

# UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD-IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA



Casa abierta al tiempo



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

PRODUCCION DE ACIDO JASMONICO CON  
*Botryodiplodia theobromae* POR CULTIVO LIQUIDO Y POR  
FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

## T E S I S

PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

POR

Q. FELIPE ENG SANCHEZ

SUSTENTADA EL 12 DE NOVIEMBRE DE 1996 ANTE EL JURADO  
COMPUESTO POR:

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES  
Dr. MARIANO GUTIERREZ ROJAS  
Dra. MIRIAM KLIBANSKY DELGADO  
Dr. LEONEL GONZALEZ PENICHER

PRESIDENTE  
SECRETARIO  
VOCAL  
VOCAL

1996

222264

A mis padres: *Clara y Wah* por haberme enseñado que en el camino la superación constante se pueden lograr las cosas que más anhelamos

A *Beatriz, Laichen, Alejandro, Yanina, Amarilis, Julio y Felix*

Con todo amor y cariño a mi país y al pueblo de *MEXICO*

“El cultivo de microorganismos, tanto en el laboratorio como en la industria, ha sido tratado más como un arte que como ciencia, y a menudo empleando la intuición en lugar de la lógica”

**Rodolfo Quintero Ramírez**

# “PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO CON *Botryodiplodia theobromae* POR CULTIVO LÍQUIDO Y FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO”.

## CONTENIDO

CONTENIDO	i
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
INTRODUCCIÓN	ix
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>8</b>
1.1 <b>ÁCIDO JASMÓNICO</b>	<b>8</b>
1.1.1 Estructura química, propiedades físicas y químicas	
1.1.2 Producción del ácido jasmónico	10
A. Vía química	
B. Vía microbiana	
1.1.3 Biosíntesis del ácido jasmónico	12
A. Biosíntesis de ácidos grasos saturados	
B. Elongación de la cadena de ácidos grasos	
C. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	
D. Bioconversión del ácido $\alpha$ -linoléico en ácido jasmónico	
1.1.4 Actividad biológica	19
A. Fitohormona	
B. Inducción de la síntesis de proteínas	
C. Inducción de defensa química	
D. Formación de tubérculos	
E. Otros efectos	
1.2 <i>Botryodiplodia theobromae</i>	25
1.2.1 Fisiología	25
1.2.2 Actividad enzimática	26
1.2.3 Producción de metabolitos secundarios	27
1.3 <b>PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO POR CULTIVO LÍQUIDO</b>	<b>27</b>
1.3.1 Medios de cultivos y condiciones de operación	28
1.3.2 Características del método de cultivo	29
1.4 <b>PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO</b>	<b>30</b>
1.4.1 Definición de fermentación en medio sólido	31

1.4.2 Ventajas y desventajas de la FMS para la producción de metabolitos secundarios	31
1.4.3 Metabolismo secundario	33
1.4.4 Aspectos fisiológicos	35
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVOS GENERALES	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
5.1 MICROORGANISMOS	42
5.2 MEDIOS DE CULTIVOS	42
5.3 ESTUDIOS DE FISIOLOGÍA DE <i>Botryodiplodia theobromae</i>	43
5.3.1 Velocidad radial	43
5.3.2 Densidad de crecimiento	43
5.4 CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO	45
5.4.1 Cultivo líquido	45
A. Inoculación	
5.4.2 Fermentación en medio sólido	45
A. Desarrollo del inóculo	
B. Preparación del soporte	
C. Preparación del medio de fermentación	
D. Desarrollo de la fermentación	
- 5.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	47
5.5.1 Cultivo líquido	47
5.5.2 Fermentación en medio sólido	48
5.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS	50
5.6.1 Análisis de las muestras del cultivo líquido	50
A. Biomasa	
B. pH	
C. Glucosa y fructosa	
D. Ácido jasmónico	

5.6.2	Análisis de las muestras de la fermentación en medio sólido	52
	A. Humedad	
	B. pH	
	C. Glucosa y fructosa	
	D. Ácido jasmónico	
	E. Bióxido de carbono y oxígeno	
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1	SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO JASMONICO	54
6.2	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO EN CULTIVO LÍQUIDO	58
6.2.1	Efecto de la relación carbono:nitrógeno	58
6.2.2	Efecto del tipo de inóculo	64
6.2.3	Efecto de la adición de extracto de levadura	67
6.2.4	Efecto de la temperatura	71
6.2.5	Efecto de la agitación	73
6.2.6	Efecto del tipo de fuente de carbono	77
6.2.7	Selección del tipo de fuente de nitrógeno	79
6.2.8	Efecto de la adición de aceite de soya (precursor)	82
6.3	CRECIMIENTO SUPERFICIAL DE <i>B. theobromae</i>	85
6.3.1	Cinética de esporulación de <i>B. theobromae</i> 1 y 2434	85
6.3.2	Efecto de la temperatura y del medio de cultivo	87
6.3.3	Efecto del pH	
6.4	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO POR FMS	94
6.4.1	Efecto de la concentración de los nutrientes	94
6.4.2	Efecto del tipo de fuente de nitrógeno	97
6.4.3	Efecto de la relación carbono:nitrógeno	100
7.	CONCLUSIONES GENERALES	105
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9.	GLOSARIO	118

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la realización de esta tesis de maestría contribuyeron muchas personas proporcionando información, nuevos conocimientos, experiencias, críticas e ideas. A todos ellos mis agradecimientos por la valiosa colaboración y estímulo, pero en forma especial a las siguientes personas:

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas por su gran apoyo, colaboración, dirección, comentarios ideas, sugerencias y por enseñarme a pensar como científico.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por sus valiosas aportaciones, comentarios, dirección, ideas, sugerencias, paciencia y su hospitalidad durante todo el tiempo de realización de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y Dr. Sergio Huerta Ochoa por los comentarios, críticas e ideas aportadas. A la MC Tania Volke Sepulveda por su ayuda en la parte experimental inicial de este trabajo.

A MC Esperanza Valdés Jiménez, Dra. Miriam Klibansky Delgado y el Ing. Gustavo Saura Sarria por el apoyo y estímulo desde lejos.

A los profesores de las materias de la maestría por el aporte de conocimientos y el estímulo a la superación

A MC María Angeles Aquihualt y Wilfredo Rodríguez Pérez por su colaboración y ayuda incondicional.

A mi compañero Juan Manuel Romano Machado por ser más que amigo, hermano.

A mis compañeros de generación por la ayuda incondicional, y especialmente a Inés, Graciela, Rosario, Ignacio, Felipe y Oscar.

A mis compañeros de la Planta Piloto de Fermentaciones de la UAM-I, y especialmente a Mayola y a Mónica.

A todos, muchas gracias.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAB	Ácido absícico
ACP	Proteína portadora del acilo
ATP	Adenosin trifosfatō
AJ	Ácido jasmónico
(+)-7-isoAJ	Ácido (+)-7-isojasmónico
AJ-Me	Éster metílico del ácido jasmónico
Å	Angstrom
ASP	Almidón soluble de papa
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CR	Crecimiento radial
d	día
DESV. STD.	Desviación estándar
EMA	Extracto de malta agar
esp	Esporas
FMS	Fermentación en medio sólido
G.L.	Grados de libertad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
l	Litros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
ODS	Octadecil silano
PAV	Proteína de almacenamiento vegetativo
PDA	Papa dextrosa agar
PIJ	Proteína inductora de jasmonatos
ppm	Partes por millón
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación
rC/N	Relación carbono:nitrógeno
RCV	Regulador del crecimiento vegetal
RCVe	Regulador del crecimiento vegetal exógeno
rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
t'	Tiempo
UV	Ultravioleta
VRC	Velocidad radial de crecimiento
α	Nivel de significancia
ρ <sub>x</sub>	Densidad de crecimiento



## RESUMEN

El ácido jasónico (AJ) es un regulador del crecimiento vegetal exógeno que produce una amplio espectro de respuestas fisiológicas en las plantas, y debido a sus aplicaciones en la agricultura, dicho regulador es considerado hoy día, como otro de los productos que puede reportar beneficios en la obtención de alimentos.

La producción de AJ se ha conducido principalmente por vía microbiana, pero ha sido poco estudiada, de ahí que el propósito fundamental de este trabajo fuera de estudiar los factores que influyen en la producción de este regulador tanto por cultivo líquido como por fermentación en medio sólido, utilizando como modelo cepas silvestres de *Botryodiplodia theobromae*.

La primera estrategia a seguir, fue la selección de cepas en cultivo líquido a nivel de matraces, con buena capacidad y productividad para producir el AJ. Se encontraron dos cepas con estas propiedades (cepas: 1 y 2434).

Una vez seleccionadas las cepas para la realización de los estudios de producción del AJ, se procedió a estudiar el perfil de formación del AJ en presencia de diferentes relaciones carbono:nitrógeno (rC/N). La producción específica de AJ se estimuló preferentemente a la rC/N de 17 alcanzándose una producción específica máxima de 109 mg AJ/g de biomasa, mientras que para la rC/N 35 y 70 se alcanzó una producción específica máxima de 73.7 y 53.5 mg AJ/g biomasa, respectivamente.

Se estudió el efecto del tipo de inóculo: por esporas y micelio en la producción del AJ. La productividad fue superior para la inoculación con micelio en 1.7 veces respecto a la productividad cuando se empleo esporas, pues se redujo en la primer caso el tiempo al cual se alcanza la fase estacionaria, que es donde se produce la acumulación del metabolito. El tiempo de producción máxima del AJ en la variante inoculada con micelio se redujo en unos ocho días aproximadamente respecto a la variante inoculada con esporas.

Con el fin de estudiar el efecto estimulador del extracto de levadura sobre la síntesis del AJ, se determinó el perfil de producción del metabolito en presencia del extracto de levadura. En este caso, también se mejoró la productividad del AJ en 1.3 veces respecto del medio control sin la adición de ésta fuente, posiblemente por el aporte de vitaminas y

cofactores que favorecen el metabolismo para la producción del metabolito. El tiempo de producción máxima del AJ se redujo en dos días aproximadamente cuando se adicionó ésta fuente.

Se investigó el efecto de dos parámetros ambientales en la producción del AJ por cultivo líquido: la temperatura y la agitación. De las temperaturas ensayadas (25, 27, 30, 32 y 35° C) la mejor temperatura para la producción del metabolito fue de 30° C para los dos cepas seleccionadas; mientras que la agitación las velocidades ensayadas (50, 100 y 150 rpm) provocaron un efecto negativo en la síntesis del metabolito ya que se redujo apreciablemente la producción del AJ, posiblemente por la síntesis simultánea de un polisacárido extracelular según se reporta en la literatura.

Se estudió el efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno empleadas en el medio de cultivo. Los mejores sustratos respecto del control (sacarosa) fueron: la fructosa y la glucosa, mientras que para la fuente de nitrógeno ninguna de las ensayadas fue mejor al control (nitrato de sodio).

Se investigó el efecto de la adición de un precursor de la síntesis del AJ como el aceite de soya, fuente de ácido  $\alpha$ -linolénico. Las dosis empleadas de 0.5 y 1 ml de un aceite comercial a 25 ml de medio y las condiciones ensayadas no provocaron un efecto positivo en cuanto al inicio de la producción y la producción del AJ, posiblemente por la descomposición del ácido  $\alpha$ -linolénico durante la esterilización del mismo.

Por otro lado, los estudios de producción del AJ por FMS comenzaron por realizar las cinéticas de esporulación de las cepas seleccionadas con vistas a determinar el tiempo óptimo para la preparación del inóculo. La cepa 1 presentó una esporulación máxima entre los 45 y 48 horas de fermentación con un título de  $2.25 \times 10^7$  esp/ml, mientras que para la cepa 2434 la esporulación máxima es escasa, pues se alcanzó de título de  $6.50 \times 10^5$  esp/ml a las cien horas de fermentación.

Se estudió la influencia de la temperatura, el medio de cultivo y el pH inicial en la velocidad radial de crecimiento y la densidad de crecimiento de la cepa 1. La velocidad radial de crecimiento se vio afectada por la composición del medio de cultivo, mientras que la temperatura no afectó de manera significativa esta variable. En el caso de la densidad de crecimiento, el medio compuesto por extracto de malta agar y a una temperatura se obtuvo

la mayor densidad de crecimiento con respecto a las demás condiciones ensayadas. Mientras, que el pH inicial del medio no influye significativamente en estas variables.

