kunjapur, Aditya M., Jason C. Hyun, and Kristala L.J. Prather. 2016. "Deregulation of S-Adenosylmethionine Biosynthesis and Regeneration Improves Methylation in the *E. coli* de Novo Vanillin Biosynthesis Pathway." *Microbial Cell Factories*. 15(1).
81. La Torre-Ruiz D, Ruiz-Valdiviezo VM and Rincón-Molina. 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian journal of microbiology*. 47, 587-596.
82. Labuda, I., Daphna, H. F., and Faith, C. B. 2010. Biotechnology of vanillin: vanillin from microbial sources. *Handbook of vanilla science and technology*, 299, 311.pp. 26.
83. Lade, Harshad, Diby Paul, and Ji Hyang Kweon. 2014. "Isolation and Molecular Characterization of Biofouling Bacteria and Profiling of *Quorum Sensing* Signal Molecules from Membrane Bioreactor Activated Sludge." *International Journal of Molecular Sciences* 15(2): 2255–73.
84. Lau, Y., Sulaiman, J., Chen, J., Yin, W. F., and Chan, K. G. 2013. *Quorum Sensing* activity of *Enterobacter asburiae* isolated from lettuce leaves. *Sensors*, 13(10), 14189-14199.
85. Lee y Zhang, 2014. Lee, J., and Zhang, L. 2015. The hierarchy *Quorum Sensing* network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and cell*, 6(1), 26-41.
86. Lee, D. H., Lim, J. A., Lee, J., Roh, E., Jung, K., Choi, M., ... and Heu, S. 2013. Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage. *Microbiology*, 159(Pt 7), 1487.

87. Lee, Jasmine, and Lianhui Zhang. 2014. "The Hierarchy *Quorum Sensing* Network in *Pseudomonas aeruginosa*." *Protein and Cell* 6(1): 26–41.
88. Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P., and Asther, M. 1996. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of biotechnology*, 50(2-3), 107-113.
89. Li, X., Yang, J., Li, X., Gu, W., Huang, J., and Zhang, K. Q. 2008. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp. Px6-4 isolated from Vanilla root. *Process Biochemistry*, 43(10), 1132-1137.
90. Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A. L., Mattmann, M. E., Christensen, Q. H., Kessler, A., ... and Harwood, C. S. 2011. Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16765-16770.
91. Liu, H. B., Lee, J. H., Kim, J. S., and Park, S. 2010. Inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator, QscR. *Biotechnology and bioengineering*, 106(1), 119-126.
92. Lu, L., Hume, M. E., and Pillai, S. D. 2005. Autoinducer-2-like activity on vegetable produce and its potential involvement in bacterial biofilm formation on tomatoes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(3), 242-249.
93. Lu, R., Osei-Adjei, G., Huang, X., and Zhang, Y. 2018. Role and regulation of the orphan AphA protein of *Quorum Sensing* in pathogenic Vibrios. *Future microbiology*, 13(3), 383-391.
94. Luna-Guevara JJ, Ruiz Espinosa H, Herrera Cabrera EB, *et al.* 2016. Variety of microflora present in vanilla (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews) and its relationship with curing processes. *Agroproductividad*. 9, 3–9.
95. Luna-Guevara, M. L. 2011. Producción de autoinductores y biopelículas microbianas y su relación con la calidad y composición química de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivado en la región de Aquixtla, Puebla.
96. Madhani, H. D. 2011. *Quorum Sensing* in fungi: Q and A. *PLoS pathogens*, 7(10), e1002301.
97. Mahto, R. B., Yadav, M., Sasmal, S., and Bhunia, B. (2019). Optimization of Process Parameters for Production of Pectinase using *Bacillus Subtilis* MF447840. 1. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 69-73.
98. Manso, I., Torres, B., Andreu, J. M., Menendez, M., Rivas, G., Alfonso, C., ... and Galan, B. 2009. 3-Hydroxyphenylpropionate and phenylpropionate are synergistic activators of the MhpR transcriptional regulator from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21218-21228.
99. Mateos PF, Jimenez Zurdo JI, Chen J, *et al.* 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol.* **58**, 1816–22.
100. Mathew, S., and Abraham, T. E. 2004. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), 59-83.
101. Medina-Martinez, M. S., Uyttendaele, M., Demolder, V., and Debevere, J. 2006. Effect of temperature and glucose concentration on the N-butanoyl-L-homoserine lactone production by *Aeromonas hydrophila*. *Food microbiology*, 23(6), 534-540.
102. Miller GL. (1959) Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
103. Miller, M. B., and Bassler, B. L. 2001. *Quorum Sensing* in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
104. Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., and Bassler, B. L. 2002. Parallel *Quorum Sensing* systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110(3), 303-314.
105. Mishra, S., Kullu, M., Sachan, A., Vidyarthi, A. S., and Sachan, S. G. 2016. Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Paenibacillus lactis* SAMS-2001. *Ann Microbiol.* **66**, 875-882.
106. Mishra, S., Sachan, A., Vidyarthi, A. S., and Sachan, S. G. 2014. Microbial production of 4-vinylguaiacol from ferulic acid by *Bacillus cereus* SAS-3006. *Biocatal Biotransformation.* **32**, 259-266.
107. Morawski B, Segura A, Ornston LN. 2000. Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase. *J Bacteriol.* 182(5):1383–1389

108. Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS microbiology letters*, 279(1), 124-130.
109. Motedayen, N., Ismail, M. B., and Nazarpour, F. 2013. Bioconversion of ferulic acid to vanillin by combined action of *Aspergillus niger* K8 and *Phanerochaete cryosporium* ATCC 24725. *African Journal of Biotechnology*, 12(47), 6618-6624.
110. Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B., and Bassler, B. L. 2017. The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS pathogens*, 13(7), e1006504.
111. Nazzaro, F., Fratianni, F., and Coppola, R. 2013. *Quorum Sensing* and phytochemicals. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12607-12619.
112. Okolie PN and Ugochukwu EN. 1988. Changes in activities of cell wall degrading enzymes during fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with *Citrobacter freundii*. *J Sci Food Agric*. 44, 51–61.
113. Pardio, V. T., Mariezcurrena, M. D., Waliszewski, K. N., Sánchez, V., and Janczur, M. K. 2009. Effects of killing conditions of vanilla (*V. planifolia*, Andrews) pods during the curing process on aroma composition of pod ethanol extract. *International journal of food science and technology*, 44(12), 2417-2423.
114. Patel, Hitendra Kumar *et al.* 2014. “The Kiwifruit Emerging Pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *Actinidiae* Does Not Produce AHLs but Possesses Three luxR Solos.” *PLoS ONE* 9(1).
115. Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., and Domínguez, J. M. 2016. *Bacillus aryabhatai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32, 159.
116. Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., and Greenberg, E. P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 197-201.
117. Peña MJ, Kulkarni AR, Backe J, *et al.* 2016. Structural diversity of xylans in the cell walls of monocots. *Planta*. 244, 589–606.
118. Pereira, C. S., Thompson, J. A., and Xavier, K. B. 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 37(2), 156-181.
119. Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., & Palva, E. T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO journal*, 12(6), 2467-2476.
120. Pruitt, K. D., Tatusova, T., and Maglott, D. R. 2006. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D61-D65.
121. Pundir S, Maria JM and CO. 2017. UniProt protein knowledgebase. *Protein Bioinformatics: from protein modifications and networks to proteomics*. 41–55.
122. Rai, Navneet, Rewa Rai, and K. V. Venkatesh. Quorum. 2015. “*Quorum Sensing* Biosensors.” In *Quorum Sensing vs Quenching: A Battle with No End in Sight*. 171–83.
123. Rajesh y Rai, 2015. Rajesh, P. S., and Rai, V. R. 2015. Use of *aiiA* gene amplification for AHL-lactonase production from endophytic bacterium *Enterobacter* species. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1013-1019.
124. Rajput, Akanksha, Karambir Kaur, and Manoj Kumar. 2016. “SigMol: Repertoire of *Quorum Sensing* Signaling Molecules in Prokaryotes.” *Nucleic Acids Research* 44(D1): D634–39.
125. Rasch, M., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Flodgaard, L. R., Christensen, H., Givskov, M., and Gram, L. 2005. Involvement of bacterial quorum-sensing signals in spoilage of bean sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3321-3330.
126. Ravi, K., García-Hidalgo, J., Gorwa-Grauslund, M. F., and Lidén, G. 2017. Conversion of lignin model compounds by *Pseudomonas putida* KT2440 and isolates from compost. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(12), 5059-5070.

127. Reading, N. C., and Sperandio, V. 2006. *Quorum Sensing: the many languages of bacteria*. FEMS microbiology letters, 254(1), 1-11.
128. Reddy MP C and Saritha K V. 2016. Effects of the culture media optimization on pectinase production by *Enterobacter* sp. PSTB-1. *Biotech.* 6, 1-11.
129. Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., Molinaro, A., and Ansari, A. 2013. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food chemistry*, 139(1-4), 1081-1086.
130. Röling, W. F M *et al.* 2001. "Microorganisms with a Taste for Vanilla: Microbial Ecology of Traditional Indonesian Vanilla Curing." *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5): 1995–2003.
131. Sabag-Daigle, Anice *et al.* 2015. "Identification of *sdiA*-Regulated Genes in a Mouse Commensal Strain of *Enterobacter cloacae*." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5. http://www.frontiersin.org/Cellular_and_Infection_Microbiology/10.3389/fcimb.2015.00047/abstract.
132. Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F., and Cobos-Peralta, M. 2012. Chemotypical variation in *V. planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genet Resour Crop Evol.* **59**, 875–87.
133. Sannino, F., Sansone, C., Galasso, C., Kildgaard, S., Tedesco, P., Fani, R., ... and Larsen, T. O. 2018. *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 produces 4-hydroxybenzoic acid that induces pyroptosis in human A459 lung adenocarcinoma cells. *Scientific reports.* 8, 1190.
134. Seo WT, Lim WJ, Kim EJ, *et al.* 2010. Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. *J Appl Biol Chem.* 53, 493–503.
135. Shin, B., Park, C., Imlay, J. A., and Park, W. 2018. 4-Hydroxybenzaldehyde sensitizes *Acinetobacter baumannii* to amphenicols. *Applied microbiology and biotechnology.* 102, 2323-2335.
136. Silva, A. P., Gunata, Z., Lepoutre, J. P., and Odoux, E. 2011. New insight on the genesis and fate of odor-active compounds in vanilla beans (*V. planifolia* G. Jackson) during traditional curing. *Food research international*, 44(9), 2930-2937.
137. Singh, Maya Prakash, and Michael Greenstein. 2006. "A Simple, Rapid, Sensitive Method Detecting Homoserine Lactone (HSL) -Related Compounds in Microbial Extracts." 65: 32–37.
138. Slepecky, R. A., and Hemphill, H. E. 2006. The genus *Bacillus*—nonmedical. *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 530-562.
139. Soares, M. M. C. N., Da Silva, R., Carmona, E. C., and Gomes, E. (2001). Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 79-82.
140. Sohail M and Latif Z. 2016. Phylogenetic analysis of polygalacturonase-producing *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from plant waste material. *Jundishapur journal of microbiology.* 9, 1-6.
141. Steindler, L., and Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1-9.
142. Stolp, Heinz and Gadkari, Dilip. 1981. Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. In *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 719-741.
143. Swearingen *et al.*, 2013. Swearingen, M. C., Sabag-Daigle, A., and Ahmer, B. M. 2013. Are there acyl-homoserine lactones within mammalian intestines?. *Journal of bacteriology*, 195(2), 173-179.
144. Thite, V. S., and Nerurkar, A. S. 2018. Physicochemical characterization of pectinase activity from *Bacillus* spp. and their accessory role in synergism with crude xylanase and commercial cellulase in enzyme cocktail mediated saccharification of agrowaste biomass. *Journal of applied microbiology*, 124(5), 1147-1163.
145. Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Haghkhah, M., and Bossier, P. 2018. Identification of N-acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of applied microbiology*, 125(2), 356-369.
146. Tripathi P, Kapoor M. 2018. Phytase from *Citrobacter koseri* PM-7: Enhanced production using statistical method and application in ameliorating mineral bioaccessibility and protein digestibility of high-phytate food. *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* 48, 84-91.