Finalmente, se estudió el efecto del aumento de la concentración de los nutrientes del medio de cultivo, la fuente de nitrógeno y la rC/N en la producción de AJ por FMS. Se demostró que es necesario el uso de medios más concentrados para obtener este metabolito por FMS, respecto de los medios empleados en cultivo líquido. Al utilizar un medio con 2.5 veces la concentración de nitrógeno, 10 veces la de fósforo y para las sales el triple de concentración respecto del medio reportado en la literatura para la producción de AJ en cultivo líquido, se produjo una concentración de 20 mg AJ/g materia seca, mientras que en el medio reportado por la literatura la producción del metabolito fue nula.

Al igual que en el cultivo líquido, la fuente de nitrógeno también influye apreciablemente en la producción de AJ por FMS, pues la síntesis del metabolito fue afectada por el pH que se generó en el medio, producto de la hidrólisis de las sales utilizadas. La síntesis del metabolito no ocurrió cuando se empleó sulfato de amonio, pues se alcanzó un pH de 3, mientras que para el control (nitrato de sodio), el pH se mantuvo por encima de 9 durante el desarrollo de la fermentación, obteniéndose una producción de AJ de 18 mg de AJ/g materia seca.

También la rC/N es otro factor nutricional que influye marcadamente en la producción de AJ tanto por cultivo líquido como por FMS, pues únicamente se produjo éste metabolito en la variante control de rC/N 17 hasta una concentración de 18.4 mg AJ/g materia seca, mientras que para las rC/N 35 y 70 no se detectó la presencia del mismo, posiblemente porque se acortó la fase estacionaria en estas variantes, al contar con una menor concentración de nitrógeno en el medio, respecto al control.

**Palabras claves:** ácido jasmónico, producción, *Botryodiplodia theobromae*, selección de cepas, cultivo líquido, fermentación en medio sólido, factores ambientales y nutricionales.

## INTRODUCCIÓN

Los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) juegan un papel muy importante en el crecimiento de las plantas y en la agricultura de hoy en día, debido a que estas sustancias pueden producir efectos beneficiosos al hombre (Larqué-Saavedra y Reyes, 1988; Gross y Parthier, 1994). Actualmente se conocen alrededor de 400 RCV; de éstos 300 son de origen microbiano, el resto se obtiene por vía química o son producidos por las plantas (Gross y Parthier, 1994).

La contaminación de los suelos y las aguas por el incorrecto uso de pesticidas y abonos minerales y la agricultura intensiva que dificulta el desarrollo natural de los ciclos biogeoquímicos y la migración de nutrientes, son factores que han conllevado a la progresiva erosión de los suelos, la disminución de su productividad, y a la creación de nuevos principios en cuanto al uso del suelo como recurso renovable: la agricultura sostenible (Alain, 1994; Yunlong y Smit, 1994).

La producción de RCV por vía microbiana es una de las alternativas compatible con los principios de la agricultura sostenible, debido a su menor impacto en el medio ambiente y a que son menos agresivos en comparación con los plaguicidas y fertilizantes minerales convencionales (Nieto y Frankenberger, 1990).

La introducción creciente de productos procedentes de la biotecnología a la agricultura permitirá la obtención de mayores rendimientos de las cosechas, desarrollar cultivos más productivos e incrementar la calidad de los mismos. Todo esto es de mucha importancia para los países en vías de desarrollo (Klibansky y González, 1995).

El ácido jasmónico (AJ) y sus derivados son los representantes de los RCV exógenos denominados jasmonatos a los cuales inicialmente se le atribuyeron las propiedades de promover la senescencia de las hojas y la inhibición del crecimiento de las plantas.

A partir de la década de los 80's estos compuestos comenzaron a ser estudiados intensamente por los fisiólogos vegetales, encontrándose otros efectos no menos importantes como son: la estimulación de la formación de tubérculos en papa y ñame (Koda

y Kikuta, 1991; Koda, 1992), el incremento de los rendimientos agrícolas en fresa, soya y caña de azúcar (Cobas, 1985; Sembdner y Gross, 1986; Dathe y col., 1990; López, 1994), la estimulación en la maduración de los frutos en jitomate y manzanas (Saniewski y col., 1987a), entre otros.

Debido a los usos diversos de los jasmonatos y además de que el éster metílico del AJ es un ingrediente de las esencias del jazmín (empleadas en perfumería), se han desarrollado muchos estudios de producción del AJ, a través de dos alternativas: la vía por síntesis química y la vía microbiana.

La vía por síntesis química requiere de la obtención de los productos de partida y de la consecución de varios pasos de reacción y por ende de la optimización de estos.

El uso de microorganismos para la producción del AJ demostró ser promisorio, pues los estudios realizados en cultivo líquido revelaron que algunos hongos, como por ejemplo, *Botryodiplodia theobromae* es capaz de producir este tipo de sustancia como resultado de su metabolismo secundario con rendimientos satisfactorios. Por lo tanto, para contribuir a los procedimientos de producción de este metabolito mediante esta vía, resulta interesante desarrollar estudios de las condiciones ambientales y nutricionales en que se favorece la producción del AJ, para así obtener una mayor producción y mejorar el proceso.

A pesar de los esfuerzos realizados por la comunidad científica en esta temática se cuenta con poca información en la producción de AJ mediante el cultivo líquido, mientras que la fermentación en estado sólido (FMS) no ha sido empleada para este propósito.

El presente trabajo, comienza con una revisión bibliográfica sobre el AJ acerca de sus características, biosíntesis y su actividad biológica. Se incluyen las características de *B. theobromae*, las condiciones de operación y medios de cultivos reportados para la producción del AJ en cultivo líquido, así como el tema de producción de metabolitos secundarios por FMS. En la parte experimental del trabajo, primeramente se realizó una selección de cepas de *B. theobromae* aisladas de fuentes naturales, de donde se seleccionaron dos de ellas para estudiar algunos factores ambientales y nutricionales tales como el tipo de inóculo, la agitación, la temperatura, la adición de extracto de levadura y aceite de soya al medio de cultivo, la relación carbono:nitrógeno (rC/N) y la fuente de

carbono y nitrógeno sobre la producción de este metabolito en cultivo líquido a nivel de matraces. Se estudió también la esporulación de las cepas seleccionadas, y la fisiología de una de las cepas en función de la temperatura, la composición del medio de cultivo y el pH inicial del medio. Finalmente, se investigó el efecto de otros factores nutricionales como el incremento de la concentración de los nutrientes del medio, la fuente de nitrógeno y la rC/N sobre la producción del AJ por FMS en columnas de vidrio y bagazo de caña como soporte inerte.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Ácido jasmónico

En el presente capítulo se describe el AJ en cuanto a su estructura, propiedades físicas y químicas, las diferentes formas en que se puede obtener, así como la ruta biosintética para la producción de este metabolito en los microorganismos y las plantas. Finalmente, se presentan los efectos fisiológicos que causa la aplicación de este RCV sobre las plantas.

El AJ y sus derivados pertenecen a los RCV denominados jasmonatos, siendo los más representativos el ácido (-)-jasmónico ((-)-AJ) y el ácido (+)-7-isojasmónico ((+)-7-isoAJ) los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas (Salisbury y Ross, 1992). En la figura 2.1 se presentan la formas isoméricas del AJ.

El éster metílico del AJ (AJ-Me) es uno de los componentes odoríficos principales de los aceites esenciales de las flores de *Jasminum grandiflorum* L (Demole y col., 1962) y *Rosmarinus officinalis* L (Crabalona, 1967), por lo cual este compuesto es reconocido como un importante ingrediente en la industria de perfumes y aromas (Koda, 1992; Hamberg y Gardner, 1992).

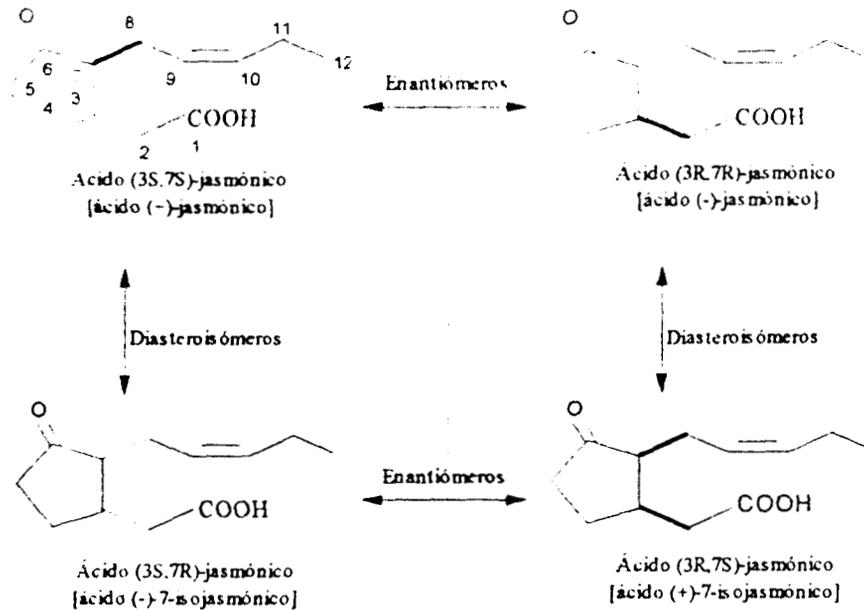
El AJ se aisló inicialmente a partir de sobrenadantes de cultivos del hongo *Lasiodiplodia theobromae* y fue identificado como inhibidor del crecimiento de plantas superiores. (Aldridge y col., 1971).

A partir de la década de los 80's el AJ y su éster metílico atrajeron la atención de los fisiólogos vegetales al detectarse la presencia de estos compuestos en diferentes partes de las plantas y ser identificados como promotores de la senescencia e inhibidores del crecimiento de las plantas (Sembdner y Gross, 1986).

#### 1.1.1 Estructura química, propiedades físicas y químicas

La estructura química de los jasmonatos está caracterizada por la presencia de un anillo ciclopentano variablemente sustituido en las posiciones C-3, C-6 y C-7 (figura 1.1). Debido a la

presencia de dos carbonos ópticamente activos en las posiciones C-3 y C-7 ha sido posible conocer sus diastereoisómeros y sus formas enantiómeras.



**Figura 1.1.** Formas isoméricas del ácido jasmónico. Fuente: Sembdner y Parthier (1993).

Los isómeros 3S,7R y 3R,7S tienen conformación *cis* con respecto a la cadena lateral según el plano del anillo ciclopentano, mientras que el 3S,7S y el 3R,7R tiene conformación *trans*.

Los isómeros *cis* se isomerizan fácilmente a la forma *trans*, presumiblemente a través de un intermediario enol (Koda, 1992). Este tipo de reacción se estimula bajo condiciones ácidas o básicas y altas a temperaturas (Vick y col., 1979).

Los jasmonatos con mayor actividad biológica son el (+)-7-isoAJ y su metil éster (Herman, 1987), aunque estos son también rápidamente isomerizados (Miersch, 1986). Los enlaces más importantes que rigen su alta actividad se encuentran en el enlace C-3 y C-7 del anillo del ciclopentano, y además en el grupo cetónico e hidróxido en el carbono C-6. Algunos conjugados de aminoácidos son activos como los jasmonatos no conjugados (Herman, 1987).

La fórmula empírica y nombre químico del AJ son:  $C_{12}H_{18}O_3$  y ácido *cis*-2-pent-2'-enil-3-oxo-ciclopentenilacético, respectivamente. Es un aceite amarillo viscoso, soluble en cloroformo, acetato de etilo, acetona y éter, y poco soluble en agua, su punto de ebullición es de 125°C/0.001 mm Hg (López, 1994).

### 1.1.2 Producción del ácido jasmónico

A partir de la década de los 70's se comenzaron los estudios para la producción del AJ y sus derivados. Hasta el momento se han utilizado dos vías alternativas para su producción: la vía química y la microbiana. A pesar de que existen pocos reportes en la literatura, se ha podido apreciar importantes esfuerzos por desarrollar esta temática.

#### A. Vía química

Kitahara y col. (1987) reportaron una vía de síntesis para la obtención de ( $\pm$ )-metiljasmonato y el ( $\pm$ )-metilcurcubato, a partir del 2-alilciclohexano-1,3-diona y mediante un proceso de hidrobtoración-oxidación del anillo, seguidos de 7 y 8 pasos de reacción para el primero y segundo, respectivamente. Los productos obtenidos mostraron inhibición del crecimiento en semillas de arroz y lechuga, así como una estimulación de la senescencia en hojas de avena, comportamientos característicos de los jasmonatos naturales.

En 1991, Kitahara y col. reportaron la posibilidad de incrementar el rendimiento total para la síntesis del metiljasmonato hasta en un 20 %, luego de 12 pasos de reacción, debido a que lograron una mayor estereoselectividad de la reacción de hidrobtoración-oxidación a partir de la 3-hidroximetilciclopentanona y contar con métodos adecuados de síntesis de los productos de partida. También mediante este procedimiento se garantiza la producción de otros derivados del AJ. A pesar de las mejoras introducidas por estos autores a la vía química de producción del AJ se requiere de la optimización de varios pasos de reacción para incrementar el rendimiento total del proceso.

#### B. Vía microbiana

El primer reporte sobre la síntesis por vía microbiana se debió Broadbent (1968). Este autor preparó AJ a partir del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en un medio conteniendo glucosa, glicerol o una mezcla de éstos como fuente de carbono, un nitrato de un metal alcalino o una sal de amonio, un aminoácido, licor de maíz, peptona, extracto de levadura o una mezcla de

ellos. El AJ fue aislado filtrando la biomasa y el sobrenadante fue acidificado y el AJ fue extraído con solventes orgánicos en el sobrenadante.

Aldridge y col. (1971) reportaron la producción de 500 mg/l de AJ por *Lasiodiplodia theobromae* (sinónimo. *Botryodiplodia theobromae*), en cultivo superficial al cabo de 13 días en vasijas de cerámicas con 1 L de medio Czapek, y observaron además que los sobrenadantes de estos cultivos inhibían el crecimiento de plantas superiores, demostrándose que el componente activo era el AJ.

Miersch y col. (1987) aislaron de fuentes naturales cepas de *B. theobromae* y encontraron una cepa con buena capacidad para producir AJ. La cepa seleccionada se desarrolló en cultivo líquido en un medio a base de sacarosa, harina de soya, licor de maíz y solución de sales, durante 7 días a 30° C. En estas condiciones la cepa produjo 800 mg/l de AJ.

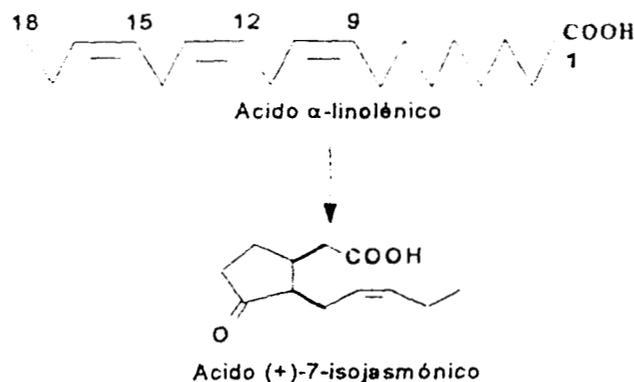
Cross y Webster (1970) aislaron en *Gibberella fujikuroi* el conjugado isoleucínico del AJ, pero no el ácido libre. Sin embargo, estudios posteriores realizados por Miersch y col. (1992) en mutantes de *G. fujikuroi* productoras de ácido giberélico, demostraron la presencia también del ácido libre en los sobrenadantes de los cultivos en proporciones muy bajas en comparación con las obtenidas con *B. theobromae*.

Estudios recientes (Miersch y col., 1993) con 46 especies de hongos, pertenecientes a 23 géneros diferentes (*Agrocybe*, *Aspergillus*, *Collybia*, *Coprinus*, *Cunninghamella*, *Daedalea*, *Fomes*, *Fusarium*, *Gleoporus*, *Homoconis*, *Marasmius*, *Mucor*, *Mycena*, *Paecilomyces*, *Phellinus*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Stropharia*, *Talaromyces*, *Trametes*, *Trichoderma*) crecidos en condiciones semejantes a *B. theobromae*, mostraron que los géneros *Collybia*, *Coprinus* y *Mycena* son los más destacados para la producción de AJ (*Collybia confluens* produjo 210 mg/l, mientras que *Coprinus alkalimus* 25 mg/l y *Mycena tintinabulum* 5 mg/l de AJ).

De todo lo anterior se desprende que la producción de AJ por vía microbiana resulta muy prometedora, pues se han reportado estudios sobre la selección de cepas, condiciones y medios de cultivos con resultados satisfactorios, los cuales podrán ser mejorados en la medida que se estudien los factores que controlan la producción de este metabolito.

### 1.1.3 Biosíntesis del ácido jasmónico

Se ha comprobado que la producción de AJ por los microorganismos y las plantas ocurre a través del metabolismo del ácido  $\alpha$ -linolénico (Vick y Zimmerman, 1984, 1986, 1987), el cual es un ácido graso insaturado de 18 átomos de carbonos con tres dobles enlaces en las posiciones C-9, C-12 y C-15 (figura 1.2).



**Figura 1.2.** Biosíntesis del ácido (+)-7-isojasmónico a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico

La biosíntesis de los ácidos grasos insaturados tiene lugar siguiendo una secuencia que comprende: la biosíntesis de ácidos grasos saturados, la elongación de la cadena de ácidos grasos y finalmente la formación de dobles enlaces en la cadena de los ácidos grasos. Para el caso del ácido  $\alpha$ -linolénico la secuencia comienza con la formación del ácido palmítico (ácido graso saturado de 16 átomos de carbono), continua con la elongación del ácido palmítico para dar el ácido esteárico (ácido graso de 18 átomos de carbono) y por último se forman los dobles enlaces de la cadena carbonada (Walker y Woodbine, 1976). A continuación se describen cada una de las etapas comprendidas en la secuencia para la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados.

#### A. Biosíntesis de ácidos grasos saturados

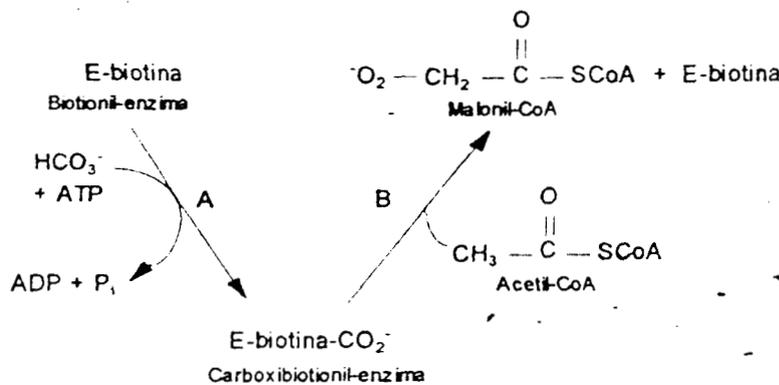
Los ácidos grasos son componentes esenciales para la vida celular, pues todos los organismos necesitan de ellos para su metabolismo y la formación de sus membranas, ya que constituyen formas de reservas y son componentes vitales de las membranas celulares (Robinson, 1991). La biosíntesis ocurre por la condensación de unidades de dos átomos de carbono, derivadas del ácido acético, donde el precursor primordial es la acetil-CoA. Además se necesita la presencia de iones

bicarbonato, un intermediario (la malonil-CoA), citrato o isocitrato y de NADPH (Wakil, 1960). La biosíntesis tiene lugar en el citosol, con los ácidos grasos en crecimiento esterificados a una proteína portadora de acilo (ACP) (Voet y Voet, 1990).

La reacción de condensación está acoplada a la hidrólisis de ATP, la cual permite completar la reacción de síntesis. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas: en la primera ocurre la carboxilación de la acetil-CoA, dependiente del ATP, por la acetil-CoA carboxilasa para formar malonil-CoA, seguida de la descarboxilación exotérmica del grupo malonilo en la reacción de condensación catalizada por la ácido graso sintasa (Ganguly, 1960).

La acetil-CoA carboxilasa está enlazado covalentemente a un grupo prostético de biotina, y es activado por la presencia de iones citrato o isocitrato (Wakil y Gibson, 1966).

En la figura 1.3 se presenta la primera etapa de la síntesis de ácidos grasos saturados. Cabe destacar que en esta etapa, interviene la acetil-CoA carboxilasa (enzima alostérico) y es la etapa reguladora primaria o limitante de la velocidad de síntesis de los ácidos grasos, pues esta enzima se encuentra en dos formas una inactiva como monómero y otra activa como polímero. El monómero inactivo presenta un centro de unión con la biotina, otro para el acetil-CoA y otro para el citrato; pero el citrato desplaza el equilibrio entre el monómero inactivo y el polímero activo en favor de este último (Rasmussen y Klein, 1968; Goodridge, 1973).



**Figura 1.3.** Primera etapa de la síntesis de ácidos grasos saturados donde interviene el acetil-CoA carboxilasa (E) y ocurren una activación del CO<sub>2</sub> (A) y una carboxilación (B) para dar la malonil-CoA. Fuente: Voet y Voet (1990).

En la figura 1.4 se presenta la segunda etapa de la biosíntesis de los ácidos grasos saturados. La misma ocurre por una secuencia de seis pasos sucesivos catalizadas por siete enzimas del complejo ácido graso sintentasa. La séptima proteína del sistema es la ACP, la cual no posee actividad catalítica y está unida covalentemente a la cadena de ácido graso en crecimiento (Walker y Woodbine, 1976).

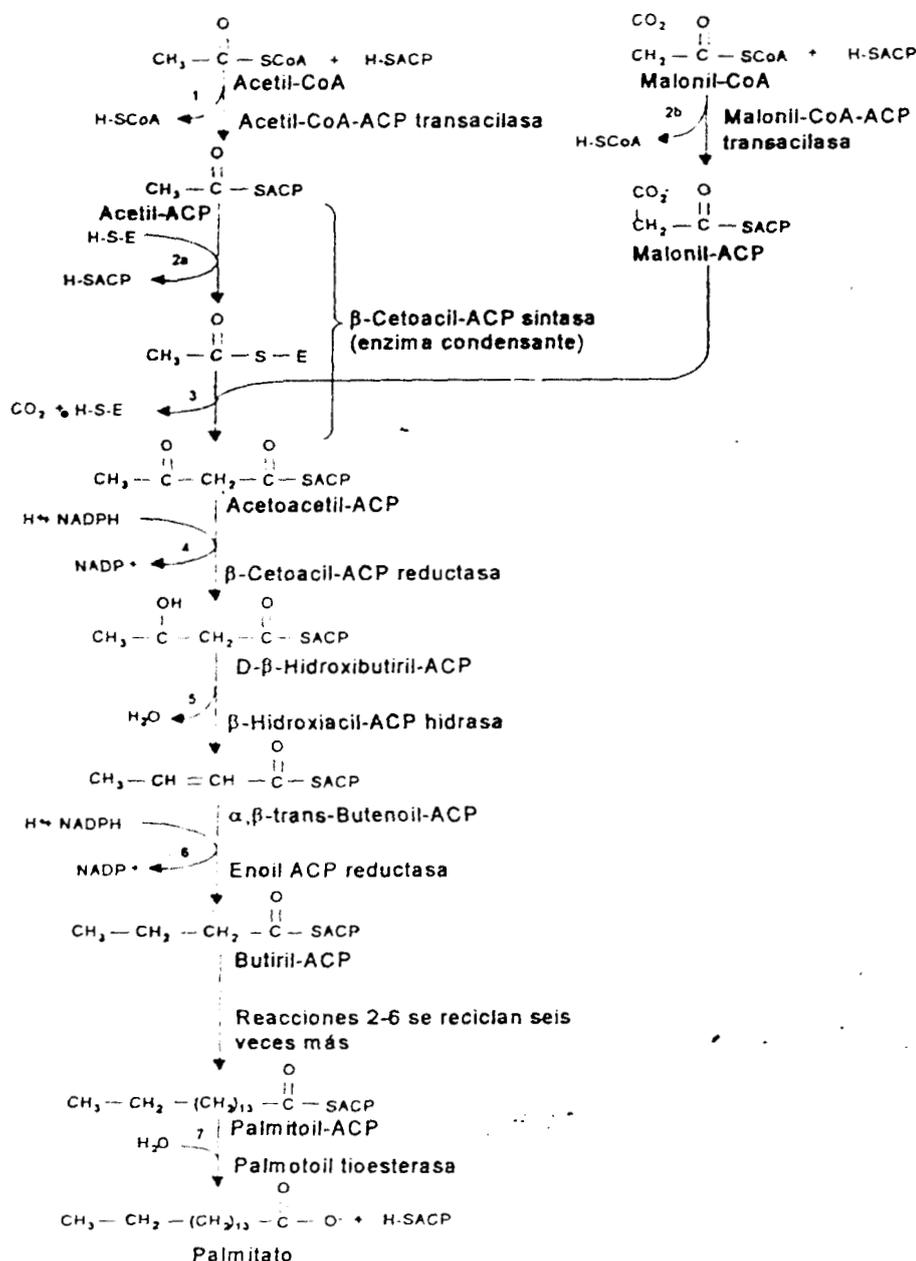
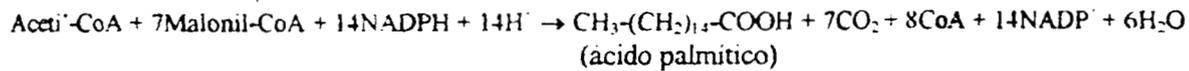


Figura 1.4. Segunda etapa de la biosíntesis de ácidos grasos saturados. Al formarse palmitato, se repite la ruta siete ciclos, en cada uno de ellos se alarga en C2 y continúa con una etapa final de hidrólisis y donde ACP es la proteína portadora de acilo. Fuente: Voet y Voet (1990).