147. Tropel, D., and Van Der Meer, J. R. 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(3), 474-500.
148. Trovato, A., Seno, F., Zanardo, M., Alberghini, S., Tondello, A., and Squartini, A. 2014. Quorum vs. diffusion sensing: a quantitative analysis of the relevance of absorbing or reflecting boundaries. *FEMS microbiology letters*, 352(2), 198-203.
149. Ueda, A., and Wood, T. K. 2009. Connecting *Quorum Sensing*, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS pathogens*, 5(6), e1000483.
150. Ulrich, L. E., Koonin, E. V., and Zhulin, I. B. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in microbiology*, 13(2), 52-56.
151. Vyrides, I., Agathangelou, M., Dimitriou, R., Souroullas, K., Salamex, A., Ioannou, A., and Koutinas, M. 2015. Novel *Halomonas* sp. B15 isolated from Larnaca Salt Lake in Cyprus that generates vanillin and vanillic acid from ferulic acid. *World journal of microbiology and biotechnology*. 31, 1291-1296.
152. Wagner, Victoria E *et al.* 2003. "Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment." *Journal of bacteriology*. 185(7): 2080-95. <http://jb.asm.org/content/185/7/2080.full.pdf>.
153. Wevers, E., Moons, P., Van Houdt, R., Lurquin, I., Aertsen, A., and Michiels, C. W. 2009. *Quorum Sensing* and butanediol fermentation affect colonization and spoilage of carrot slices by *Serratia plymuthica*. *International journal of food microbiology*, 134(1-2), 63-69.
154. Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., ... and Bycroft, B. W. 2000. *Quorum Sensing* and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1397), 667-680.
155. Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., and Camara, M. 2007. Look who's talking: communication and *Quorum Sensing* in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1119-1134.
156. Williams, S. C., Patterson, E. K., Carty, N. L., Griswold, J. A., Hamood, A. N., and Rumbaugh, K. P. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *Journal of bacteriology*, 186(8), 2281-2287.
157. Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., C'amara, M., and Williams, P. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by *Quorum Sensing* and by RpoS. *J. Bacteriol.* 182, 6401-6411.
158. Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., ... and Williams, P. 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 70(10), 5635-5646.
159. Yemiş GP, Pagotto F, Bach S and Delaquis P. 2011. Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *J Food Prot.* 74, 2062-69.
160. Yeon, K. M., Cheong, W. S., Oh, H. S., Lee, W. N., Hwang, B. K., Lee, C. H., ... and Lewandowski, Z. 2008. *Quorum Sensing*: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environmental science and technology*, 43(2), 380-385.
161. Yunos, N., Tan, W. S., Koh, C. L., Sam, C. K., Mohamad, N., Tan, P. W., ... and Chan, K. G. 2014. *Pseudomonas cremoricolorata* strain ND07 produces N-acyl homoserine lactones as *Quorum Sensing* molecules. *Sensors*, 14(7), 11595-11604.
162. Zamzuri NA, Abd-Aziz S, Rahim RA, *et al.* 2014 A rapid colorimetric evaluation method for vanillic acid and vanillin-producing bacterial strains. *J Appl Microbiol.* 116, 903-10.
163. Zhu, J., Beaver, J. W., Moré, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. 1998. Analogs of the autoinducer 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 180(20), 5398-5405.

ANEXO

ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

1. PRESENTACIONES DE TRABAJOS EN CONGRESOS

-Participación en el 2° Simposio de Biotecnología 2017 con el trabajo titulado: “Evaluación de la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina en bacterias Gram negativas aisladas en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*)”. Tercer lugar en el concurso de carteles. Celebrado el 23 de junio del 2017. Puebla.

-Participación en el 6° Simposium Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica aplicada con el trabajo titulado: “Enzimas pectinasa y feruloil esterasa producidas por cepas de *Bacillus* aisladas de vainas de *Vanilla planifolia* sometidas a un sistema de beneficiado tradicional”. Primer lugar en el concurso de carteles en el área de alimentos. Celebrado del 11-13 de septiembre del 2017. Tlaxcala.

-Publicación del artículo titulado: “Enzimas pectinasa y feruloil esterasa producidas por cepas de *Bacillus*, aisladas de vainas de *Vanilla planifolia* sometidas a un sistema de beneficiado tradicional”. Revista CiByT, año 12, número 35, pag: 37-42 ISSN: 1870-056X.

-Participación en el V congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias con el trabajo titulado: “Characterization and production of Acyl Homoserine Lactones (AHLs) produced by *P. aeruginosa* isolated from cured vanilla beans”. 1-5 oct 2017. Puebla.

-Participación en el. 11° encuentro Nacional de biotecnología, 2nd biotechnology Word symposium. Vanillic acid (VA) production by Gram-negative bacteria isolated from vanilla (*Vanilla planifolia* ex. Andrews) beans. Celebrado del 16-20 de octubre del 2018. San José del Cabo. B.C. S, México.

2. CURSOS

-Asistencia al curso taller “Diseño de fármacos asistido por computadoras” impartido del 18-22 de mayo 2015. BUAP-Facultad de Ciencias Químicas. Puebla.

-Asistencia al curso taller “Citometría de flujo, aplicaciones básicas” Realizado durante los cursos precongreso

XXII Congreso nacional de inmunología. Celebrado del 17-18 de abril del 2016. Impartido en la unidad de investigación biomédica del IMSS, Zacatecas.

-Asistencia al curso teórico-práctico de “Análisis de miRNAs mediante Microarreglos”. Agosto 2016. Impartido en la unidad de investigación biomédica del IMSS, Zacatecas.

-Asistencia al seminario de “Cromatografía de gases acoplado a masas portátil y su aplicación en las diferentes áreas de la química”. Impartido el 17 de marzo del 2017. COLPOS, Campus Puebla.

-Asistencia al curso teórico-práctico “Introducción al modelaje molecular *in silico* de proteínas”. Llevado a cabo del 20-23 de marzo del 2018. Querétaro.

-Participación en el sexto taller de redacción bilingüe de textos Científicos. VIEP-BUAP. Celebrado del 16 de febrero al 18 de mayo del 2018. Puebla.

3. PUBLICACIONES

-Enzimas pectinasa y feruloil esterasa producidas por cepas de *Bacillus*, aisladas de vainas de *Vanilla planifolia* sometidas a un sistema de beneficiado tradicional”. Revista CiByT, año 12, número 35: pag: 37-42 ISSN: 1870-056X.

-Escobar Muciño, Esmeralda; Luna-Guevara, María Lorena; Ramos-Cassellis, María Elena; Amador-Espejo, Genaro; Castañeda Lucio, Miguel; Arenas Hernandez, Margarita. AÑO. Evaluation of process involved in the production of aromatic compounds in Gram-negative bacteria isolated from vanilla (*Vanilla planifolia* ex. Andrews) beans. Journal Applied of Microbiology. Aceptado 28 nov 2019. eISSN:1365-2672

ENZIMAS PECTINASA Y FERULOIL ESTERASA PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Bacillus*, AISLADAS DE VAINAS DE *Vanilla planifolia* SOMETIDAS A UN SISTEMA DE BENEFICIADO TRADICIONAL

PECTINASE AND FERULOIL STERASE ENZYMES PRODUCED BY *Bacillus* strains, ISOLATED FROM *Vanilla planifolia* PODS IN TRADITIONAL CURING SYSTEM

Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández^a, Esmeralda Escobar Muciño^a, Ma. Elena Ramos Cassellis^b, Ma. Lorena Luna Guevara^b

^a Centro de Investigaciones Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México

^b Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México
maria.luna@correo.buap.mx

Recibido el 22 de abril del 2017. Aceptado el 28 de julio del 2017.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad pectinolítica y feruloil esterasa de cepas de *Bacillus* aisladas durante las diferentes etapas del beneficiado de la vainilla. De un total de 60 aislados, 43 correspondieron a cepas de *Bacillus* por su crecimiento en medio selectivo MYP de las cuales por morfología colonial, 15 fueron *B. cereus* y 28 *B. subtilis*. Para evaluar las actividades enzimáticas las proteínas de los cultivos bacterianos fueron extraídas por precipitación con metanol y se colocó una gota de extracto proteico en placas de agar medio mínimo suplementadas con pectina (MM-P) y ácido ferúlico (MM-AF). Las placas se incubaron a 37 y 50°C durante 24h midiendo cualitativamente la utilización de pectina y la bioconversión de ácido ferúlico. Se encontraron 21 cepas positivas a la actividad pectinolítica (1 de *B. cereus* y 20 de *B. subtilis*) y 13 cepas con actividad feruloil esterasa (1 de *B. cereus* y 12 de *B. subtilis*). Se concluye que *B. subtilis* contribuyó mayoritariamente en la liberación de los precursores de vainilla y la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina durante las etapas del marchitamiento y almacenado de las vainas de vainilla.

Palabras clave: *Bacillus*, beneficiado, actividad pectinolítica, actividad feruloil esterasa, vainillina.

Abstract

The aim of this work was to determine the pectinolytic activity and feruloil stearase of *Bacillus* strains isolated during the different stages of the curing vanilla. Of a total of 60 isolates, 43 were *Bacillus* strains due to their growth in MYP selective medium, 15 were *B. cereus* and 28 *B. subtilis* by colonial morphology. To evaluate the enzymatic activities the proteins of the bacterial cultures were extracted by precipitation with methanol and a drop of protein extract was placed in minimal medium agar plates supplemented with pectin (MM-P) and ferulic acid (MM-AF). The plates were incubated at 37 and 50 °C during 24 hours and were qualitatively evaluated pectin utilization and ferulic acid bioconversion. 21 pectinolytic positive strains (1 of *B. cereus* and 20 of *B. subtilis*) and 13 strains with feruloil esterase activity (1 of *B. cereus* and 12 of *B. subtilis*) were found. It is concluded that *B. subtilis* contributed mainly in the liberation of the vanilla precursors and the bioconversion of ferulic acid to vanillin during the stages of the wilting to the storage of the vanilla pods.

Keywords: *Bacillus*, benefited, pectinolytic activity, feruloil stearase activity, vanillin.

1. Introducción

La vainilla natural es el segundo saborizante de mayor valor en la industria de los alimentos y se deriva a partir

de los frutos de la orquídea *Vanilla planifolia*. Las vainas de vainilla verde no tienen características de aroma. El desarrollo del aroma y sabor se da durante el procesamiento post-cosecha de las vainas curadas.

México y algunos países como Madagascar e Indonesia son productores de vainilla natural. El proceso del curado difiere en cada país, el que se sigue considerando tradicional consta de varias etapas; i) La selección y despezonado, ii) El marchitamiento, iii) El curado al sol y sudados sucesivos, iv) La clasificación de las vainas, v) El acondicionamiento o almacenamiento y vi) La clasificación de las vainas de vainilla en función del tamaño, color, flexibilidad y aroma (Röling *et al.*, 2001; Havkin-Frenkel y Belanger, 2010). Entre los precursores de la vainillina se encuentra el ácido ferúlico, que es un producto aromático abundante en la pared celular vegetal. Se ha reportado que, a partir de los desechos agronómicos, se puede producir vainillina natural a través de la conversión microbiana y su proceso de producción es de bajo costo en comparación con el proceso biosintético (Chen *et al.*, 2016).

Existen estudios donde se han aislado diferentes microorganismos a partir de las vainas de vainilla bajo un sistema de beneficiado en Indonesia, los aislados fueron obtenidos a partir de la primera y última etapa del beneficiado de la vainilla. Entre esos aislamientos se encontró a *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. smithii*) como uno de los principales microorganismos aislado de vainas verdes y con actividad enzimática hidrolítica sobre la pared celular vegetal, sugiriendo que la capacidad enzimática bacteriana contribuye en la producción del compuesto fenólico vainillina, mediante la liberación de sus precursores (Röling *et al.*, 2001). La capacidad de *Bacillus* de producir un efecto benéfico en las vainas de vainilla se debe a la producción de lipopéptidos, cuyo papel es facilitar la colonización (Zhao *et al.*, 2015). Además de la contribución al proceso del beneficiado de las vainas de vainilla se reporta que *Bacillus* puede contribuir con el aumento en la producción de componentes volátiles que no agregan atributos sensoriales desagradables en vainas de vainilla (Chen *et al.*, 2015).

Se ha reportado recientemente que las cepas bacterianas como *Bacillus* que son tolerantes a la vainillina, tienen la habilidad de convertir ácido ferúlico y producir grandes cantidades de vainillina (Graf *et al.*, 2016). Esta característica es prueba de un proceso de adaptación de los microorganismos, ya que altas concentraciones de vainilla son tóxicas por la alta reactividad de los grupos aldehídos en los grupos aromáticos. Las células bacterianas han desarrollado mecanismos de desintoxicación permitiendo la rápida degradación del ácido vanílico, otros productos de degradación y finalmente obtener productos de biotransformación (Graf *et al.*, 2016) o degradar la vainillina mediante la ruta de degradación de compuestos aromáticos hasta producir Acetil Coenzima A, que a su vez puede ser utilizada por el ciclo de Krebs (Ito *et al.*, 2006). También, se ha evidenciado una conversión

bacteriana directa de ácido ferúlico a la vainillina (Graf *et al.*, 2016) y se sugiere que la liberación de ácido ferúlico por acción de las enzimas feruloil esterasa bacterianas contribuyen con la inducción de las enzimas pectinolíticas (Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2011).

En México la región Totonaca del norte de Veracruz y Puebla es productora de vainilla natural bajo un sistema de beneficiado tradicional que se resume en 4 etapas, cuyo objetivo es el cambio de los frutos de verde a achocolatado y como resultado se registra un aumento en la concentración de vainillina (20,000 ppm) (Havkin-Frenkel y Belanger, 2010).