La reacción global de la síntesis es la siguiente (Wakil y Gibson, 1960):



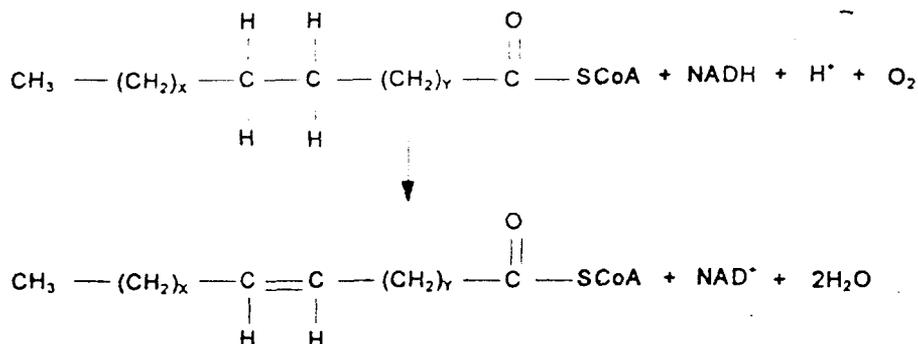
De las ocho unidades de acetilo que se requieren, solo una de éstas es aportada por el acetil-CoA las siete restantes las aporta el malonil-CoA, que a su vez es formado por una reacción de carboxilación entre el acetil-CoA y los iones  $\text{HCO}_3^-$ . Un resto de acetilo y siete de malonilo experimentan pasos sucesivos de condensación con liberación de siete moléculas de bióxido de carbono, para formar el ácido palmítico. El poder reductor proviene del NADPH. La molécula de acetil-CoA requerida para el proceso sirve de iniciador, los dos átomos de carbono de su grupo acetilo se convierten en los átomos terminales de los carbonos terminales del ácido palmítico formado. El crecimiento de la cadena comienza en el grupo carboxilo del acetil-CoA y continúa por la adición sucesiva de restos de acetilo al extremo carboxilo de la cadena de crecimiento. Cada resto de acetilo sucesivo procede de dos de los tres átomos de carbono de un resto malónico que penetra al sistema en forma de malonil-CoA, el tercer carbono no esterificado se pierde en forma de bióxido de carbono (Walker y Woodbine, 1976)

### B. Elongación de la cadena de ácidos grasos

El ácido palmítico es el precursor de los ácidos grasos de cadena más elongada, ya sean saturados o insaturados, mediante la intervención de elongasas y desaturasas. Los elongasas se hallan presentes tanto en la mitocondria como en el retículo endoplasmático, pero los mecanismos de elongación en ambos sitios son diferentes (Voet y Voet, 1990). La elongación en las mitocondrias se produce por adición sucesiva y reducción de unidades de acetilo en una inversión de la oxidación del ácido graso, y finalmente una reducción en la que interviene el NADPH como coenzima redox terminal (Walker y Woodbine, 1976). La elongación en el retículo endoplasmático ocurre por la condensación sucesiva de la malonil-CoA con la acil-CoA. Estas reacciones van seguidas cada una por reducciones asociadas al NADPH, semejantes a las catalizadas por el ácido graso sintetasa, la única diferencia consiste en que el ácido graso resulta alargado en forma de su derivado CoA en lugar de su ACP (Voet y Voet, 1990).

### C. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados se producen por la acción de desaturasas terminales (Erwin y col., 1964), estas enzimas contienen hierro en su estructura y catalizan la siguiente reacción:



Donde  $x$  es cinco por lo menos, y  $(\text{CH}_2)_x$  puede contener uno o más enlaces. La porción  $(\text{CH}_2)_y$  del sustrato está saturada. Los enlaces dobles se insertan entre los dobles enlaces existentes en la porción  $(\text{CH}_2)_x$  del sustrato y el grupo CoA de tal modo que en el nuevo enlace se hallan tres átomos de carbono más próximos al grupo CoA que el doble enlace siguiente (no está conjugado a cualquier enlace existente). En esta compleja reacción la transferencia electrónica implica una cadena transportadora de electrones del microsoma, que porta electrones desde el NADPH (o NADH) al citocromo b5 microsómico por medio del citocromo b5 reductasa (flavoproteína). Para activar el acil-CoA y el oxígeno se requiere de una proteína denominada factor cianuro-sensible. En los microorganismos el citocromo b5 no participa, sino que está sustituido por una proteína ferrosulfurada (Voet y Voet, 1990).

Los ácidos grasos polinsaturados son producidos por una amplia gama de hongos y células eucariotas. Los hongos y las algas verdes-azules sintetizan fundamentalmente ácido linolénico en forma de  $\alpha$ -linolénico, y en algunos casos el ácido  $\gamma$ -linolénico (Shaw, 1966; Levin y col., 1964).

#### D. Bioconversión del ácido $\alpha$ -linolénico en ácido jasmónico

Se ha confirmado que la biosíntesis del AJ ocurre a partir de la bioconversión del ácido  $\alpha$ -linolénico y por la acción de cuatro enzimas: lipoxigenasa, hidropéroxido deshidratasa, óxido aleno ciclasa y reductasa (Zimmerman y Feng, 1978; Vick y Zimmerman, 1984, 1986, 1987; Hamberg, 1988). En la figura 1.5 se presenta la ruta biosintética del AJ. La reacción inicial en la síntesis del AJ es catalizada por la enzima lipoxigenasa, la cual es muy común en los tejidos en las plantas.

La enzima lipoxigenasa cataliza la incorporación de oxígeno molecular en ácidos grasos polinsaturados para formar un sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno. Para el caso del  $\alpha$ -ácido linolénico la enzima cataliza la incorporación de oxígeno en las posiciones C-9 y C-13, y para la formación del AJ, esta reacción ocurre únicamente en la posición C-13, produciendo el ácido 13-hidropéroxilínolénico, que es transformado rápidamente a un derivado óxido aleno denominado ácido 12,13-epoxilínolénico por la acción del hidropéroxido deshidratasa.

El ácido 12,13-epoxilínolénico sufre una ciclización por la óxido aleno ciclasa, al ácido 12-oxofitodienoico, que satura su doble enlace por la enzima reductasa produciendo el ácido 10,11-dihidro-12-oxofitodienoico.

Finalmente, 6 carbonos del ácido 10,11-dihidro-12-oxofitodienoico son eliminados del enlace carboxilo por una  $\beta$ -oxidación en 3 etapas sucesivas para dar el (+)-7-isoAJ, el cual rápidamente se isomeriza a (-)-AJ, resultando un equilibrio molar de alrededor de 9:1 ((-)-AJ:(+)-7-isoAJ). Esta ruta metabólica se ha demostrado que ocurre en los frutos inmaduros, cotiledones de semillas germinadas y hojas de plantas superiores. En *B. theobromae* sólo se encontró el (+)-7-isoAJ como único producto biosintético nativo, mientras que en los frutos de *Vicia faba* la relación molar AJ:(+)-7-isoAJ es de 2:1 (Sembdner y Parthier, 1993).

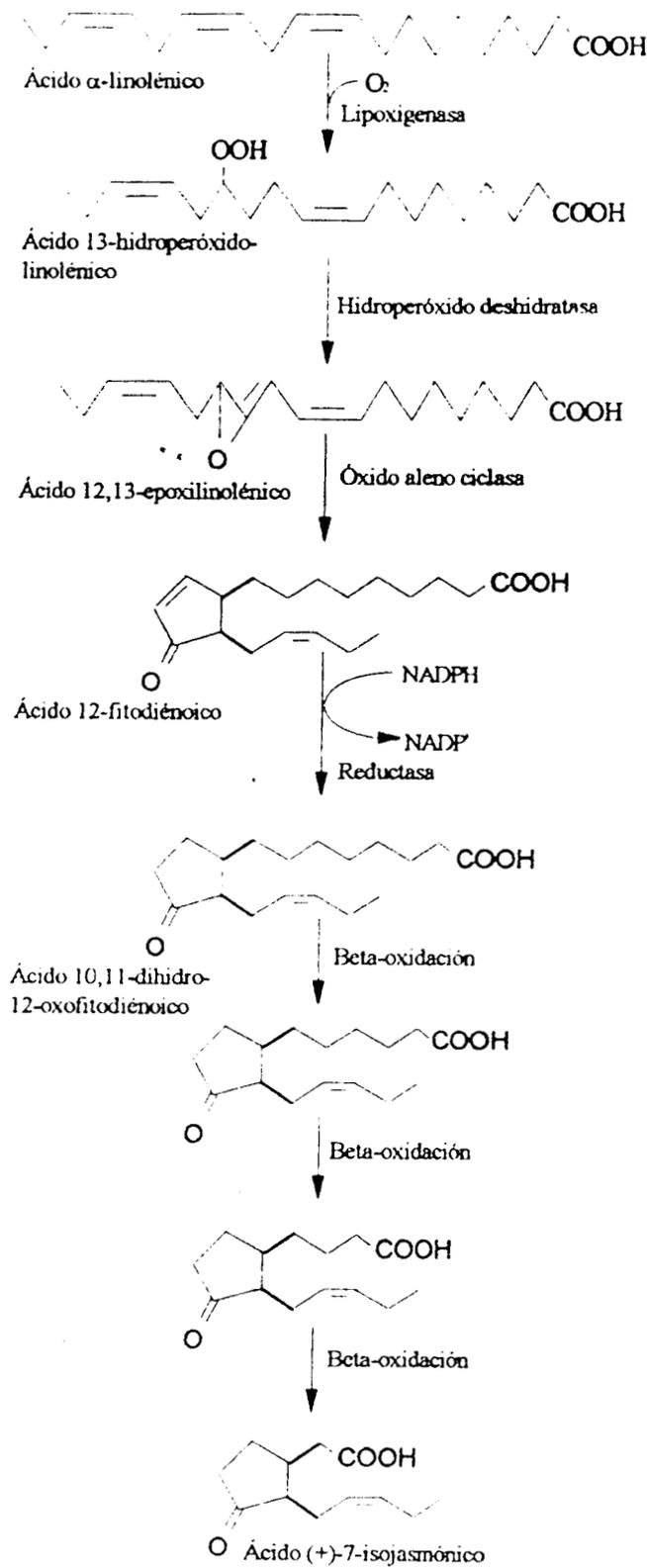


Figura 1.5. Ruta biosintética del ácido (+)-7-isojasmónico (Fuente: Vick y Zimmerman, 1984, 1986)

#### **1.1.4 Actividad biológica de los jasmonatos**

La actividad biológica de los RCV está determinada por el efecto fisiológico que provocan en las plantas, ya sea inhibición o estimulación de alguna función. La aplicación exógena de los jasmonatos ejerce varios efectos, inhibiendo o promoviendo cambios morfológicos y fisiológicos, como son: la inducción de la síntesis de proteínas, la síntesis de sustancias de defensa, la estimulación de la formación de tubérculos, la inhibición del crecimiento y la estimulación de la senescencia, entre otras. También se ha podido apreciar efectos estimulatorios en otros procesos, como en la biosíntesis del etileno, la maduración de frutos, la senescencia de las hojas y la - disrupción de microtúbulos, y efectos inhibitorios en el crecimiento longitudinal de las semillas, raíces, hongos micorrízicos, en la biosíntesis de carotenoides, en la abertura del pulvinilo, entre otras.

Como se aprecia, los jasmonatos producen una gama amplia de respuestas fisiológicas en las plantas, lo cual le confiere una gran versatilidad a este grupo y la posibilidad utilizarlos para diversos fines en la agricultura. En términos generales se puede decir que los cambios morfológicos y fisiológicos que más se han estudiado son el de fitohormona, la inducción de la síntesis de proteínas y sustancias de defensa en las plantas y la estimulación de la formación de tubérculos. A continuación se describen estos factores.

##### **A. Fitohormonas**

Las fitohormonas son compuestos producidos por las plantas y en bajas concentraciones influyen sobre los procesos fisiológicos de éstas (Davies, 1987). En este sentido los jasmonatos se pueden considerar como fitohormonas, pues estos compuestos son producidos por las plantas (se han encontrado en 150 familias y 206 especies de plantas, incluyendo hongos, musgos y helechos) (Salisbury y Ross, 1992); también se ha podido demostrar que estos compuestos inhiben el crecimiento de ciertas partes de las plantas (Sembdner y Gross, 1986; Yamane y col., 1980; Dathe y col., 1981; Koda, 1992; Hamber y Gardner, 1993) y promueven la senescencia de las hojas (Ueda y Kato, 1980; López y col., 1985; Hamberg y Gardner, 1992; Porat y col., 1993). Se ha

observado además que el AJ provoca efectos fisiológicos sobre las plantas similares a los del ácido absicico (ABA) (Yamane y col., 1981a; Ueda y col., 1991).

La inducción de la senescencia de las hojas por los jasmonatos en plantas se caracteriza por la degradación de la clorofila, acompañada de otros efectos tales como el incremento de la respiración celular, actividad proteasa y peroxidasa, reducción de la actividad fotosintética, etc, (Parthasarathy, 1990; Koda, 1992;).

Durante el curso de investigaciones con giberelinas en semillas inmaduras de *Phaseolus vulgaris*, Yamane y col. (1980) encontraron en las semillas estudiadas la presencia de compuestos inhibidores que retardaban el crecimiento en los ensayos con plántulas de arroz. Estos inhibidores fueron aislados e identificados como el ABA y el AJ.

Ueda y Kato (1980) encontraron que un extracto de tallos de ajeno (*Artemisia absinthium L*) contenía un compuesto que estimulaba la senescencia de los segmentos en hojas de avena y fue identificado como el AJ-Me. También se reportan la presencia de ABA y el AJ como promotores de la senescencia de las hojas de avena (*Cleyera acmaceae*).

El efecto del AJ-Me en segmentos de cebada, demuestra que este compuesto es un potente promotor de la senescencia, no solamente en la oscuridad sino también en presencia de luz. Se ha comprobado que una solución de 45  $\mu\text{M}$  de AJ-Me elimina completamente la acción de la luz y su efecto es mayor que el del ABA (Ueda y Kato, 1981). Trippi y Thimman (1983) encontraron que este compuesto es de 2 a 4 veces más potente que el ABA en cuanto a la promoción de la senescencia.

Se ha encontrado (López y col., 1985) que el AJ y el AJ-Me inhiben el crecimiento de los callos de soya inducido por quinetina y urea. En este caso, el AJ es más efectivo, produciendo una inhibición en un 50 a 60 % del crecimiento de los mismos.

### **B. Inducción de síntesis de proteínas**

Se ha reportado que el AJ y AJ-Me son capaces de inducir la síntesis de algunas proteínas en las plantas. Anderson (1988) encontró que concentraciones de AJ de  $2 \times 10^{-6}$ - $3 \times 10^{-5}$  M incrementan el nivel de polipéptidos en callos de soya. Estudios posteriores de Anderson y col. (1989) en hojas

de soya señalan que la aplicación de AJ incrementó la concentración de los péptidos de 30 kDa y 28 kDa. Ambos péptidos fueron identificados como proteínas de almacenamiento vegetativo (PAV) el incremento observado resulta característico del AJ, pues otras fitohormonas como el ABA, ácido giberélico, benciladenina no alteran la concentración de PAV (Staswick y col., 1991).

Estudios desarrollados por Mason y Mullet (1990), en los cuales adicionaron  $5 \times 10^{-6}$  M de AJ-Me en plantas de soya permitieron observar el incremento de la concentración de PAV, especialmente en las raíces maduras y en los tejidos del tallo. También se observaron estos efectos en plantas de soya que presentaban heridas.

Weidhase y col., (1987) trataron hojas de avena con AJ y AJ-Me en soluciones acuosas de  $4.5 \times 10^{-5}$  M durante 4 días y observaron la formación de proteínas que no se presentaban al tratar las hojas de avena con agua destilada. A estos compuestos se les denominó proteínas inducidas por jasmonatos (PIJ). Trabajos posteriores permitieron demostrar que las PIJ se encontraron en todas las plantas estudiadas (Sembdner y Parthier, 1993), sin embargo, las funciones de estas proteínas han sido poco estudiadas, a excepción de las proteínas de almacenamiento y las de defensa.

### C. Inducción de defensa química

Se conoce que la activación de genes en las plantas por el ataque de patógenos o por heridas mecánicas provoca la síntesis de sustancias de defensa como el inhibidor de proteasas en las zonas dañadas (Cohen y col., 1993; Xu y col., 1993). Farmer y Ryan (1990) reportan la acumulación del inhibidor de proteasas por la aplicación de AJ-Me en plantas de tomate. La alfalfa y el tabaco responden positivamente a la exposición del AJ-Me para acumular sus respectivos inhibidores de la tripsina en las hojas. Yamagishi y col. (1993) señalan que la adición de AJ a tubérculos de papa estimulan la formación del inhibidor de la proteasas. Recientemente se ha demostrado que los precursores biosintéticos del AJ, como el ácido  $\alpha$ -linolénico, también inducen al inhibidor de las proteasas en hojas de tomate de forma similar al AJ y AJ-Me. Se ha observado además que la exposición de cultivos de células a preparados de la pared de levadura

incrementó la velocidad de formación de AJ y AJ-Me y estimuló la síntesis de otros metabolitos secundarios (Kauss y col., 1992).

Los jasmonatos también pueden jugar un papel directo de defensa de las plantas, por ejemplo se ha demostrado que la aplicación de AJ en plantas de arroz inhibe la germinación de esporas de *Pyricularia oryzae*, hongo que provoca la enfermedad conocida como tizón del arroz (Hamberg y Gardner, 1992).

#### D. Formación de tubérculos

Se ha reportado que los jasmonatos inducen la formación de tubérculos en plantas de ñame, *Discorea spp* (Koda y Kikuta, 1991), girasol tuberoso, *Helianthus tuberosus* (Koda y col., 1994) y papa (Koda, 1992). Koda y col. (1994) señalan que la sustancia inductora de tubérculos en hojas de papa es el  $\beta$ -D-glucósido del ácido tuberónico. También se reporta que el AJ es efectivo para inducir tubérculos en papa, pero que se necesita una mayor concentración comparado con el glucósido del ácido tuberónico (Pelayo y Mingo, 1991). Igualmente el AJ-Me es inductor de tubérculos. Los estudios de la actividad inductora de tubérculos revelan que el AJ puede regular la diferenciación de tejidos. La tuberización ocurre por la expansión lateral de la porción subapical del estolón y los procesos pueden ser controlados por la orientación de los microtúbulos. La aparición de los microtúbulos podría estar involucrada en la expansión radial de la célula provocando el efecto de formación de tubérculo en papa (Abe y col., 1990). En este sentido, la aplicación de AJ a meristemas de papa incrementa el número que se desarrolla en los brotes y facilita la eliminación de virus debido posiblemente por el desarrollo de los meristemas (Ravnikar y Gogala, 1990).

#### E. Otros efectos

La inhibición del crecimiento longitudinal en semillas monocotiledóneas y dicotiledóneas por los jasmonatos resultan menos sensible que en el caso del ABA, pero resultan más eficientes en la promoción de la senescencia (Yamane y col., 1980; Dathe y col., 1981).

Se ha comprobado el efecto estimulante del AJ-Me en la formación del etileno (Saniewski y col. 1987a, 1987b) y en la maduración de frutos como jitomate y manzana (Saniewski y col., 1987a; Sanz y col., 1993). Se plantea que esto es debido al incremento de la actividad de su ácido 1-aminociclopropano carboxílico sintetasa o oxidasa, dependiendo de las especies de plantas y la etapa de su desarrollo (Saniewski y col., 1987a).

El AJ y el ABA en concentraciones de  $10^{-5}$  M inhiben la apertura del pulvinulo en *Mimosa pudica* inducida tanto por la luz como por el ácido 3-indol acético, siendo mayor la actividad del AJ (Tsuruni y Ashai, 1985). Cuando ambos se aplican al medio de cultivo básico, inhiben la formación de yemas generativas de tallos florales y de internudos de plantas de tabaco, siendo el AJ más activo.

En general el AJ es altamente activo en concentraciones del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M, siendo también posible la inhibición de la formación de yemas florales y el crecimiento de hongos micorrízicos a una concentración de  $10^{-7}$  M (Barendse y col., 1985; Gogola, 1991).

La aplicación de altas concentraciones de AJ-Me en frutos de tomate estimula la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos, la actividad polifenol oxidasa y en menor medida la actividad peroxidasa (Hamberg y Gardner, 1992). Pérez y col., (1993) también reportan una estimulación de la síntesis de  $\beta$ -carotenos y la degradación de clorofila por la aplicación de AJ-Me en fase vapor (8 ppm) en manzanas.

El AJ, el ácido  $\alpha$ -linolénico y especialmente el AJ-Me son muy efectivos en inducir el efecto de enrollamiento en tijeras en *Bryonia* (Falkestein y col., 1991; Weiler y col., 1993).

Se ha comprobado que a una concentración de 20 mg/l (aproximadamente  $10^{-4}$  M) el AJ produce un efecto inhibitorio en la germinación del polen en plantas de té (*Camellia senensish*), sin embargo, el AJ-Me no muestra este mismo efecto (Yamane y col., 1982; Sembdner y Gross, 1986).

La inhibición de la germinación de las semillas por el AJ se ha descrito en *Agrotenma*, *Avena* y *Lactuca* en un rango de concentración de  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M (Yamane y col., 1981b; Sembdner y Gross, 1986). También se ha observado un efecto estimulante en la germinación de semillas de *Acer tataricum* (Berestetzky y col., 1991) y *Spirodela* (Appenroth y col., 1991) en

concentraciones del orden de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M. Se ha podido demostrar que concentraciones entre  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M estimulan la división celular y la formación de callos en plantas de papa *in vitro*, mientras que concentraciones  $10^{-5}$  M o superiores a esta, pueden causar efectos contrarios y la compactación en el tallo y las raíces (Sembdner y Gross, 1986; Ravnikař y col., 1992). Estos ejemplos demuestran que los jasmonatos pueden inhibir o estimular los procesos fisiológicos en las plantas, pues en dependencia de las concentraciones empleadas, así se manifestará su efecto en las mismas, esto implica que serán necesarios estudios en potencia para conocer las concentraciones óptimas para el aprovechamiento de los mismos en la agricultura. En la tabla 2.1 se presenta un resumen de los principales efectos fisiológicos y morfológicos de los jasmonatos en las plantas.