El proceso de obtención de la vainilla es toda una labor artesanal que lleva alrededor de 6 meses, exponiendo las vainas de vainilla al sol (beneficiado). Durante dicho proceso se han hecho aislamientos para conocer los microorganismos más frecuentes que predominan en las vainas de vainilla durante todas las etapas del proceso del beneficiado, encontrado algunas especies de enterobacterias (Luna-Guevara *et al.*, 2016). Hasta el momento, se desconoce el comportamiento de *Bacillus* bajo un sistema de beneficiado de vainilla en México.

Además, se ha reportado que *Bacillus* produce altas concentraciones de pectinasas (20-25 g/L) (Torimiro y Okonji, 2013) en comparación con otros modelos bacterianos y hay pocos estudios sobre bioconversión de ácido ferúlico a vainillina (Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2011). Se ha sugerido que *Bacillus* puede participar en los primeros pasos de la liberación de los precursores de la vainillina (Rolling *et al.*, 2001) razón por la cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar la asociación de la producción de enzimas pectinolíticas y feruloil esterasa en las poblaciones de *Bacillus* aisladas a partir de las diferentes etapas del beneficiado de *Vanilla planifolia*. Lo anterior debido a que este es el primer reporte de la presencia de actividad pectinolítica y feruloil esterasa en *B. subtilis* y *B. cereus* bajo un sistema de beneficiado de vainilla en México.

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus* sp. a partir de la superficie de frutos de vainilla

Fueron colectados 60 aislados a partir de vainas de *Vanilla planifolia* en 4 diferentes etapas de beneficiado (recepción, marchitamiento, sudado y almacenado) provenientes de las regiones Pantepec, Papanla, Ayotoxco y Primera de Mayo pertenecientes a los estados de Puebla y Veracruz. Para el aislamiento se siguió la metodología propuesta por Suhandono y Utari, 2014. El género *Bacillus* sp. fue identificado por su crecimiento en medio selectivo y diferencial MYP (Manitol-Yema de huevo y Polimixina). La identificación de las especies de

B. cereus y *B. subtilis* se llevó a cabo por identificación de la morfología colonial en medio MYP.

2.2 Preparación de MM-P al 0.5 % de pectina como fuente de carbono

Las placas de agar medio mínimo suplementado con 0.5% de pectina (MM-P) se prepararon de acuerdo a lo propuesto por Morton y Fuqua, (2012).

2.3 Preparación de MM-AF al 0.01% de ácido ferúlico como fuente de carbono

Las placas de agar medio mínimo suplementado con 0.01% de ácido ferúlico (MM-AF) se prepararon de acuerdo a Zamzuri *et al.*, 2014.

2.4 Preparación y aplicación del extracto enzimático para la determinación de la actividad pectinolítica por técnica de goteo

Se preparó un pre-cultivo con 10µl de cada cepa de *Bacillus* (almacenadas en un criobanco), en 3 mL de TSB y se incubaron a 37°C por 14-16 h. Se estrieron 10µL del pre-cultivo en medio sólido MYP y se incubó a 37°C, 14-16 h. Se realizó un cultivo en 3 mL de TSB inoculando 3 colonias aisladas crecidas en MYP y se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 12,000 rpm, 4°C durante 10 min. Se mezcló el sobrenadante con metanol en una relación 1:2 v/v, se precipitó a 4°C, 24 h. Se obtuvieron las proteínas totales por centrifugación a 12,000 rpm 4°C, 10 min. El paquete proteico, se resuspendió en 30µl de Tris-HCl (50 mM).

De la solución proteica obtenida se depositó una gota de 30µL de cada cepa, sobre la superficie de las placas de agar MM-P y MM-AF: Se dejó secar la gota y se incubaron las cajas de MM-P (37°C) y MM-AF (37°C y 50°C) por 24 h.

3. Análisis de resultados

Para determinar la actividad enzimática pectinolítica se revelaron las placas de MM-P con una solución de Rojo Congo (0.8g/100mL). Posteriormente se destiñeron las placas con 20 mL de solución salina (1 a 5 M) por un lapso de 3 días. La formación de halos claros alrededor de la gota en MM-P es indicativo de actividad positiva pectinolítica.

La actividad feruloil esterasa se puso de manifiesto por un cambio en la coloración del MM-AF de azul a amarillo debido al vire del indicador de pH contenido en el medio, lo cual indica fermentación del ácido ferúlico de con acuerdo Zamzuri *et al.*, 2014.

Para ambas pruebas se registraron las actividades enzimáticas por cada cepa de estudio.

4. Resultados y discusión

4.1 Aislamientos

De los 60 aislados de las diferentes etapas y regiones del muestreo del proceso del beneficiado de la vainilla, se obtuvieron 43 cepas de *Bacillus sp.* que crecieron en MYP. Además, se observaron 2 morfologías, cuyas características permitieron distinguir las especies: *Bacillus cereus* (colonia rosa) y *Bacillus subtilis* (colonia amarilla). Las cepas cuyas colonias no presentaron ninguna coloración en medio MYP fueron descartadas.

Se encontró que los aislamientos de *B. cereus* y *B. subtilis* predominaron durante todas las etapas del beneficiado. Se obtuvo que durante la etapa de recepción el 78% de los aislados correspondieron a *Bacillus sp.*, en la de marchitamiento el 90% de los aislados fueron *Bacillus sp.*, en las etapas de sudado y almacenamiento fue aislado en un 100 y 95%, respectivamente. De los 43 aislados del género *Bacillus*, 15 fueron identificados como *B. cereus* (25%) y 28 *B. subtilis* (46%). Los resultados obtenidos son de interés ya que indican que *B. subtilis* es una de las especies predominantes en todas las etapas de beneficiado de vainas de *Vanilla planifolia*. Röling *et al.*, 2001 reportó que las diferencias en la abundancia de los microorganismos, comunidades y características de las cepas tienen un efecto en la producción e incluso en las variaciones del olor de la vainilla.

4.2 Actividad pectinolítica en aislados MYP obtenidos en las etapas del beneficiado de la vainilla

Los resultados obtenidos para el escrutinio de actividad pectinolítica de *Bacillus* por método de goteo se observan en la figura 1. Se encontraron 21 cepas de *Bacillus sp.* positivas a la actividad pectinolítica (1 de *B. cereus*: y 20 de *B. subtilis*). La capacidad pectinolítica de *Bacillus sp.* es válida ya que se ha reportado que *Bacillus sp.* tiene la habilidad de producir 6 enzimas pectinolíticas que se encargan de la degradación de la pared celular vegetal (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014).

En el presente estudio se evaluó la actividad pectinolítica de 15 cepas de *B. cereus* y 28 cepas *B. subtilis* a 2 temperaturas y se encontró que n=8 cepas presentaron actividad pectinolítica a 50°C con respecto a n= 6 cepas que presentaron actividad pectinolítica a 37°C. Cabe mencionar que sólo una cepa de *B. subtilis*, presentó actividad pectinolítica con ambas temperaturas misma que fue aislada en la etapa de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde reportan que la temperatura óptima para actividad pectinolítica de algunas enzimas es de 50°C (Soares *et al.*, 1999). Considerando las etapas del beneficiado de la vainilla (recepción, marchitamiento, sudado y almacenado) es en la etapa del sudado donde se alcanzan temperaturas

cercanas a los 55°C (Havkin-Frenkel y Belanger, 2010), lo cual sugiere que son las condiciones idóneas para la activación de enzimas pectinolíticas bacterianas y por lo tanto hay un papel en la bioconversión de la vainillina. Esto sugiere también una sinergia entre las condiciones del proceso y los microorganismos que están en contacto con vainas de vainilla. Chen *et al.*, 2016 reportan que la relación entre las reacciones enzimáticas de las plantas y la actividad microbiana son muy importantes en la generación del aroma de la vainilla.

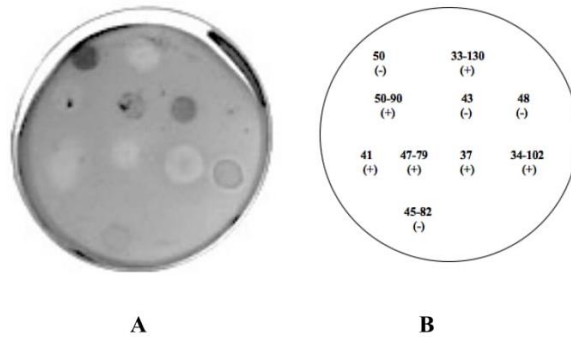


Figura 1. Resultados de la actividad pectinolítica en placa por método de goteo a partir de aislados de *Bacillus* sp. obtenidos de las diferentes etapas del proceso de beneficiado de la vainillina. A. Las cepas con actividad pectinolítica poseen un halo claro en el sitio de inoculación de la gota del extracto proteico. Panel B.

Posición de los extractos proteicos por cepa y entre paréntesis la interpretación de resultados. Códigos: 50 (*B. cereus*), 33-130 (*B. subtilis*). 50-90 *B. subtilis*, 43 (*B. subtilis*), 48 (*B. subtilis*), 41 (*B. cereus*), 47-49 (*B. cereus*), 37 (*B. cereus*), 34-102 (*B. cereus*) y 45-82 (*B. subtilis*).

4.3 Actividad feruloil esterasa en aislados MYP obtenidos a partir de las últimas etapas del beneficiado de la vainilla

Se encontraron 13 cepas con actividad feruloil esterasa (1 de *B. cereus* y 12 de *B. subtilis*). Se encontró que el 53% (n=7) cepas de *Bacillus* presentan la actividad feruloil esterasa a 37°C y que el 40% (n=5) de las cepas de *Bacillus* presentaron actividad a 50°C mientras que el 7% (n=1) presentó actividad a 37 y 50°C. En la Figura 2 se pueden observar los resultados de la determinación de actividad feruloil esterasa para algunas cepas de *Bacillus*.

El proceso de bioconversión de ácido ferúlico a vainillina se evaluó con un tiempo de incubación de 24 h, lo cual es consistente con el reporte de Chen *et al.*, 2015, quienes reportan que la glucovainillina puede ser

metabolizada como un recurso o fuente de carbono en un cultivo de incubación de 24 h (Chen *et al.*, 2015), otros reportes mencionan que se requiere de 2 h de incubación (Graf *et al.*, 2016). Ambos tiempos de incubación de la prueba de bioconversión fueron probados en este estudio (datos no mostrados), pero debido a que en 2 h no todas las cepas tenían la capacidad de bioconvertir el ácido ferúlico a vainillina, procedimos a realizar la evaluación a las 24 h de incubación, lo cual permitió observar halos amarillos más intensos en la prueba en placa de MM-AF. Lo anterior indica que *Bacillus* puede formar diferentes productos metabólicos y que requieren de cierto tiempo de incubación para ser producidos. Además, se sabe que la actividad de biconversión a vainilla se favorece después de la actividad pectinolítica (Hassan y Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2011).

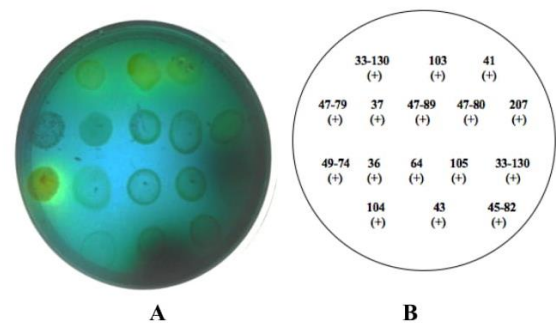


Figura 2. Resultados de la actividad feruloil esterasa en placa por método de goteo a partir de aislados de *Bacillus* sp. obtenidos de las diferentes etapas del proceso de beneficiado de la vainillina. Panel A. Las cepas con actividad feruloil esterasa viran el color del medio de azul a amarillo en el sitio de inoculación de la gota del extracto proteico. Panel B. Posición de los extractos proteicos por cepa y entre paréntesis la interpretación de resultados. Códigos: 33-130 (*B. subtilis*), 103 (*B. subtilis*), 41 (*B. cereus*), 47-89 (*B. cereus*), 37 (*B. cereus*), 47-89 (*B. cereus*), 47-80 (*B. subtilis*), 207 (*B. subtilis*), 47-74 (*B. cereus*), 36 (*B. cereus*), 64 (*B. cereus*), 105 (*B. subtilis*), 33-130 (*B. subtilis*), 104 (*B. subtilis*), 43 (*B. subtilis*) y 51-90 (*B. cereus*).

Los resultados de este estudio muestran que *Bacillus* sp es capaz de presentar ambas actividades enzimáticas (pectinolítica y feruloil esterasa) durante las etapas del beneficiado de la vainilla. De acuerdo con Khoyratty *et al.*, (2017) hay una correlación entre el aroma de la vainilla y los microorganismos como *B. subtilis* que puede convertir la glucovainillina a vainillina. De la correlación enzimática se comprende que, durante el proceso del beneficiado, los aislados de *Bacillus* sp. se encuentran participando en la ruptura de la pared vegetal por hidrólisis enzimática por acción de enzimas

pectinolíticas y se genera la liberación de precursores de la vainillina, que pueden ser utilizados posteriormente en otra vía metabólica para generar otros subproductos como la vainillina, como ya se ha sugerido en otros modelos bacterianos (Ito *et al.*, 2006). Por otro lado, se percibió que las placas de bioconversión de ácido ferúlico presentaban diferentes aromas, lo cual es un indicativo de la producción de compuestos aromáticos por *Bacillus* sp. bajo condiciones *in vitro*, lo anterior se confirma con el estudio reciente de Gu *et al.*, 2015, que describe el comportamiento de *Bacillus* sp y los atributos sensoriales en vainas de vainilla inoculadas con *Bacillus*.