**Tabla 1.1. Efectos de los jasmonatos en el crecimiento de las plantas y su desarrollo.**

Procesos fisiológicos	Inhibidor (I), Estimulador (E)	Referencias
Crecimiento de las plantas	I	Sembdner y Gross, 1986; Yamane y col., 1980; Dathe y col., 1981; Koda, 1992; Hamber y Gardner, 1993
Crecimiento longitudinal de semillas	I	Yamane y col., 1980; Dathe y col., 1981
Crecimiento de hongos micorrizicos	I	Gogola, 1991
División celular	I/E	Sembdner y Gross, 1986; Ravnikař y col., 1992
Germinación de semillas	I/E	Yamane y col., 1980; Yamane y col., 1981b; Sembdner y Gross, 1986; Appenroth y col., 1991; Berestetzky y col., 1991;
Germinación del polen	I/E	Yamane y col., 1981; Sembdner y Gross, 1986; Appenroth y col., 1991; Berestetzky y col., 1991;
Formación de yemas de flores	I	Barendse y col., 1985
Maduración de frutas (vía etileno)	E	Saniewski y col., 1987a; Sanz y col., 1993
Senescencia de las hojas	E	Ueda y Kato, 1980, 1981; Yamane y col., 1980; Sattler y Thimann, 1981; López y col., 1985; Trippi y Thimann, 1983; Hamberg y Gardner, 1992; Porat y col., 1993
Formación de tubérculo	E	Koda y Kikuta, 1991; Pelacho y Mingo, 1991; Koda, 1992; Koda y col., 1994;
Enrollamiento de tijeras	E	Falkestein y col., 1991; Weiler y col., 1993
Abertura del pulvinilo	I	Tsuruni y Asahi, 1985
Disrupción de los microtúbulos	E	Abe y col., 1990
Biosíntesis de carotenoides	I	Saniewski y Czapski, 1983; Hamberg y Gardner, 1992; Pérez y col., 1993
Degradación de clorofila	E	Weidhase y col., 1987; Ueda y Kato, 1980; Pérez y col., 1993
Biosíntesis del etileno	E	Saniewski y col., 1987a, 1987b
Síntesis de proteínas	E	Weidhase y col., 1987; Anderson, 1988; Anderson y col., 1989; Mason y Mullet, 1990; Staswick y col., 1991; Farmer y Ryan, 1990; Wilen y col., 1991; Sembdner y Parthier, 1993

## 1.2 *Botryodiplodia theobromae*

En este capítulo se presentarán algunas de las características generales de *B. theobromae* en cuanto a su morfología, taxonomía, fisiología, actividad enzimática y producción de metabolitos.

*B. theobromae* es un hongo fitopatógeno de zonas tropicales y subtropicales que causa la putrefacción de una amplia gama de plantas y frutas (Goos y col., 1961; Verma y Singh, 1969; Peterson, 1976; Gabr y col., 1990, Yaguchi y Nakamura, 1992; Husain y col., 1993), también se presenta en las ramas de árboles recién cortados o que presenten heridas (Wardlaw, 1931); y además se encuentra en desechos agroindustriales y en la composta (Stevens, 1941).

La clasificación taxonómica de *B. theobromae* es la siguiente (Stevens, 1941)

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Coelomycetes
Orden	Shaeropsidales
Género	<i>Botryodiplodia</i>
Especie	<i>theobromae</i>

Las colonias de *B. theobromae* cultivadas en medios ricos en glucosa-peptona o dextrosa-papa forman colonias velludas de color verdinegro. Producen conidias de tamaños de 22-33 de largo X 13-15  $\mu$  de ancho y con características longitudinales estriadas, sin embargo las cepas aisladas varían considerablemente en cuanto a las características de crecimiento y esporulación. Muchas de las cepas esporulan lentamente en los cultivos, y algunas producen pocas esporas, aún en cultivos viejos. Algunas de las cepas forman picnidios simples, mientras que otras forman estromatas, los cuales contienen los picnidios (Goos y col., 1961).

### 1.2.1 Fisiología

Goos y col. (1961) reportan que la temperatura óptima para el crecimiento de *B. theobromae* aislada de *Musa spp* se encuentran en un rango de 27-30° C, pero puede crecer entre 15 y 37° C. A 37° C, algunas de las cepas aisladas producen pigmentos de color rojo intenso. El hongo en cultivo superficial crece rápidamente a 27° C y cubre la caja Petri (10 cm de diámetro) en alrededor de 3 días (Goos y col., 1961). Sin embargo, Ogundana y col. (1971) encontraron que el

mínimo, óptimo y máximo para otra cepa de *B. theobromae* aislada de *Dioscorea* fue 10, 26-30 y 40° C, respectivamente. Nwufo (1980) también reporta que *B. theobromae* aislada de *Colocasia* presenta un mínimo, óptimo y máximo de temperatura para el crecimiento de 15, 25-30 y 35° C. Estas diferencias probablemente se puedan explicar en base a las diferencias fisiológicas de las cepas estudiadas.

*B. theobromae* posee una gran capacidad para utilizar los carbohidratos como única fuente de carbono y energía, pues crece rápidamente en presencia de altas concentraciones de almidón y sacarosa. Esto unido a su gran poder de penetración en tejidos vegetales, explica la rapidez con que es capaz de multiplicarse en los frutos y plantas (Wardlaw, 1932).

También se ha podido comprobar que este hongo crece en un rango de pH, de 4 a 10, mostrando una alta adaptabilidad a condiciones adversas para su crecimiento (Gabr y col., 1990; Yaguchi y Nakamura, 1992). Tandon y Srivastava (1963) reportan que el pH óptimo para su crecimiento está próximo al neutro. Sin embargo, Nwufo y Mba (1988) señalan que el pH óptimo para una cepa de *B. theobromae* aislada de *Treculia africana* fue de 3 a 4.

### 1.2.2 Actividad enzimática

Los microorganismos fitopatógenos para crecer e invadir los frutos y plantas, requieren de la habilidad para producir enzimas extracelulares relacionadas con la naturaleza del sustrato a colonizar.

Umezurike (1968) detectó actividad celulolítica en los filtrados de cultivos de una cepa de *B. theobromae* aislada de *Bombax buonopezense* P., al poner partículas de madera de este árbol con los filtrados de los cultivos del hongo, observó la presencia de celobiosa, glucosa y otros azúcares debidos a la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Ekundaya y Oso (1991) reportan actividad amilolítica en los filtrados de *B. theobromae* IMI 282258, señalando que el máximo de producción de la enzima se produce al quinto día a un pH inicial de 4.0. También observaron que la actividad amilolítica y la producción de biomasa de la cepa se incrementa con la concentración usada de almidón en el medio de cultivo.

Recientemente Novaratnam y col. (1996) reportan la formulación de un medio para la producción de glucoamilasa con *B. theobromae* IMI 224891, compuesto por almidón de yuca suplementada con fosfato de amonio, peptona, fosfato de potasio, carbonato de calcio y harina de soya, produciéndose 1950 U/ml de glucoamilasa en frascos agitados a 160 rpm y pH inicial de 6.0 a las 50 horas de fermentación. Estos autores encontraron que es posible recircular la biomasa en cultivos en lote hasta 4 recambios sin pérdidas significativas de la actividad de la enzima.

### 1.2.3 Producción de metabolitos secundarios

Se conoce que *B. theobromae* es capaz de producir aromas como resultado de su metabolismo secundario metabolitos (Krasnobajew (1981); Krasnobajew y Helmlinger, (1982); Yamazaki y col. (1989); Matsumoto y Nago, 1994). Krasnobajew y Helmlinger (1982) realizaron la bioconversión de  $\beta$ -ionona mediante una secuencia de reacciones, fundamentalmente de hidroxilación y oxidación para producir una mezcla de compuestos con aromas a talaco empleando como microorganismo *Lasiodiplodia theobromae* (sinónimo *B. theobromae*). Estos autores encontraron que hasta 10 g de sustrato por litro pueden ser convertidos a los aromas con un 90 % de rendimiento.

Matsumoto y Nago (1994) reportan el aislamiento de una cepa de *L. theobromae* GK-1 a partir de coco, la cual produce R-2-octeno- $\delta$ -lactona en un medio de papa dextrosa agar (PDA) a 25° C y 15 días de fermentación, siendo este compuesto considerado como un aroma a coco.

### 1.3 Producción de ácido jasmónico por fermentación en cultivo líquido

Debido a que existen pocos reportes en la literatura relacionados con los aspectos prácticos de la producción comercial de AJ, la mayor parte de la información está protegida por patentes (Miersch y col. 1984; Thomas y col., 1989; Thomas y col., 1990); a continuación se describen algunos procedimientos generales del cultivo de *B. theobromae* en medio líquido.

### 1.3.1 Medios de cultivos y condiciones de operación

La producción fermentativa de AJ se lleva a cabo en cultivos sumergidos utilizando cepas de *B. theobromae* sobreproductoras de AJ aisladas de fuentes naturales y mutantes de éstas (Miersch y col., 1984). La conservación de la cepa se lleva a cabo en tubos inclinados de malta agar a 4° C. El hongo inoculado en los tubos se hace crecer previamente a 28° C. Con los tubos inclinados se inocula en cajas Petri para la producción de un precultivo, el cual se obtiene después de 48 horas de agitación a 250 rpm y a 28° C (Miersch y col., 1984). Entre los factores que más se han estudiado en la producción del AJ destacan la selección de cepas, el medio de cultivo así como las condiciones de operación óptimas para hacer rentable dicha producción, teniendo en cuenta que este metabolito requiere para su acumulación de períodos largos de fermentación.

Los sustratos comúnmente utilizados como fuente de carbono son harina de soya, pulpa de cítricos, licor de maíz, suero de leche suplementado con harinas de semillas oleaginosas, ya que pueden suministrar fuentes de proteínas, minerales y vitaminas solubles en agua (Thomas y col., 1989). Pero el hecho de emplear medios nutritivos complejos tiene el inconveniente del diseño de procesos de purificación más complejos para algunos campos de aplicación como por ejemplo en la perfumería, pues se requiere la eliminación de compuestos fétidos y alérgicos. (Thomas y col., 1990). Otro inconveniente es que la composición de los mismos no es constante y esto trae como consecuencia que la fermentación resulta difícil de reproducirse. Thomas y col. (1990) proponen un medio sintético a base de sacarosa o glucosa como fuente de carbono y sales minerales como nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, fosfato monobásico de potasio, molibdato de amonio y sulfatos de magnesio, hierro, zinc y cobre. Estos autores proponen que es necesaria sólo una fuente de carbono (glucosa o sacarosa) para la producción del AJ.

La fermentación en lote se lleva a cabo entre 5 a 10 días a una temperatura de 27 y 30° C, y el pH ligeramente ácido entre 5 y 6 (Miersch y col., 1984)

Mierch y col. (1984, 1987) encontraron que *B. theobromae* además del AJ produce otros derivados considerados igualmente como RCV, como son el: ácido (+)-9,10-dihidro-7-isojasmonico, ácido (+)-11,12-didehidro-7-isojasmónico y ácido curcubico, pero el producto principal es el: ácido (+)-7-isojasmónico, pues estos compuestos son productos intermediarios de la síntesis del ácido (+)-7-isojasmónico.

### 1.3.2 Características del método de cultivo

La inoculación se realiza en fermentador o en incubador agitado a 190 rpm y a 30° C y con saturación de oxígeno disuelto en el medio. Se utiliza una relación de inoculación de 0.5 g de biomasa seca por litro de medio. El valor de pH se mantiene constante a 5.5 por la adición de hidróxido de sodio (Thomas y col., 1990).

La agitación en fermentadores aireados es posible sólo hasta ciertas velocidades pues a altas rpm el hongo forma polisacáridos extracelulares en altas concentraciones que influyen de manera muy negativa en la producción del AJ (Thomas y col., 1990)

Para el aislamiento y purificación del AJ primeramente se debe proceder a la separación de la biomasa por centrifugación, y luego a la extracción con solventes orgánicos (éter, cloroformo, acetato de etilo). El método utilizado para separar el AJ en una primera etapa es la cromatografía de columna empleando silicagel como soporte y cloroformo:acetato de etilo como solución eluyente, y en una segunda etapa una cromatografía preparativa HPLC y como soporte RP 8 y fase móvil de MeOH:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (60:40:0.1) con flujo de la fase móvil de 2 ml/min (Miersch y col., 1984, Miersch y col., 1987, Miersch y col., 1989). El método más común para su detección en el medio de cultivo es por radioinmunoensayo o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Knofel y col., 1984, 1990; Koda, 1992)

La acumulación de AJ ocurre normalmente en la fase tardía del crecimiento logarítmico o al iniciar la fase estacionaria. Los niveles de producción de este RCV son cercanos a los 800 mg/l (+)-7-isoAJ en 10 días de fermentación (Thomas y col., 1990).