5. Conclusiones

En el presente estudio se encontró que uno de los microorganismos predominantes en las vainas de *Vanilla planifolia* durante todas las etapas del beneficiado es *Bacillus* sp., siendo la especie *B. subtilis* la que fue aislada con mayor frecuencia. Además, permitió evaluar la actividad enzimática pectinolítica y feruloil esterasa de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de vainas de *Vanilla planifolia* por el método de goteo. Se comprobó la contribución de las enzimas pectinolíticas y feruloil esterasa de *B. subtilis* en la etapa 3 y 4 del proceso de beneficiado de la vainilla. Este es el primer reporte en México del papel de *Bacillus* sp. en el aporte *in vitro* al contenido de vainillina durante el proceso del beneficiado de la vainilla en México.

Referencias

- Chen, P., Yan, L., Wu, Z., Li, S., Bai, Z., Yan, X., & Li, H. A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid. *Scientific reports*, 6, (2016), 20400.
- Chen, Y., Gu, F., Li, J., He, S., Xu, F., & Fang, Y. Involvement of colonizing *Bacillus* isolates in glucovanillin hydrolysis during the curing of *Vanilla planifolia* Andrews. *Applied and environmental microbiology*, 81(15), (2015), 4947-4954.
- Graf, N., Wenzel, M., & Altenbuchner, J. Identification and characterization of the vanillin dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), (2016), 3511.
- Gu, F., Chen, Y., Fang, Y., Wu, G., & Tan, L. Contribution of *Bacillus* Isolates to the Flavor Profiles of Vanilla Beans Assessed through Aroma Analysis and Chemometrics. *Molecules*, 20(10), (2015), 18422-18436.
- Hassan, S., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Identification of two feruloyl esterases in *Dickeya dadantii* 3937 and induction of the major feruloyl esterase and of pectate lyases by ferulic acid. *Journal of bacteriology*, 193(4), (2011), 963-970.
- Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. C. Handbook of vanilla science and technology. John Wiley & Sons. (2010).
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., & Shevchik, V. E. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental microbiology reports*, 6(5), (2014), 427-440.
- Ito, N., Itakura, M., Eda, S., Saeki, K., Oomori, H., Yokoyama, T., & Uchiumi, T. Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. *Microbes and Environments*, 21(4), (2006), 240-250.
- Khoyratty, S., Choi, Y. H., Dupont, J., Verpoorte, R., & Kodja, H. Host and Guest: Vanilla Inhabited by Endophytes. *Fungal Metabolites*, (2017), 191-217.
- Luna-Guevara, J. J., Ruiz-Espinosa, H., Luna-Guevara, M. L., Herrera-Cabrera, E. B., Delgado-Alvarado, A., & Navarro-Ocaña, A. Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. *Agroproductividad*, (2016), 9(1).
- Morton, E. R., & Fuqua, C. Laboratory maintenance of *Agrobacterium*. *Current protocols in microbiology*, (2012), 1D-1.
- Röling, W. F., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., & Van Verseveld, H. W. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), (2001), 1995-2003.
- Soares, M. M., Silva, R. D., & Gomes, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30(4), (1999), 299-303.
- Suhandono, S., & Utari, I. B. Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria from Durian Arillus (*Durio zibethinus* Murr.) var. Matahari. *Microbiology Indonesia*, (2014), 8(4), 3.
- Torimiro, N., & Okonji, R. E. A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 12(46), (2013), 6498-6503.
- Zamzuri, N. A., Abd-Aziz, S., Rahim, R. A., Phang, L. Y., Alitheen, N. B., & Maeda, T. A rapid colorimetric screening method for vanillic acid and vanillin-producing bacterial strains. *Journal of applied microbiology*, 116(4), (2014), 903-910.

DR. MARGARITA M.P. ARENAS HERNANDEZ (Orcid ID : 0000-0002-1483-0510)

Article type : Original Article

Evaluation of process involved in the production of aromatic compounds in Gram-negative bacteria isolated from vanilla (*Vanilla planifolia* ex. Andrews) beans.

Autors: Esmeralda Escobar-Muciño^a, *Ma. Lorena Luna-Guevaras^b, María Elena Ramos-Cassellis^b, Genaro G. Amador-Espejoc, Miguel Castañeda-Lucio^a, *Margarita M. P. Arenas-Hernández^a

Affiliations: ^a Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México. ^b Colegio de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México. ^c Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México.

Abbreviated running headline: Bacteria related to aromatic compounds in vanilla

Name, address, e-mail address and telephone number of the corresponding authors: Margarita M. P. Arenas-Hernández. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria. Colonia San Manuel CP, 72570, Puebla, Pue., Mexico. margarita.arenas@correo.buap.mx. +52 222 2295500 ext 2524.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/JAM.14537](https://doi.org/10.1111/JAM.14537)

This article is protected by copyright. All rights reserved

Ma. Lorena Luna-Guevara. Colegio de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio FIQ7, Ciudad Universitaria. Colonia San Manuel CP, 72570, Puebla, Pue., Mexico. maria.luna@correo.buap.mx. +52 222 2295500 ext 7252.

Abstract

Aim: The present investigation was aimed at isolating and identifying bacterial strains from cured vanilla beans. Additionally, the study focused on evaluating bacterial processes pertaining to the aromatic compounds production (ACP).

Methods and Results: Three bacteria were isolated from *Vanilla planifolia* beans, previously subjected to the curing process. According to morphological, biochemical and 16S rRNA analysis, the strains were identified as *Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp, and *Pseudomonas* sp. The polygalacturonase activity (PGA) was determined using the drop, cup plate and DNS methods. Aromatic compounds production (ACP) was analyzed by cup plate method using FA as substrate and quantified by HPLC (ppm), the functional groups of vanillic acid (VA) were identified by FT-IR and the aromatic compounds (AC) resistance was determined and reported as MIC. *Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp, and *Pseudomonas* showed PGA (70.31 ± 364 , 76.07 ± 12.47 and 51 ± 10.92 U mL⁻¹ respectively), were producers of VA (3.23 ± 0.49 ppm, 324 ± 41 ppm and 265.99 ± 11.61 ppm, respectively) and were resistant to AC.

Conclusions: The Gram-negative bacteria isolated from *Vanilla planifolia* beans were responsible for ACP.

Significance and Impact of the Study: This is the first evidence for the role of Gram-negative bacterial isolates from cured Mexican *Vanilla planifolia* beans in the process related to ACP.

Keywords: Pectinolytic Activity, Bioconversion, Vanilla, Vanillic Acid, Aromatic Compounds Resistant, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp.

Introduction

Vanilla is one of the most valuable spice crops widely employed as a flavor ingredient in the food industry worldwide. This crop is obtained from the mature fruit of the orchid *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Mexico and other countries like Madagascar and Indonesia are the main producers of vanilla beans. Although Mexico has lost its position as the major vanilla exporter, it continues to be the center of origin and genetic diversity of this important orchid. The principal area of production and curing of the vanilla crop is found in the Totonacapan region situated in the northern regions of Veracruz and Puebla states in Mexico (Hernandez, 2010). The development of aroma and flavor of the green vanilla beans occurs during the post-harvest process known as “curing” (Luna-Guevara *et al.*, 2016b).

The curing of vanilla beans is a craft and traditional process that takes 3 to 5 months and consists of several stages: (i) reception, (ii) striking, (iii) first sorting, (iv) killed, (v) sweating, (vi) laying, (vii) rest, (viii) second sorting, (ix) packed (Luna-Guevara *et al.*, 2016a). During the process, the color of the vanilla beans changes from green to dark brown ‘‘chocolate’’ and there is an increase in the concentration of different aromatic compounds (AC) such as vanillin (1000–20000 ppm), p-hydroxybenzaldehyde (HBA) (2000 ppm), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid) (2000 ppm) and p-hydroxybenzoic acid (200 ppm). All these compounds are responsible for the vanilla aroma (Salazar *et al.*, 2012). The process of obtaining natural vanillin is an inexpensive method compared with the biosynthetic pathway and requires physico-chemical changes in vanilla beans and biological factors such as microbial participation (Frenkel *et al.*, 2010). Among these microorganism, *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. have been identified in the Indonesian green beans (Röling *et al.*, 2001). In Mexico, different Gram-negative bacteria were also isolated from steps of the fermentative process, including microorganisms such as *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, and *Citrobacter amalonaticus* (Luna-Guevara *et al.*, 2016a). In general, the thermal process, enzymatic plant reactions, and microbial activities contribute to flavor generation through the production of aromatic compounds such as glucovanillin and ferulic acid that are the major aroma precursors (Röling *et al.*, 2001; Zamzuri *et al.*, 2014).

The cell wall composition of the *Vanilla planifolia* beans consists of lignin, catechol, cellulose, a variety of hemicellulosic polymer, pectins, structural hydroxyproline-rich glycoproteins (extensins and arabinogalactan-proteins complex) and ester-linked to ferulic acid (FA) (Kallury *et al.*, 2014). Pectin has been found in the epicarp and it has an important function in the plant physiology, including defense, morphogenesis, and signaling (Voragen *et al.*, 2009). At the same time, it has been reported that Gram-negative bacteria that reside in the vegetable tissues produce pectinolytic enzymes (PE), which have an important role in the degradation of the plant cell wall and the consequent release of substrates such as FA. The hydrolytic enzymes most extensively studied are protopectinase, polygalacturonase, lyase, and pectinesterase (Jayani *et al.*, 2005). In this context, Gonzalez and Allen (2003) suggested a direct relationship between pectinolytic activity (PA) of *P. uginosa* and its contribution to vanillin content.

Another bacterial process implicated in aromatic compounds production (ACP) is the ability to bioconvert FA, an abundant substrate in plant cell walls and one of the precursors of vanillin (Mariod *et al.*, 2010). Feruloyl esterase enzymes are responsible for carrying out the bioconversion to AC. FA is an abundant derivative of cinnamic acid found in the vegetable kingdom (Mishra *et al.*, 2016). Both Gram-positive and Gram-negative bacteria can carry out FA metabolism by microbial decarboxylation of cinnamic acid (Li *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2014; Vyrides *et al.*, 2015). The resting cells represent a cheaper and cleaner technique for analyzing the

bioconversion of FA to AC such as VA and vanillin (Barghini *et al.*, 1998). Biotransformation of FA to VA has been widely studied in different *Pseudomonas* strains (Civolani *et al.*, 2000). On the other hand, the *Enterobacter* species can produce small amounts of VA and the production of bioproduct in *Citrobacter* genus has not been reported (Hunter *et al.*, 2012).

Finally, an important adaptation feature of microorganisms that colonize vanilla beans is their resistance to AC. Some Gram-negative bacterial species are resistant to AC similar to those contained in vanilla beans. Particularly, the bacteria can adapt to changes in AC concentration, which are synthesized in vanilla beans during the curing process (Kubo *et al.*, 1995; Merkl *et al.*, 2010). Complete sets of bacterial genes (Vg: *vdh*, *vanA/vanB*, and *pcaG/pcaH*) that are responsible of AC degradation have been identified in some Gram-negative bacteria (Ito *et al.*, 2006).

The present investigation was aimed at isolating and identifying bacterial strains from cured vanilla beans. Additionally, the study also focused on the evaluation of bacterial processes pertaining to the production of aromatic compounds (ACP).

Materials and Methods

Vegetable material

Vanilla beans (*Vanilla planifolia ex. Andrews*) were obtained from the rest steps of the curing process (second sorting and packed) and collected from various locations of the Totonacapan of Papantla, Veracruz (Mexico) (20° 27'N and 97° 19'O) during the period from November 2016 to April 2017. The samples were stored at 4°C in sterile polystyrene bags until further use.

Isolation and identification of Gram-negative bacteria

Gram-negative bacteria from vanilla beans were isolated and identified using their colonial morphology on selective media (Mac Conkey and Cetrinide agar), Gram staining, and biochemical tests (IMViC). Automated system VITEK (bioMerieux, Mexico) and 16S rRNA gene partial sequencing were used to confirm the identification of bacterial genera. Genomic DNA was extracted and used as a template for the 16S rRNA partial gene amplification using the following primers 16UN27F (5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1392R (5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3'). The amplification product was 1365 pb and PCR products were purified using a purification kit (QIAquick, Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. Sequencing of PCR products was performed in Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos, Mexico). The 16S rRNA partial gene sequences were compared

to sequences deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA partial sequence of Gram-negative bacteria was performed as described by La Torre-Ruiz *et al.*, (2016).

Evaluation of processes involved in the production of aromatic compounds (ACP).

Table 1 shows the methods, types of samples and the required parameters to evaluate the bacterial processes involved in the ACP.

Pectinolytic activity (PA)

10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland), was inoculated with 10 μ L of resuspended cryopreserved Gram-negative bacteria and incubated at 37 °C for 24 h reaching a concentration of 10³ CFU mL⁻¹. The bacterial culture was centrifuged at 19300 g for 10 min and the pellet was resuspended in 150 μ L of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.0). The supernatant was also recovered and precipitated with methanol (1:2 v/v). The methanolic extract was centrifuged at 19300 g for 10 min and the pellet was resuspended in the same Tris-HCl buffer.

For the drop plate method, a 100 μ L drop of sample (supernatant or pellet) was put in the middle of the agar petri dishes. For cup-plate method, a cup of 9 mm diameter was made using a sterile cork borer in the center of a M9 minimal medium plate supplemented with 0.5% of pectin agar (Chatterjee *et al.*, 1995). Each cup was inoculated with 150 μ L of bacterial culture (supernatant or pellet) and the plates were incubated at 37 °C for 96 h.

The pectinolytic activity was revealed by overnight Congo red dye staining and 10 mL of 5M NaCl solution was used to remove the dye until clearing zones became visible around the drop and cup in the agar petri dishes. The diameter of the clearing zone was used to determine the PA of the bacterial strain (Florenco *et al.*, 2012). In the present study, the PA for drop and cup plate methods was quantified by diameter and pectinolytic activity index according with the equation:

$$PAI = \frac{\text{Diameter of hidrolisis zone}}{\text{Diameter drop or cup}}$$

Production of polygalacturonase enzymes

Bacterial pre-cultures were prepared in 3 mL of TSB medium for each Gram-negative isolate and incubated at 37°C with shaking at 150 rpm for 16-18 h. 100 μ L of pre-culture (10²-10³ CFU mL⁻¹) was inoculated into 100 mL of TSB medium (contained in Erlenmeyer flask of 500 mL) and incubated at 37°C for 24 h with constant agitation. The culture was centrifuged at 11400 g for 10 min and the supernatant was filtered using a Millipore® Stericup™ (0.45 μ M), under sterile conditions. The supernatant was precipitated using two volumes of methanol for 12 h, then centrifuged at 11400 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the resulting

pellet was re-suspended in 1mL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH: 7.0. This concentrate was kept in the freezer (-20 °C) until further use for polygalacturonase activity quantification by DNS method.

Enzyme Activity Measurements

The polygalacturonase activity was analyzed by the spectrophotometric DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) method according to Miller (1959), using a standard curve with D-polygalacturonic acid (D-PGA) (Sigma–Aldrich Co. LLC, St Louis, Missouri, USA) (0.025-0.25 ppm). The substrate concentration for experiments of polygalacturonase activity was 0.25 ppm. The specific activity (U=1 unit of PGA) was defined as the amount of the enzyme that released 1 µmol of PGA per unit time per unit volume (Demir and Tari, 2016).

Bioconversion of ferulic acid to aromatic compounds

Plate assay

To determine FA assimilation by Gram-negative bacteria, 20 mL of bacterial culture was centrifuged at 19300 g for 10 min and the pellet was washed and resuspended in 50 mM of Tris-HCl buffer, pH 7.0. The agar was prepared with MM-VP (Medium Minimum-Vanilla Production) which contained 1.5% agar supplemented with 0.1 % FA and 2% of glucose. A cylindrical cavity was made in the medium with a sterile cork borer. The cavity was filled with 150 µL of the sample (Hunter *et al.*, 2012). The MM-VP plates were incubated at 37°C for 12-24 h and a color change was observed (from green to yellow), indicating the assimilation of FA and glucose from the medium (Zamzuri *et al.*, 2014). The diameter of the yellow zone around the cup was measured for each sample. The Bioconversion of ferulic acid Index (BAFI) was calculated according to the next equation:

$$\text{BAFI} = \frac{\text{Diameter of yellow zone}}{\text{Diameter of cup}}$$

High performance liquid chromatography (HPLC)

Microorganisms were grown in 50 mL of MM-VP supplemented with 0.1 % FA (w/v) and 2% glucose and incubated on an orbital shaker at 30°C, 180 rpm for 12 h. Samples were then prepared according to Barghini *et al.*, 1998. The supernatant was precipitated with two volumes of ethanol and filtered with a Millipore® Stericup™ (0.2 µM) and 2 mL of sample was analysed for identification and quantification of the substrate (FA) and the bioproduct (VA) by HPLC. Standards for FA and VA were obtained from Sigma–Aldrich Co. LLC, St Louis, Missouri, USA. Acetonitrile and HPLC-grade water (E. Merck, Darmstadt, Germany) were used as the mobile phase. Concentrations of standards and samples were estimated by HPLC with the chromatograph Agilent model 1200, USA using a UV index detector. HPLC standards for curves and samples obtained from Gram-negative bacteria were eluted with a gradient in acetonitrile-water (A, B). The acetonitrile and water

concentration varied as follows: 15, 20, 40, 40 and 85, 80, 60, 60 during 15 min and the flux of the samples were 0.8 mL min⁻¹.

Different dilutions were prepared from a stock solution (1000 µg mL⁻¹) and employed to produce a concentration curve of the FA and VA standards (1-50 µg mL⁻¹), all determinations were made in duplicate (R²=0.95). The injection volume of samples was 10 µL, and the mobile phase was acetonitrile/water (Barghini *et al.*, 1998). Sample separation was performed at 37°C using a Supelcosil LC-18-S column (150 mm X 4.6 mm; Supelco Inc., Bellefonte, Pa.) protected with a 1-cm guard cartridge (Phase Separations Ltd., UK). Sample detection was achieved at a wavelength of 254 nm. The peak areas and the graphic representation were produced utilizing the Origin version 8 software. The FA and VA concentrations were quantified and expressed in ppm, yield and productivity according to the following equations:

$$Y = \frac{\text{Concentration of bioproduct (mg)}}{\text{Concentration of substrate (mg)}} \quad \text{and} \quad P = \text{Concentration of substrate (mg FA L}^{-1}) \times \text{Maximum time of yield (h}^{-1})$$

Aromatic compounds determination by Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy.

The functional groups of AC were analyzed by FT-IR (Perkin Elmer Precisely, Salem Massachusetts USA) using the attenuated total reflectance (ATR) technique as sampling mode. Samples of 50 µL were placed on the ATR glass (crystal of ZnSe) of the equipment, taking as the baseline the spectrum of the ATR glass alone, which also records the absorption from the environment. The integration time used was 60 s (1 second per scan), and the resulting spectrum represented the average of all the scans. The analysis was performed in the mid infra-red region (800-4000 cm⁻¹) with a resolution of 4 cm⁻¹. Data acquisition and processing was performed with the software Spectrum 5.3.0 (Perkin-Elmer Precisely, Salem Massachusetts, USA). With the aim of identifying the functional groups, standard sample of VA (Sigma-Aldrich, Co. LLC, St Louis, Missouri, USA) was analysed. The FTIR data were recorded using Microsoft Excel and subsequently plotted using Origin 8.5 to obtain the IR spectra.

Determination of aromatic compounds resistant

Stocks of VA, vanillin, and HBA (0.2 g mL⁻¹) were used for resistance assays (Sigma-Aldrich, America). Serial dilutions of these organic compounds were made, and the concentrations obtained ranging between 6 µg mL⁻¹ to 200 mg mL⁻¹ were used for the minimum inhibitory concentration (MIC) determination. An inoculum of 5x10⁵ CFU mL⁻¹ (50 µL) in TSB was mixed with the different dilutions of each organic compound and incubated at 37°C for 18 to 24 h. MICs were determined as the lowest dilution, showing no visible growth and were defined as the concentration of AC that inhibited microbial growth of Gram-negative bacteria (Cava *et al.*, 2012).

Data analysis

The samples (pellet and supernatant), methods (drop and cup plate) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas* sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB) were considered sources of variation. The results were analyzed using a model equivalent to a balanced complete random design experiment. The comparison of means among treatments was performed using the Tukey test ($p \leq 0.05$). Statistical analyses were performed using Statistix 10 software. All reported results are averages of duplicate trials from two independent experiments.

RESULTS

Identification of Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans

All the *P. aeruginosa* isolates produced characteristic blue-green pigmented colonies on selective cetrimide medium. On MacConkey agar, the *Enterobacter* isolates produced pink-colored colonies characteristic of lactose fermenting-coliforms. The *Citrobacter* isolates produced pink or colorless colonies (after 24h) with the characteristic “fisheye” morphology (a pink center surrounded by a clear margin) (Stolp *et al.*, 1981; Grimont *et al.*, 2006; Borenshtein *et al.*, 2006). Biochemical tests and VITEK revealed that the Gram-negative bacteria isolated from the vanilla curing process belonged to the genera *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. and *Citrobacter* sp. and were then speciated with the IFVB. Furthermore, the 16S rRNA partial gene sequence analysis of each strain confirmed the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Citrobacter* with a 99, 93 and 97% similarity and 100, 100 and 98% of sequence coverage percentages, respectively.

The phylogenetic tree of 16S rRNA gene partial sequences was represented with available bacteria sequences from NCBI GenBank. Our results indicated that the common ancestors of *Pseudomonas* sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB strains presented similarity with *P. aeruginosa*, *Enterobacter* sp. strain 14 and *C. amalonaticus* SH-3 with percentages of 84, 86 and 64%, respectively (Fig. 1a, 1b, 1c).

Pectinolytic activity (PA)

Pseudomonas sp. IFVB presented the highest PA (4.3 cm diameter) by the cup plate method using pellet as sample (Fig. 2A and 2B). For the *Enterobacter* sp. IFVB strain, diameters varied from 1.7 to 2.9 cm and the *Citrobacter* sp. IFVB strain diameters varied from 1 to 4 cm using both methods (Fig. 2B). Comparing results with the two types of samples used in each method, the greatest PA diameters for the *Enterobacter* sp. IFVB strain were observed using the supernatant by the drop and cup plate methods. The maximum PA diameters for

the *Citrobacter* sp. IFVB were 2.2 and 4.0 cm with the pellet and supernatant by drop and cup plate methods respectively; confirming that the best method was the cup plate method (Fig. 2B).

Enzymatic activity was also expressed as Index of PA (PAI), where *Pseudomonas* sp. IFVB had a higher PAI with the cup plate method using the pellet (Table 2). While *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB showed highest PAI with the supernatant. The values obtained from this index increased significantly with the cup plate method compared with the drop method (Table 2).

Finally, the PA was also measured by the DNS method, the results of *Pseudomonas* sp. IFVB showed a polygalacturonic activity of 51 ± 10.92 U mL⁻¹ in 24 h of incubation while *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB had similar values (76.07 ± 12.47 U mL⁻¹ and 70.31 ± 3.64 U mL⁻¹, respectively).

Another process investigated in this research was the bioconversion of ferulic acid (BFA) by *Pseudomonas* sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB. This process is associated with the production of AC during the curing of vanilla beans. Index of BFA (BFAI) values of the bacteria presented significant differences ($p \leq 0.05$) using the cup plate method, where *Pseudomonas* sp. IFVB and *Enterobacter* sp. IFVB reached higher BFAI values (4.37 ± 0.23 and 4.38 ± 0.11) than those obtained with *Citrobacter* sp. IFVB (2.70 ± 0.32) (Fig. 3A). The BFAI has not been reported in other studies. This index could be considered as a quantitative method for comparing the capacity of AC assimilation in different microorganisms.

The production and identification of vanillic acid (VA)

Pseudomonas sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB were tested for the ability to produce AC in MM-VP using resting cells as described previously by Zamzuri *et al.*, 2014 and Barghini *et al.*, 1998. The FA and VA concentrations were quantified and expressed in ppm and the retention times for FA and VA were 2.0 min and 1.5 min, respectively (Fig. 3B). The results obtained by HPLC showed that under resting cells conditions, in the presence of FA as a precursor, *Citrobacter* sp. IFVB produced 3.23 ± 0.49 ppm of VA ($Y = 0.096$ mg VA mg⁻¹ FA and $P = 13.85$ mg FA L⁻¹ h⁻¹), for *Enterobacter* sp. IFVB was of 324 ± 41 ppm of VA ($Y = 0.97$ mg VA mg⁻¹ FA and $P = 13.87$ mg FA L⁻¹ h⁻¹) and for *Pseudomonas* sp. IFVB was of 265.99 ± 61 ppm of VA ($Y = 0.79$ mg VA mg⁻¹ FA and $P = 13.87$ mg FA L⁻¹ h⁻¹) (Fig. 3C). All Gram-negative bacteria produced VA during the exponential phase (19.11 ± 0.70 , 18.24 ± 1.41 and 15.23 ± 0.2 CFU mL⁻¹, data not shown). The results confirmed the potential of *Pseudomonas* sp. IFVB and *Enterobacter* sp. IFVB strains in resting cells experiments as major contributors to producing VA from substrate FA in comparison with *Citrobacter* sp. IFVB.