Los estudios realizados por Miersch y col (1984, 1987, 1989), Thomas y col. (1990) de producción de AJ constituyen un punto de partida para posteriores investigaciones, pues se requiere de estudios básicos sobre el efecto de factores fisiológicos y nutricionales (rC/N, la adición de precursores al medio de cultivo y vitaminas), genéticos, así como de las condiciones de operación en reactores para su escalado a nivel industrial como son pH, agitación, temperatura, oxígeno disuelto, tipo de fermentador, separación, entre otras. Otro aspecto de vital importancia que se requiere estudiar y el cual no ha sido abordado hasta el momento son los mecanismos que regulan la síntesis de este metabolito, ya que el conocimiento de los mismos podría establecer los

pasos encaminados a la sobreproducción del AJ, así como para la obtención de otros metabolitos secundarios.

#### **1.4 Producción de metabolitos secundarios por fermentación en medio sólido**

La fermentación en medio sólido (FMS) ha sido empleada desde la antigüedad para diferentes aplicaciones como son la producción de alimentos fermentados, el ensilaje y el composteo de residuos agrícolas y humanos. En los últimos 20 años se ha evidenciado un interés creciente por este tipo de cultivo, por la diversidad de aplicaciones potenciales que ha adquirido y además por el incremento de las ventajas y la superación de muchas de sus desventajas.

Se conoce una gran diversidad de metabolitos secundarios, principalmente producidos por hongos filamentosos y ciertas bacterias, con usos en la industria farmacéutica, agropecuaria y de alimentos (Johns, 1992). Se ha demostrado que la FMS es un método con gran potencial para producir ventajosamente metabolitos secundarios en relación a la fermentación en medio líquido o sumergida (Hesseltine, 1977b; Lin y Iiluka, 1982; Kumar y Lonsane, 1987) en la actualidad se han obtenido antibióticos y promotores de crecimiento utilizando técnicas de FMS (Barrios y col., 1993; 1995, Kumar y Lonsane, 1987).

Dado que el AJ es un metabolito secundario de amplios usos en la agricultura, que es producido por un hongo filamentoso. Considerando la potencialidad de la FMS respecto a la fermentación en cultivo líquido, se estima oportuno iniciar los estudios de síntesis de este metabolito y evaluar este tipo de cultivo.

En este capítulo se presenta la definición de FMS, las ventajas y desventajas de la FMS para la producción de metabolitos secundarios, una breve discusión acerca del metabolismo secundario, y además ejemplos de metabolitos secundarios producidos por FMS. Finalmente se analizan el patrón cinético y los aspectos fisiológicos de la producción de metabolitos secundarios por FMS.

#### 1.4.1 Definición de fermentación en medio sólido

222264

El término de fermentación en medio sólido (FMS) ha sido definido por diferentes autores como el crecimiento y el metabolismo de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia de agua libre (Raimbault, 1980; Moo-Young y col.; 1983). Una definición más amplia que la anterior se debe a Lonsane y col. (1985) donde se señala que la FMS es un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida y en ausencia de escurrimiento de agua. La matriz sólida puede ser un sustrato húmedo o un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes disueltos en una solución. Gutiérrez-Rojas, (1995) define la FMS como la fermentación en medios de cultivo donde el agua necesaria no se encuentra en exceso y los cultivos se desarrollan en su mayoría en presencia de oxígeno en forma gaseosa y de forma controlada. De acuerdo a estas definiciones en la FMS el material húmedo puede cumplir con la función de ser sustrato (fuente de carbono y energía) o ser inerte, lo cual presupone que el sustrato y demás nutrientes se absorberán en este material. (Raimbault y col.; 1989).

#### 1.4.2 Ventajas y desventajas de la FMS para la producción de metabolitos secundario

Las ventajas y desventajas de la FMS sobre el cultivo sumergido han sido discutidas por algunos autores como Hesseltine (1977a) y Cannel y Moo-Young, (1980):

- a) La morfología miceliar de la mayoría de los microorganismos asociados a la producción de metabolitos secundarios (hongos filamentosos y actinomicetos) se adaptan muy bien al crecimiento invasivo en el sustrato sólido.
- b) La morfología miceliar es responsable de dificultades en el escalamiento del cultivo sumergido, como son la alta viscosidad, formación de fluidos no-newtonianos y la presencia de espuma; alto consumo de energía para el mezclado y transferencia de oxígeno, además la adición de antiespumantes reduce la eficiencia de la transferencia de oxígeno y puede contribuir a dificultades adicionales en la recuperación del producto.
- c) En muchos casos la formación del metabolito secundario está más favorecida en la FMS (Hesseltine, 1977b; Lin y Liluka, 1982; Kumar y Lonsane, 1987), que en el caso del cultivo sumergido.

d) En algunos casos el producto final es requerido en forma sólida y no es necesario realizar otros tratamientos para la recuperación del producto, por ejemplo: la producción de antibióticos para la alimentación animal (Johns, 1992).

e) Los costos de producción aparentemente son menores (Lonsane y col., 1985).

f) Se obtienen los productos más concentrados con lo que se pueden emplear bioreactores con volúmenes de operación relativamente pequeños.

g) Los productos de la fermentación pueden extraerse fácil e inmediatamente por adición directa de solventes.

h) Al utilizarse bajas cantidades de agua, se generan pocos efluentes contaminantes.

A pesar de estas ventajas de la FMS el uso de procesos de fermentación por lote o lote alimentado en cultivos sumergidos para la producción de metabolitos secundarios se ha impuesto en la práctica industrial debido a las siguientes razones (Johns, 1992):

a) La relativa facilidad del escalamiento de los procesos en cultivos líquidos, mientras que para los procesos por FMS se necesitan de un desarrollo tecnológico considerable para que el proceso sea factible de escalarse.

b) La mayor homogeneidad de los sistemas líquidos y el uso de sustratos solubles.

c) En los cultivos líquidos se obtiene un buen control y registro de los parámetros que controlan el proceso (como son la biomasa, la concentración de los nutrientes, la temperatura, el pH, etc); los cuales influyen sensiblemente en la producción de los metabolitos secundarios, mientras que en la FMS estas variables son difíciles de controlar y algunas, como la biomasa, son difíciles de cuantificar por estar enlazada al soporte o al sustrato.

e) En la FMS se presentan problemas en la transferencia de calor y masa, que conducen al establecimiento de gradientes de temperatura, humedad, pH, sustratos, aireación, etc.

### 1.4.3 Metabolismo secundario

Es conocido que en la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos ocurre un metabolismo intenso, donde los microorganismos replican rápidamente sus componentes celulares, como prerequisite para el crecimiento y la división celular. A los metabolitos asociados con esta etapa, comúnmente se le denominan metabolitos primarios como los aminoácidos, carbohidratos, lípidos y nucleótidos. La fase estacionaria de crecimiento de algunos microorganismos también se detecta una etapa en la que se forma una gran variedad de compuestos orgánicos, los cuales, a diferencia de los metabolitos primarios, no juegan un papel metabólico importante durante la fase exponencial del crecimiento, estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios.

Existe una amplia variedad de estructuras químicas de metabolitos secundarios producidos por microorganismos, los cuales se pueden agrupar en familias dependiendo de su origen biosintético. Rose (1979) los clasifica de acuerdo a los precursores de los constituyentes celulares en:

- a) acetil-CoA y compuestos relacionados, incluyendo los intermediarios del ciclo de Krebs
- b) aminoácidos
- c) azúcares y
- d) terpenos.

Luckner (1986) señala además de las familias anteriores, los metabolitos procedentes de los monómeros de los ácidos nucleicos como la cafeína, el formicin, entre otros.

El metabolito secundario se acumula cuando finaliza la fase rápida de crecimiento o metabolismo primario, esta fase inicial fue denominada por Bu'Lock y col., (1974) como tropofase, la etapa siguiente donde se desarrolla el metabolismo secundario, le denominó idiofase y al metabolito secundario producido, idiolito.

La producción de metabolitos secundarios se inicia cuando uno o más nutrientes clave se agota, limitando el crecimiento (Demain, 1972; Bu'Lock, 1974; Luckner, 1986).

A pesar de que los hongos filamentosos crecen de manera diferente en cultivos líquido que en medio sólido, los procesos de FMS para la producción de metabolitos secundarios siguen el patrón cinético de crecimiento, utilización de sustrato y formación de producto característica de los cultivos sumergidos. Este comportamiento ha sido observado para la producción de

pigmentos, aflatoxina B1 (Silman y col., 1979), ocratoxina A (Lindenfelser y Ciegler, 1975), y ácido giberélico (Kumar y Lonsane, 1987).

La FMS es a menudo caracterizada por ser un proceso cinético lento. Sin embargo, los procesos para la obtención de muchos metabolitos secundarios son muy similares a los típicos obtenidos por cultivo sumergidos (por ejemplo: de 6 a 10 días). En algunos casos, el tiempo para la formación del metabolito secundario es considerable. Por ejemplo para la producción de deoxinivalenol por *Fusarium graminearum* se requieren de 60 días (Greenhalgh y col., 1983).

En la tabla 2.2 se presentan algunos ejemplos de metabolitos secundarios producidos por FMS.

**Tabla 1.2. Metabolitos secundarios obtenidos por FMS**

Producto	Sustrato	Microorganismo	Rendimiento (mg/g)
<b>TOXINAS</b>			
Aflatoxinas B1	maíz	<i>Aspergillus flavus</i>	5.7
	arroz	<i>Aspergillus flavus</i>	1
Ocratoxina A	trigo	<i>Aspergillus ochraceus</i>	4
Ácido ciclopizónico	trigo rojo	<i>Aspergillus flavus</i>	1.6
Malformin C	trigo blanco	<i>Aspergillus niger</i>	0.369
Citocalasina E	cebada	<i>Aspergillus clavatus</i>	0.035
Ciclocloratina	trigo rojo	<i>Penicillium islandicum</i>	0.021
Deoxinivalenol	arroz	<i>Fusarium graminearum</i>	177
<b>OTROS</b>			
Penicilina*	bagazo de caña	<i>Penicillium chrysogenum</i>	10.555
Ácido giberélico**	salvado de	<i>Gibberella fujikuroi</i>	0.355
	trigo		
Ácido cítrico	bagazo de caña	<i>Aspergillus niger</i>	110
	manzana	<i>Aspergillus niger</i>	300
Pigmentos	arroz	<i>Monascus purpureus</i>	-
	cebada	<i>Cephalosporium cremonium</i>	0.95
Cefalosporinas	cebada	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	0.30

Fuente: Johns, (1992); \*Barrios y col., 1995; \*\*Kumar y Lonsane, (1987)

Las micotoxinas producidas por hongos han sido muy estudiadas, debido a su toxicidad para las cadenas alimentarias del hombre y los animales. La FMS fue usada por diferentes autores para obtener suficientes cantidades de estos compuestos para estudios de toxicidad e investigar las

condiciones en que se promovían la formación de toxinas en los granos (Lindenfelser y Ciegler, 1975; Hesseltine, 1977a,b; Luk y col., 1977; Silman y col., 1979).

La producción de ácido giberélico por FMS ha sido motivada por el deseo de suprimir la necesidad de la eliminación de células, la cual reporta ser una proporción significativa en el costo del proceso en la recuperación del metabolito empleando el cultivo en sumergido, y el hecho de que los rendimientos son muy bajos, lo cual implica procesos de separación y purificación muy caros (Kumar y Lonsane, 1987).

El hongo *Monascus purpureus* sintetiza una familia de pigmentos, de los cuales, dos poseen color rojo brillante. Este hongo ha sido cultivado en Asia mediante la FMS por muchos siglos para obtener saborizantes y color para alimentos como el arroz rojo, pescados y quesos de soya. Los pigmentos rojos son producidos comercialmente en Japón a partir de *Monascus anka* por cultivo sumergido para su uso en la industria de alimentos.

Un concepto novedoso propuesto por Jermini y Demain (1989) es el crecimiento de microorganismos productores de antibióticos en la producción de alimento animal, para el enriquecimiento proteico del sustrato así como para producir antibióticos *in situ*, tales como el monensin, tilosin y las cefaloporinas.

#### 1.4.4 Aspectos fisiológicos

Los parámetros que más influyen en el proceso de obtención de metabolitos secundarios por FMS son: temperatura, humedad inicial del soporte, aireación, mezclado, selección del soporte y tamaño de partícula.

##### a) Temperatura

En general la temperatura óptima para la producción de metabolitos secundarios en FMS es similar a la del cultivo líquido. Silman y col., (1979) estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de aflatoxina B1 por FMS en un rango de 27 a 40° C. La aflatoxina se produjo en este

rango, pero cesó a 40° C; cuando la temperatura descendió a 32° C la producción de la aflatoxina fue restaurada.