Analysis of FT-IR results confirmed the functional groups of VA in the three Gram-negative bacteria. The main absorption bands of the three Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans were compared with the

bands of the FT-IR spectrum of VA standard in the range from 4000 - 800 cm^{-1} (Fig. 3D). Peaks positioned in the mid-infrared region were dependent on the complete molecular structure. Frequency values (cm^{-1}) for the VA standard corresponded to 3537 (-OH), 2932 (-CH₃, CH stretches, asymmetric), 1672 (C=O), 1516 (C=C, aromatic ring), 1384 (-CH₃, vibrations for CH bending), 1251 (C-N, primary amide), 1089 (CO, carboxylic acid), and 868 (C=C, aromatic ring). Similar frequency values (cm^{-1}) were observed in the 3 Gram-negative bacteria: (I) *Pseudomonas* sp. IFVB (3359, 2984, 1650, 1384, 1052 and 883), (II) *Enterobacter* sp. IFVB (3352, 2976, 1657, 1384, 1052 and 875) and (III) *Citrobacter* sp. IFVB (3338, 2976, 1650, 1384, 1251, 1037 and 875) (Fig. 3D). These values confirm AV production by Gram-negative bacteria.

Bacterial resistance to aromatic compounds

Aromatic compounds resistance is an important property in microorganisms isolated from cured vanilla beans that contribute to the production of AC. Gram-negative bacteria analyzed in this study were resistant to AC, the principal components of vanilla's aroma (Table 3). MIC results revealed that the three bacteria were vanillin resistant (VR), the *Pseudomonas* sp. IFVB being the most resistant (MIC, 390.62 $\mu\text{g mL}^{-1}$). While, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB showed the same resistance (195.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Moreover, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB demonstrated the highest values of vanillic acid resistance (VAR) (MICs, 781.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Table 3, letter bold). Finally, results for HBA resistance were the same for all three Gram-negative bacteria (MIC, 781.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Table 3).

DISCUSSION

In a previous report, it was observed that several Gram-negative species were isolated from different stages of the vanilla bean curing process (Luna-Guevara *et al.*, 2016a). In this study, 16S rRNA partial gene analysis showed that strains isolated from vanilla beans belong to *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. and *Citrobacter* sp. genera. According to the phylogenetic trees, *Pseudomonas* sp. IFVB revealed a common ancestor with *Pseudomonas* sp. Az 10. This last strain was isolated from soil and it has the ability to bioconvert FA into AC (Zuri *et al.*, 2014). *Enterobacter* sp. Px6-4, a reference strain isolated from the root of *Vanilla planifolia*, showed phylogenetic relationship with *Enterobacter* sp. IFVB (Li *et al.*, 2008). Some reports indicated that the *Citrobacter* genus was isolated from vanilla beans during different stages in the curing process and can assimilate the FA (Luna-Guevara *et al.*, 2016a; Ammar *et al.*, 2005). These investigations relate the Gram-negative bacteria analyzed in the present study with other strains that produce AC. According to Röling *et al.*, (2001) and Voragen *et al.*, (2009) the aroma developed in cured vanilla beans is related to some bacterial processes. The main process involved, is known as "active penetration" that includes the production and action

of plant cell wall degrading enzymes with different enzymatic activities. Together, these enzymes hydrolyze compounds that include cellulose, pectin, hemicellulase, and cell wall proteins (Mateos *et al.*, 1992). This enzymatic activity has been evaluated in Gram-negative bacteria by quantitative methods such as drop and cup plate, using two types of sample (pellet and supernatant) (Attri and Garg, 2014).

Our pectinolytic activity (PA) results obtained from Gram-negative bacteria, demonstrated that this process could be evaluated by two plate-based methods. The PA values of *Pseudomonas* sp. IFVB were 1000 times greater than the values reported with *Pseudomonas* sp. strain YRR04 isolated from young radish roots using the drop plate method (Seo *et al.*, 2010). Our results showed that *Enterobacter* and *Citrobacter* demonstrated PA by both methods. Reddy *et al.*, (2016) also confirmed the PA of *Enterobacter* genera isolated from fruits. Additionally, Seo *et al.*, (2010) studied pectinase production in *Enterobacter* sp. YRL and *C. freundii* YRL11 strains. Both microorganisms were isolated from young radish roots (*Yeulmu*, *Raphanus sativus* L.), which contain pectin in the plant cell wall. However, they could not detect PA by drop plate method.

Our results with *Pseudomonas* sp. IFVB showed that the highest values were produced in samples from the pellet relative to those in supernatants. This suggests that PA activity is related to secretable enzymes. The PA was measured by PAI to facilitate comparison between the supernatant and pellet samples obtained from Gram-negative bacteria.

Also, values of PAI from *Enterobacter* sp. IFVB were greater using the supernatant in the cup plate method, suggesting that secretable pectinolytic enzymes such as pectinesterase and the polygalacturonase family enzymes could be involved in the PA (Abbott and Boraston, 2008). On the other hand, *Citrobacter* sp. IFVB also produced an elevated PAI using the supernatant by the cup plate method; this enzymatic activity was confirmed experimentally by Okolie *et al.*, (1988).

The polygalacturonase activity was also quantified by the DNS method. By this analysis, the activity from *Pseudomonas* sp. IFVB was lower in comparison to other *Pseudomonas* species ($4.4 \pm 0.1 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) isolated from vegetable material (Sohail and Latif, 2016). While, activities from *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB were greater than reported (18.54 U mL^{-1} and 1.047 U mL^{-1} , respectively) (Darah *et al.*, 2015, Tripathi *et al.*, 2018).

Various reports suggest that some secretable enzyme families such as pectin lyase, pectin methylesterase and polygalacturonase are found in Gram-negative bacteria (Abbott and Boraston, 2008). Also, as a result of bioinformatic analyses using the UniProt database according to Pundir *et al.*, (2017) we confirmed the presence of polygalacturonic enzymes in *Pseudomonas* genus such as PglA (polygalacturonase), PehA (Glycoside hydrolase), PehB (exo-poly-galacturonase signal peptide protein), PehC (polygalacturonase transmembrane protein) and PehX (exo-poly-alpha-D-galacturonosidase) (González *et al.*, 2003). Furthermore,

were found some sequences related to polygalacturonase enzymes such as polygalacturonase (PglA), endopolygalacturonase (PehX), and glycoside hydrolase family 28 (AdhA) in the *Enterobacter* and *Citrobacter* genus.

Our DNS results further indicate that the three Gram-negative bacteria could degrade PGA (main component in the plant cell wall) contributing to the polysaccharide structure fragmentation. This process causes the release of glucovanillin and some glucosylated phenolic compounds trapped in the vegetable cell wall matrix, so they can be accessible to their respective hydrolytic enzymes during the curing of vanilla beans (Havkin-Frenkel *et al.*, 2010).

In summary, our PA analysis suggests the action of pectinolytic enzymes from three Gram-negative bacteria may be related to the release of AC precursors from *Vanilla planifolia* beans.

It has been reported that some AC precursors, such as lignin, FA, guaiacol, catechol, among others, are released and converted into AC such as VA, vanillic alcohol, HBA, PHB and vanillin, (Harazono *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2006; Zamzuri *et al.*, 2014). Specifically, the FA has also been proposed as a precursor in the biosynthesis of vanillin and vanillin glucoside, both considered the most abundant aromatic compounds in nature vanilla beans (Hernández, 2010; Salazar *et al.*, 2012). Additionally, Ammar *et al.*, (2005) demonstrated the assimilation capacity of different AC as FA by some Gram-negative bacteria. The contribution to vanillin content by *Pseudomonas* genus is the most studied example. This genus has the capacity to produce high concentrations of vanillin (300 µg mL⁻¹). However, the *Enterobacter* genus isolated from the roots of *Vanilla planifolia* can also degrade and bioconvert FA to vanillin (18 µg mL⁻¹) (Zamzuri *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2008). Other studies confirmed that *Citrobacter* was the most efficient strain at metabolizing FA relative to other Gram-negative bacteria (Ammar *et al.*, 2005). Dias *et al.*, (2015) found that *Citrobacter* participates in the curing process of other vegetables such as coffee, which is similar to vanilla curing. Other studies suggested that the degradation of FA in different bacterial genera is dependent of the assimilation ability and bioconversion of this compound to AC. An example is the *Pseudomonas* sp. Az10 soil isolate which assimilates FA during the exponential phase of growth (12 h). This activity was determined through the drop plate test (Zamzuri *et al.*, 2014). On the other hand, *Enterobacter* sp. Px6-4, a reference strain, isolated from *Vanilla planifolia* roots produced decarboxylase activity (0.5 U mL⁻¹) and was capable of degrading FA at maximum growth (15 h) (Li *et al.*, 2008). For the *Citrobacter* genus assimilation and bioconversion of FA to AC such as VA has not been confirmed.

Some Gram-negative and Gram-positive bacteria can catalyze FA bioconversion to intermediate compounds such as vanillic alcohol, VA, and vanillin (Vyrides *et al.*, 2015, Graf *et al.*, 2016, Mishra *et al.*, 2016, Paz *et al.*, 2016). The AC produced from FA have been studied in different strains of *Pseudomonas* sp. by the resting

cells method. For example, *P. resinovorans* SPR1 was found to produce 1100 ppm (1.1 g L⁻¹) of VA (molar yield of 44%) after 60 h of monitoring (Ashengroph *et al.*, 2011). Also, *P. fluorescens* BF13 can produce VA in a concentration of 110 ppm (0.11 mg ml⁻¹) (Civolani *et al.*, 2000). In the present study, the activity from the *Pseudomonas* sp. IFVB strain was lower than that reported in *Pseudomonas* sp. AZ₁₀ UPM with 319 ppm of VA, Y= 53.1 mg VA mg⁻¹ FA and P=1.08 mg FA L⁻¹ h⁻¹ (Zamzuri *et al.*, 2014).

On the other hand, VA production by *Enterobacter* sp. IFVB was higher relative to other strains such as *Enterobacter* sp. Px6-4 which has the capacity of bioproduct conversion (18 ppm), after 12 h of monitoring (Li *et al.*, 2008). While *E. soli* and *E. aerogenes* produce small amounts of VA (1-5 ppm) in cultures supplemented with FA indicating differences between the ability of strains to bioconvert AC (Hunter *et al.*, 2012). In relation to *Citrobacter* genera, its VA production was lower in comparison to other Gram-negative bacteria analyzed in the present study. According to Zamzuri *et al.*, (2014) and Graf *et al.*, (2016) the production of AC by *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Citrobacter* genera could be associated because these bacteria have the similar biochemical pathways involved in the mechanisms of FA bioconversion to AC.

The AC production by the three Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans was identified by FT-IR spectrometry, showing the presence of characteristic AC groups in different spectral regions. IR spectral results of VA were compared with wavelength regions (cm⁻¹) from the database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Chu *et al.*, 1999 and Clavijo *et al.*, 2008) reports. In all cases, the three Gram-negative bacteria presented the same functional groups that corresponded to VA and the percentage of transmittance were different in the four regions found for the three Gram-negative bacteria.

Our results demonstrated the vanillin resistance (VR) of *Pseudomonas* sp. IFVB and were consistent with previous reports, which showed values of MIC that varied from 110 to 22500 µg mL⁻¹. While, the VR of *Enterobacter* IFVB were higher than the values reported by Li *et al.*, (2008) (18 µg mL⁻¹) and *Citrobacter* IFVB showed lower values of VR in comparison with other results (3000 µg mL⁻¹) (Harazono *et al.*, 2003). Compared with Yemis *et al.*, 2011, our results confirmed the resistance to VA on *Enterobacter* species (8 µg mL⁻¹). Also, Harazono *et al.*, (2003), indicated that some Gram-negative bacteria like *Citrobacter* are VAR, because they contained AC biosynthetic enzymes (Harazono *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2006). Additionally, research on VA production by the *Pseudomonas* genus confirms the bioproduct resistance of this bacterium (Civolani *et al.*, 2000; Zamzuri *et al.*, 2014). Finally, all Gram-negative bacteria were HBA resistant due to their ability to decarboxylate HBA under anaerobic and aerobic conditions in agreement with Cava *et al.*, 2012. The resistance profile of the three Gram-negative bacteria to AC is related to the curing of vanilla beans, since these bacteria can assimilate compounds such as VA, vanillin and HBA produced in the same environment (vanilla beans) where they were isolated (Luna-Guevara *et al.*, 2016a). Moreover, some microorganisms can

cells method. For example, *P. resinovorans* SPR1 was found to produce 1100 ppm (1.1 g L⁻¹) of VA (molar yield of 44%) after 60 h of monitoring (Ashengroph *et al.*, 2011). Also, *P. fluorescens* BF13 can produce VA in a concentration of 110 ppm (0.11 mg ml⁻¹) (Civolani *et al.*, 2000). In the present study, the activity from the *Pseudomonas* sp. IFVB strain was lower than that reported in *Pseudomonas* sp. AZ₁₀ UPM with 319 ppm of VA, Y= 53.1 mg VA mg⁻¹ FA and P=1.08 mg FA L⁻¹ h⁻¹ (Zamzuri *et al.*, 2014).

On the other hand, VA production by *Enterobacter* sp. IFVB was higher relative to other strains such as *Enterobacter* sp. Px6-4 which has the capacity of bioproduct conversion (18 ppm), after 12 h of monitoring (Li *et al.*, 2008). While *E. coli* and *E. aerogenes* produce small amounts of VA (1-5 ppm) in cultures supplemented with FA indicating differences between the ability of strains to bioconvert AC (Hunter *et al.*, 2012). In relation to *Citrobacter* genera, its VA production was lower in comparison to other Gram-negative bacteria analyzed in the present study. According to Zamzuri *et al.*, (2014) and Graf *et al.*, (2016) the production of AC by *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Citrobacter* genera could be associated because these bacteria have the similar biochemical pathways involved in the mechanisms of FA bioconversion to AC.

The AC production by the three Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans was identified by FT-IR spectrometry, showing the presence of characteristic AC groups in different spectral regions. IR spectral results of VA were compared with wavelength regions (cm⁻¹) from the database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Chu *et al.*, 1999 and Clavijo *et al.*, 2008) reports. In all cases, the three Gram-negative bacteria presented the same functional groups that corresponded to VA and the percentage of transmittance were different in the four regions found for the three Gram-negative bacteria.

Our results demonstrated the vanillin resistance (VR) of *Pseudomonas* sp. IFVB and were consistent with previous reports, which showed values of MIC that varied from 110 to 22500 µg mL⁻¹. While, the VR of *Enterobacter* IFVB were higher than the values reported by Li *et al.*, (2008) (18 µg mL⁻¹) and *Citrobacter* IFVB showed lower values of VR in comparison with other results (3000 µg mL⁻¹) (Harazono *et al.*, 2003). Compared with Yemis *et al.*, 2011, our results confirmed the resistance to VA on *Enterobacter* species (8 µg mL⁻¹). Also, Harazono *et al.*, (2003), indicated that some Gram-negative bacteria like *Citrobacter* are VAR, because they contained AC biosynthetic enzymes (Harazono *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2006). Additionally, research on VA production by the *Pseudomonas* genus confirms the bioproduct resistance of this bacterium (Civolani *et al.*, 2000; Zamzuri *et al.*, 2014). Finally, all Gram-negative bacteria were HBA resistant due to their ability to decarboxylate HBA under anaerobic and aerobic conditions in agreement with Cava *et al.*, 2012. The resistance profile of the three Gram-negative bacteria to AC is related to the curing of vanilla beans, since these bacteria can assimilate compounds such as VA, vanillin and HBA produced in the same environment (vanilla beans) where they were isolated (Luna-Guevara *et al.*, 2016a). Moreover, some microorganisms can

produce or degrade AC like vanillin and HBA. Also, there are Gram-negative and Gram-positive bacteria that produce vanillin from FA like precursors and, on rare occasions, they produce HBA and can utilize AC as a defense mechanism to inhibit competing bacterial growth (Chen *et al.*, 2015; Kallscheuer *et al.*, 2018; Sannino *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2018).

The contribution of the present study was that *Pseudomonas* sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB isolated from vanilla beans had the ability to hydrolyze pectin, a major component of the plant cell wall, they participate in the bioconversion of FA into VA and the three bacteria were resistant to AC. Furthermore, the present study showed that *Pseudomonas* sp. IFVB, *Enterobacter* sp. IFVB and *Citrobacter* sp. IFVB produce VA under *in vitro* conditions. On the other hand, the impact on the production of AC as VA can be proposed as an alternative to produce natural VA from resting cells method through the use of FA as substrate, allowing a cheap and fast bioconversion to AC isolated from vanilla curing process. Finally, this is the first report of the relationship to production processes and resistance to AC in Gram-negative bacteria and suggests a potential use of these microorganisms as an alternative to certain AC production.

Acknowledgements

We are grateful for the support provided by the producers of *Vanilla planifolia* in Papantla Veracruz-Mexico in the collection of vanilla beans. Also, the Colegio de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química and the Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias, BUAP (CICM-ICUAP) for contributing the necessary funds for the present study. The author had CONACYT Doctoral Fellowship during the performance of this work (Scholarship No. 40696). We thank to Dra. Claudia F. Martínez de la Peña and Glen D. Armstrong for the review of the manuscript and her important comments and contribution.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abbott DW and Boraston AB (2008) Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **72**, 301–16.
2. Ammar E, Nasri M, Medhioub, K. (2005) Isolation of *Enterobacteria* able to degrade simple aromatic compounds from the wastewater from olive oil extraction. *World J Microbiol Biotechnol.* **21**, 253-259.
3. Ashengroph, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., and Momenbeik, F. (2011) *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. *New Biotechnol.* **28**, 656-664.

4. Attri S, Garg G. (2014) Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. *J Innov Biol.* **1**, 45–50.
5. Barghini, P., Montebove, F., Ruzzi, M., and Schiesser, A. (1998) Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens* BF13 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 309-314.
6. Borenshtein, Diana; Schauer, David B. El género *Citrobacter*. *Los procariotas: Volumen 6: Proteobacterias: subclase gamma*, 2006, pág. 90-98.
7. Cava R RM, Taboada RA, Valverde F MT and Marín IF. (2012) Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food Bioprocess Technol.* **5**, 2120–31.
8. Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, *et al.*, (1995) Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L- homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 1959–67.
9. Chen, S. Y., Guo, L. Y., Bai, J. G., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, Z, Wang, X. J. (2015) Biodegradation of p-hydroxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas putida* CSY-P1 isolated from cucumber rhizosphere soil. *Plant Soil.* **389**, 197-210.
10. Chu, P. M., Guenther, F. R., Rhoderick, G. C., and Lafferty, W. J. (1999). The NIST quantitative infrared database. *J Res Nalt Inst Stan).* **104**, 59.
11. Civolani, C., Barghini, P., Roncetti, A. R., Ruzzi, M., and Schiesser, A. (2000) Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Appl Environ Microb.* **66**, 2311-2317.
12. Clavijo, E., Menéndez, J. R., and Aroca, R. (2008) Vibrational and surface-enhanced Raman spectra of vanillic acid. *J Raman Spectrosc.* **39**, 1178-1182.
13. Darah I, Nisha M, Lim SH. (2015) Polygalacturonase production by calcium alginate immobilized *Enterobacter aerogenes* NBO2 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **175**, 2629-2636.
14. Demir H, Tari C. (2016) Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 3575-3582.
15. Dias, M., Miguel, M. G. D. C. P., Duarte, W. F., Silva, C. F., and Schwan, R. F. (2015) Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian Cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. *Ann Microbiol.* **65**, 851-864.

16. Florencio C, Couri S, Farinas CS. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.* 2012;1:1-7.
17. Frenkel, Ch, AS. Ranadive, J Tochiuitl-Vázquez and D Havkin-Frenkel. (2010). Chapter 6. Curing of vanilla. *In Handbook of vanilla science and technology.* p 79-103.
18. González ET and Allen C. (2003) Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**, 536-44.
19. Graf, N., Wenzel, M., and Altenbuchner, J. (2016) Identification and characterization of the vanillin dehydrogenase YfmT in *Bacillus subtilis* 3NA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3511-3521.
20. Grimont, Francine; Grimont, Patrick AD. The genus *enterobacter*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, 2006, p. 197-214.
21. Havkin-Frenkel D and Belanger FC. (2010) Handbook of vanilla science and technology. John Wiley and Sons. p 62.
22. Hernández-Hernández, J. (2010). Chapter 1. Mexican vanilla production. *In Handbook of vanilla science and technology.* p 1-25.
23. Hunter, W. J., Manter, D. K., and van der Lelie, D. (2012) Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiaicol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. *Curr Microbiol.* **65**, 752-757.
24. Ito N, Itakura M, Eda S, *et al.*, (2006) Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. *Microbes Environ.* **21**, 240-50.
25. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. Vol. 40, *Process Biochem.* **40**, 2931-44.
26. Kallscheuer, N., Marienhagen, J. (2018) *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids. *Microb cell fact.* **17**, 70.
27. Kalluri, UC, Yin, H., Yang, X and Davison, B.H. (2014) Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance. *Plant Biotechnology J.* **12**, 1207-1216.
28. Kubo I, Muroi H, Kubo A. (1995) Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Bioorganic Med Chem.* **3**, 873-80.
29. La Torre-Ruiz D, Ruiz-Valdiviezo VM, Rincón-Molina (2016) Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Braz. J. Microbiol.* **47**, 587-596.

30. Li, X., Yang, J., Li, X., Gu, W., Huang, J., and Zhang, K. Q. (2008) The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp. Px6-4 isolated from Vanilla root. *Process Biochem.* **43**, 1132-1137.
31. Luna-Guevara JJ, Ruiz Espinosa H, Herrera Cabrera EB, *et al.*, (2016a) Variety of microflora present in vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) and its relationship with curing processes. *Agroproductividad.* **9**, 3–9.
32. Luna-Guevara JJ, Ruiz Espinosa H, Herrera Cabrera EB, *et al.*, (2016b) Physical-Chemical and sensory characterization of *Vanilla Planifolia* Jacks. ex Andrews with different curing schemes. *Agroproductividad.* **9**, 34–40.
33. Mariod AA, Adamu HA, Ismail M, Ismail N (2010) Antioxidative effects of stabilized and unstabilized defatted rice bran methanolic extracts on the stability of rice bran oil under accelerated conditions. *Grasas y Aceites* **61**, 409–415
34. Mateos PF, Jimenez Zurdo JI, Chen J, *et al.*, (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol.* **58**, 1816–22.
35. Miller GL. (1959) Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
36. Mishra, S., Kullu, M., Sachan, A., Vidyarthi, A. S., and Sachan, S. G. (2016) Bioconversion of ferulic acid to vanillic acid by *Paenibacillus lactis* SAMS-2001. *Ann Microbiol.* **66**, 875-882.
37. Mishra, S., Sachan, A., Vidyarthi, A. S., and Sachan, S. G. (2014) Microbial production of 4-vinylguaiacol from ferulic acid by *Bacillus cereus* SAS-3006. *Biocatal Biotransformation.* **32**, 259-266.
38. Okolie PN, Ugochukwu EN. (1988) Changes in activities of cell wall degrading enzymes during fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with *Citrobacter freundii*. *J Sci Food Agric.* **44**, 51–61.
39. Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., and Domínguez, J. M. (2016) *Bacillus aryabhatai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World J Microbiol Biotechnol.* **32**, 159.
40. Pundir S, Maria JM and CO (2017) UniProt protein knowledgebase. Protein Bioinformatics: from protein modifications and networks to proteomics. 41–55.
41. Reddy MP C, Saritha K V. (2016) Effects of the culture media optimization on pectinase production by *Enterobacter* sp. PSTB-1. *Biotech.* **6**, 1-11.
42. Röling WFM, Kerler J, Braster M, *et al.*, (2001) Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 1995–2003.

Table 1. Methods and conditions of study to evaluate the processes involved in aromatic compounds production by Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans

Process	Method	Types of sample	Measurement parameter
Pectinolytic Activity (PA)	Drop plate	Supernatant or Pellet	PAI
	Cup plate		
	DNS, Miller	Supernatant	U mL ⁻¹
Bioconversion of Ferulic Acid (BFA)	Cup plate	Pellet	BFAI
	HPLC, FT-IR	Supernatant	ppm, %T
Aromatic compounds resistance (ACR)	Spectrophotometric	Cultures of bacteria	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

DNS (Dinitrosalicylic acid), FT-IR (Fourier Transform Infrared spectroscopy). T. Transmittance, ppm. (parts per million); HPLC high performance liquid chromatography, MIC Minimum Inhibitory Concentration, BFAI. (Bioconversion of ferulic acid Index). PA (Pectinolytic Activity Index), Y (yield) and P (productivity of bioproduct).

Table 2. The Pectinolytic Activity Index (PAI) evaluated by drop and cup plate methods in Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans.

Method 1: Drop plate 			
Source	<i>Pseudomonas</i> sp. strain IFVB	<i>Enterobacter</i> sp. strain IFVB	<i>Citrobacter</i> sp. strain IFVB
Supernatant	$1.53 \pm 0.26_{FG}$	$2.16 \pm 0.12_{DEF}$	$1.06 \pm 0.01_G$
Pellet	$1.47 \pm 0.25_{FG}$	$1.84 \pm 0.40_{EF}$	$2.47 \pm 0.02_{CDE}$
Method 2: Cup plate			
Supernatant	$2.8 \pm 0.10_{BCD}$	$3.17 \pm 0.40_{BC}$	$4.45 \pm 0.01_A$
Pellet	$4.75 \pm 0.45_A$	$2.68 \pm 0.23_{CD}$	$3.46 \pm 0.23_B$

The values are the average \pm standard deviations (n=3). The different capital letters indicate significant difference on PAI of the methods and microorganisms ($p \leq 0.05$). Bold letters indicate the highest values.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of AC in bacteria isolated from vanilla beans.

MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Pseudomonas</i> sp. IFVB	<i>Enterobacter</i> sp. IFVB	<i>Citrobacter</i> sp. IFVB
Vanillin	390.62 \pm 0.01	195.31 \pm 0.04	195.31 \pm 0.04
Vanillic acid (VA)	390.62 \pm 0.02	781.25 \pm 0.02	781.25 \pm 0.06
p-hydroxybenzoic acid (HBA)	781.25 \pm 0.04	781.25 \pm 0.02	781.25 \pm 0.02

The values are the average of three replicates \pm standard deviation. Bold letters indicate the highest values.

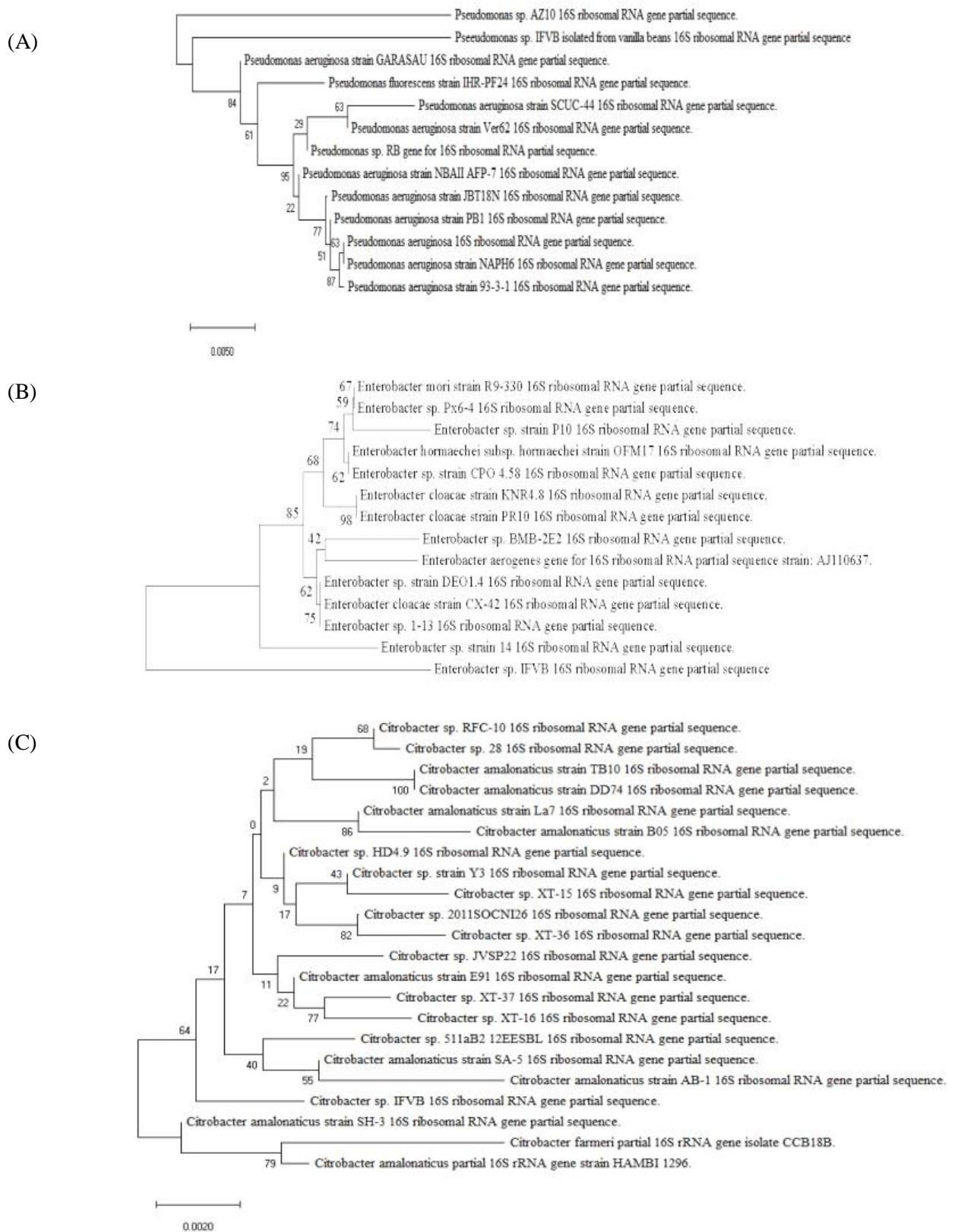


Figure 1 Phylogenetic tree showing the taxonomic location of (A) *Pseudomonas* sp. IFVB (B) *Enterobacter* sp. IFVB and (C) *Citrobacter* sp. IFVB among the neighboring species.

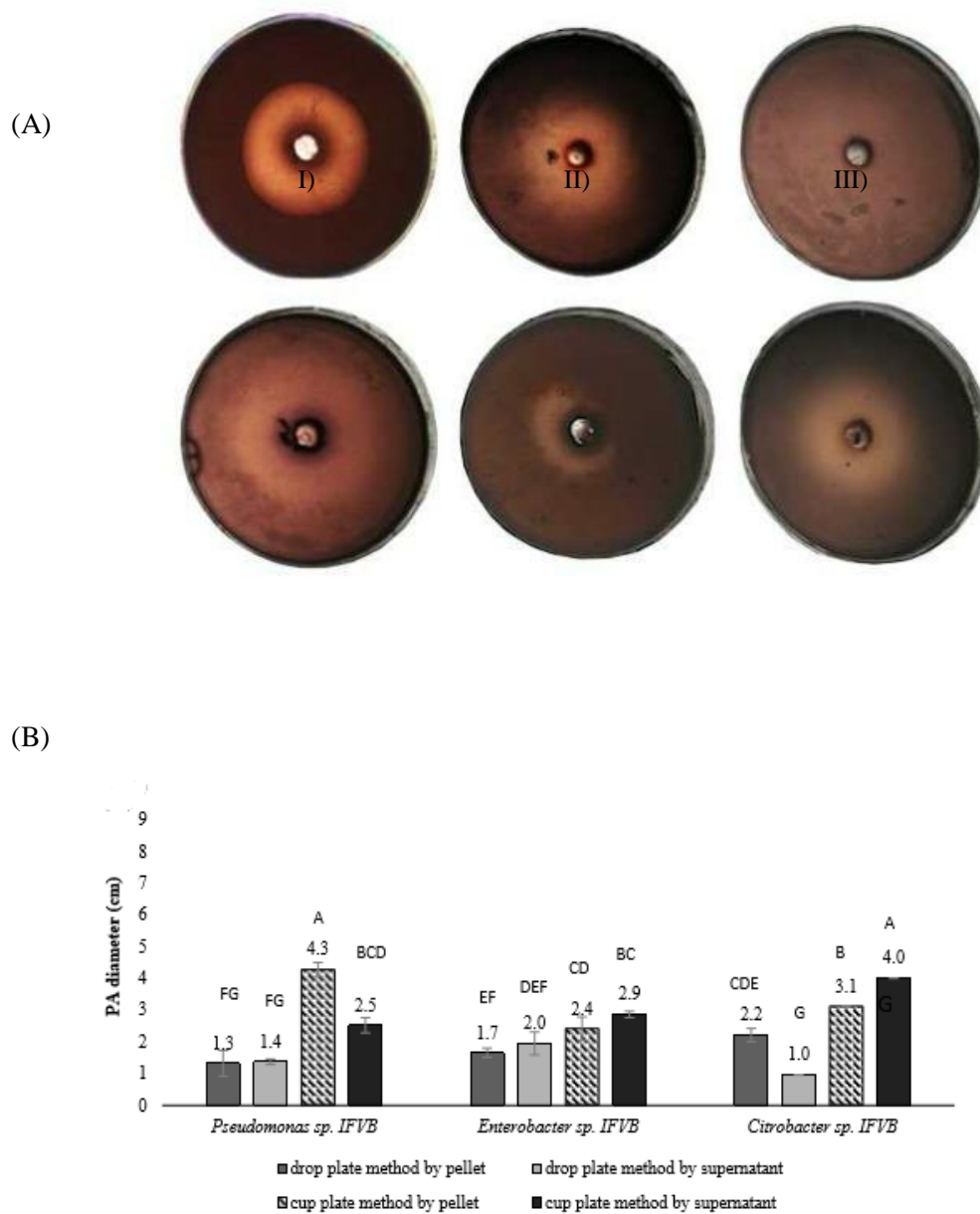


Figure 2 The pectinolytic activity (PA) of Gram-negative bacteria isolated from vanilla beans. (A) Images of PA from the supernatant and pellet by cup plate method: *Pseudomonas sp. IFVB* (I, IV), *Enterobacter sp. IFVB* (II, V) and *Citrobacter sp. IFVB* (III, VI) strains. (B) PA diameter (cm) from pellet and supernatant by both methods. Error bars indicate the mean \pm standard deviation (n=3). The different capital letters indicate significant difference on PA diameters of the methods and microorganisms ($p \leq 0.05$).

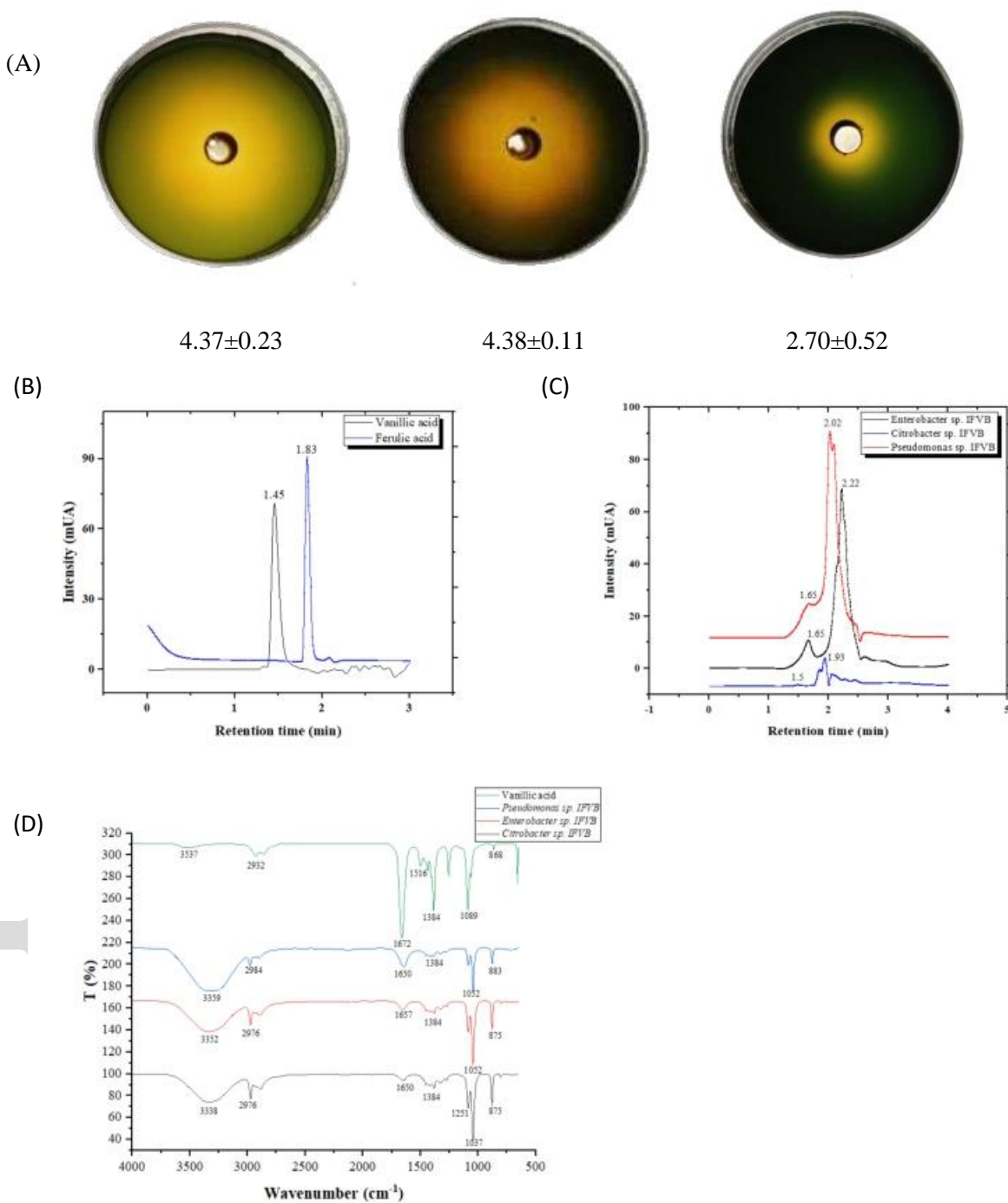


Figure 3 (A) Assimilation of FA to AC in Gram-negative bacteria by cup plate method in MM-VP medium. (B) HPLC chromatograms of VA and FA standards. Retention time of VA=1.5-1.65 min and retention time of FA= 1.83-2.22 min. (C) The VA production in *Pseudomonas* sp. IFVB, *Citrobacter* sp. IFVB and *Enterobacter* sp. IFVB. (D) Identification of the functional groups of VA by FT-IR in Gram-negative bacteria. The values are expressed in % of transmittance. The values are the average of three replicates \pm standard deviation.