En la FMS la generación de calor por la actividad metabólica de los microorganismos provoca una elevación de la temperatura en el fermentador, creándose un serio problema (Hesseltine, 1987). Este comportamiento se debe a la elevada concentración de sustrato y de microorganismos, el bajo contenido de agua, a la baja conductividad térmica de los materiales y la ausencia de mezclado en los fermentadores estáticos (Moo-Young y col., 1983; Grajek, 1988; Barstow y col., 1988;).

Para eliminar este inconveniente, varios autores han propuesto usar una convección forzada de aire a través del fermentador, otros han utilizado las propiedades refrigerantes de la evaporación del agua para controlar automáticamente la humedad y la temperatura (Gervais y Bazelin, 1986; Barstow y col., 1988; Durand y Cherow, 1988; Saucedo-Castañeda y col., 1990; Gutiérrez-Rojas y col., 1996).

#### b) La humedad inicial del soporte

El control de la humedad inicial del sólido es un parámetro de gran importancia en todos los procesos de obtención de metabolitos secundarios por FMS reportados. La humedad óptima para la obtención de diferentes metabolitos varía ampliamente (Johns, 1992). La producción de toxinas empleando granos de maíz se favorece a una humedad inicial típicamente entre 20 y 40 %. El rango óptimo es amplio, sin embargo, fuera de éste, el rendimiento y velocidad de formación de las toxinas es severamente afectado. Por ejemplo, para la producción de aflatoxinas B1 con *Aspergillus flavus* y granos de maíz a una humedad inicial de 18-20 % la velocidad de producción y el rendimiento de la micotoxina disminuyó considerablemente a pesar del crecimiento del hongo, sin embargo, a una humedad inicial entre 20 y 30 % el crecimiento y la formación de la micotoxina se estimuló favorablemente (Silman y col., 1979). Se ha reportado que el contenido de humedad fue identificado como el parámetro que más influye en el rendimiento de las toxinas. Por debajo del valor óptimo, los rendimientos disminuyen significativamente, mientras que a una humedad mayor puede ocurrir contaminación por bacterias (Lindenfelser y Ciegler, 1975)

### c) Aireación

En la FMS, la aireación es un factor que desempeña diferentes funciones como son: el suministro de oxígeno para el crecimiento aerobio y el metabolismo; la regulación de la temperatura y la eliminación de bióxido de carbono y compuestos volátiles.

El efecto de la aireación en la formación de metabolitos secundarios por FMS ha sido sujeto de pocos estudios. Los estudios más relevantes han sido desarrollados por Silman y col. (1979). Estos autores reportan que el incremento en el flujo de aire suministrado a los granos de maíz inoculados, incrementan la velocidad de producción de aflatoxina y el rendimiento. Sin embargo, para la producción de ocratoxina A en biorreactores rotatorios el rendimiento se reduce al incrementar la aireación del sistema (Lindenfelser y Ciegler, 1975).

### d) Mezclado

La extensión del mezclado o agitación en la FMS es dependiente del tipo de biorreactor empleado. Aunque el mezclado del contenido del reactor es deseado para un buen mezclado del inóculo, para ayudar a la transferencia de calor, la agitación tiene varias desventajas incluyendo el cizallamiento el cual daña el microorganismo e incrementa los requerimientos de energía. En la FMS el mezclado generalmente puede incrementar los rendimientos de metabolitos secundarios comparados con los cultivos en estáticos. La producción de la mayoría de las micotoxinas preferentemente se realiza en frascos agitados comparados con los cultivos estacionarios. Luk y col. (1977) encontraron que los cultivos agitados de trigo producían 10 veces más de ácido ciclopizónico que en cultivo estático. Hesseltine (1977a,b) logró incrementar la producción de aflatoxina en matraces con arroz inoculado y agitados a 200 rpm obteniendo concentraciones de hasta 1.5 g de aflatoxina/Kg. Hesseltine (1977a,b) señaló que el mezclado permite una efectiva distribución del inóculo de esporas, el mantenimiento de la homogeneidad y prevención de la formación de "pellets", el mejoramiento de la aireación y facilita la transferencia de calor.

Otra explicación fisiológica a este comportamiento es el hecho de que posiblemente la agitación elimina la esporulación, pues se plantea que la esporulación ocurre al mismo tiempo en que se produce el metabolito, compitiendo por intermediarios y sustratos (Johns, 1992)

e) Selección del soporte

Una gran variedad de materiales pueden ser utilizados como sustratos en la FMS, variando ampliamente su estructura y composición (Johns, 1992). Pueden emplearse los materiales del tipo celulósico (bagazos, cáscaras de frutas, pajas, pulpa de café, etc) y los amiláceos (papa, plátano, yuca y otros desperdicios, entre otros). En los materiales del tipo celulósicos el contenido de celulosa no se encuentra disponible fácilmente para utilizarse directamente por vía fermentativa, por lo tanto se requiere de un tratamiento previo del material, los materiales amiláceos también requieren de pretratamientos menos drásticos. Los granos también pueden ser utilizados por ejemplo: arroz, trigo, cacahuates y salvados de trigo y arroz. Pueden emplearse por separado o por una combinación de ellos. La selección del soporte se realiza después de diferentes ensayos con varios de ellos (Johns, 1992).

f) Tamaño de partícula

Hesseltine (1977a,b) señaló el tamaño de partícula como una de las variables principales para el desarrollo de un proceso por FMS. Los tamaños de partículas pequeños reportan una gran área superficial para el desarrollo microbiano, para la transferencia de calor e intercambio de gases, y además mayores concentraciones superficiales de los nutrientes y vías más cortas para la difusión de los nutrientes tanto en la superficie como en los poros del sustrato (Mudgett, 1986); sin embargo, también el tamaño muy pequeño de las partículas puede incrementar la densidad de empaque, resultando un aumento en la producción de calor por unidad de volumen y mayor dificultad para proveer de aireación a través de la masa sólida.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los RCVe juegan un papel muy importante en el crecimiento de las plantas y en la agricultura de hoy en día, debido a que estas sustancias pueden producir efectos beneficiosos al hombre, alcanzando un importancia tan grande o mayor que los plaguicidas y fertilizantes convencionales (Gross y Parthier, 1994; Larque-Saavedra y Reyes, 1988).

El AJ y sus derivados constituyen un grupo nuevo de RCV que ha sido muy estudiado desde el punto de vista de la fisiología de las plantas. A pesar de que estos estudios son muy recientes, se dispone de mucha información de los efectos que provocan el AJ y sus derivados cuando se adicionan de forma exógena a las plantas. Estos factores pueden ser inhibidos o estimulados en dependencia de la concentraciones que sean aplicadas. Esto supone estudios *a posteriori* que permitan determinar las concentraciones óptimas para su aprovechamiento en la agricultura.

La estudios para la síntesis química de estos productos comenzaron hace aproximadamente 10 años, pero aún no se cuenta con una vía óptima que permita la obtención de rendimientos altos.

La obtención del AJ por vía microbiana en cultivo líquido es otra de las alternativas que existe para la producción de este metabolito. En este caso se necesitan de estudios básicos de fisiología, nutricionales y genéticos para la optimización del medio de cultivo y la producción de esta sustancia, así como las condiciones de fermentación y sistema para su escalado a nivel industrial.

Hasta la fecha (1996) sólo se ha utilizado para la producción del AJ el cultivo líquido, pero teniendo en cuenta las ventajas que ofrece la FMS para la obtención de metabolitos secundarios, se considera que es otra alternativa viable para llevar a cabo la producción del AJ con buenas probabilidades de éxito.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

- Estudiar los factores que influyen en la producción de AJ con *B. theobromae* como son: la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales en la cuales se debe desarrollar la fermentación tanto en cultivo líquido como por fermentación en medio sólido.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar cepas de *B. theobromae* con alta capacidad para producir AJ en cultivo líquido.
- Evaluar el efecto de algunos factores ambientales y nutricionales en la producción de AJ en cultivo líquido como son: la agitación, la temperatura, la adición de extracto de levadura y de aceite de soya al medio de cultivo, así como la influencia de la fuente de carbono, nitrógeno y la rC/N.
- Determinar el efecto de diferentes medios de cultivos, la temperatura y el pH sobre la velocidad radial y la densidad de crecimiento de *B. theobromae* en cultivo superficial.
- Evaluar el efecto de algunos factores nutricionales en la producción de AJ por FMS como son: el incremento de la concentración de nutrientes en medio de cultivo, la influencia de la fuente de nitrógeno y la rC/N.

#### 4. HIPÓTESIS

222264

Las hipótesis a probar en el presente trabajo son las siguientes:

H:1 El estudio de la composición del medio de cultivo y de las condiciones ambientales permitirá incrementar de forma significativa la productividad y el rendimiento en la producción de AJ con *B. theobromae*.

H:2 Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece la FMS y las desventajas que presenta el uso del cultivo sumergido para la producción de metabolitos secundarios se puede incrementar la producción de AJ mediante la FMS, con respecto a la fermentación en cultivo sumergido.

Se consideró como supuesto que las cepas seleccionadas para la producción de AJ en cultivo líquido también son las que más producen AJ por FMS.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos

El presente trabajo se llevó a cabo con ocho cepas de *B. theobromae* identificadas como: 1, 1F, 2, 2F, 489, 1119, 1368 y 2434, procedentes de la colección de cepas del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT), La Habana, Cuba.

Las cepas se conservaron en tubos inclinados con medio de extracto de malta agar, EMA (*Merck*) a una temperatura de 4° C y fueron resembradas cada 4 semanas.

### 5.2 Medios de cultivo

Para los estudios de producción de AJ tanto en cultivo líquido como por FMS se utilizó el medio Miersch y col. (1987) modificado según se presenta en la tabla 5.1.

Los experimentos llevados a cabo para los estudios de la fisiología de *B. theobromae* fueron realizados con los siguientes medios: papa dextrosa agar, PDA (*Bioxon*), Czapek (*Bioxon*), extracto de malta agar, EMA (*Merck*), un medio sintético para la obtención de AJ según reportan Miersch y col. (1987) (ver tabla 5.1)

**Tabla 5.1.** Composición de los medios de cultivos, donde: (a) es el medio Miersch y col. (1987) utilizado en los estudios de fisiología de *B. theobromae* y (b): es el medio Miersch modificado empleado en los estudios de producción de AJ por cultivo líquido y FMS

Compuesto	(a) Medio Miersch y col. (1987) (g/l)	(b) Medio Miersch modificado (g/l)
Sacarosa	50.0	50.0
NaNO <sub>3</sub>	0.2	7.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.6
KCl	0.1	0.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	0.03
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001	0.003
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001	0.003
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.001	0.003
Agar bacteriológico	10.0	-
pH	5.5-5.6	5.5-5.6

El pH fue ajustado con NaOH (1 N) con el uso de un potenciómetro Conductronic (modelo pH 20). Todos los medios se esterilizaron durante 15 minutos a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

### 5.3 Estudios de la fisiología de *Botryodiplodia theobromae*

Los ensayos de fisiología de *B. theobromae* se realizaron en cajas Petri de plástico de 85 x 15 mm (*SyM laboratorios*). Se estudió el efecto de la temperatura de incubación, el medio de cultivo y el pH inicial del medio en la velocidad radial de crecimiento (VRC) y la densidad de crecimiento. Para el estudio de la temperatura de incubación se ensayaron cuatro temperaturas: 26, 32, 35, y 40°C y para el pH los siguientes valores iniciales: 5, 5.6, 7, 8, 9 y 10.

#### 5.3.1 Velocidad radial

Para determinar la velocidad radial de la cepa estudiada se realizó la medición de la longitud del radio de la colonia cada 12 horas hasta el momento en que la cepa invadiera toda la caja Petri (de 85 mm de diámetro). Los valores de las pendientes se calcularon en la fase de crecimiento constante, obteniendo de esta manera la velocidad de crecimiento radial en unidades de longitud por tiempo.

#### 5.3.2 Densidad de crecimiento

La densidad de crecimiento es una medida de la cantidad de biomasa (peso seco) que hay en una superficie dada, expresada en mg/cm<sup>2</sup>. La biomasa fue estimada al tiempo final de los experimentos y el procedimiento seguido fue el que se muestra en la figura 5.1.

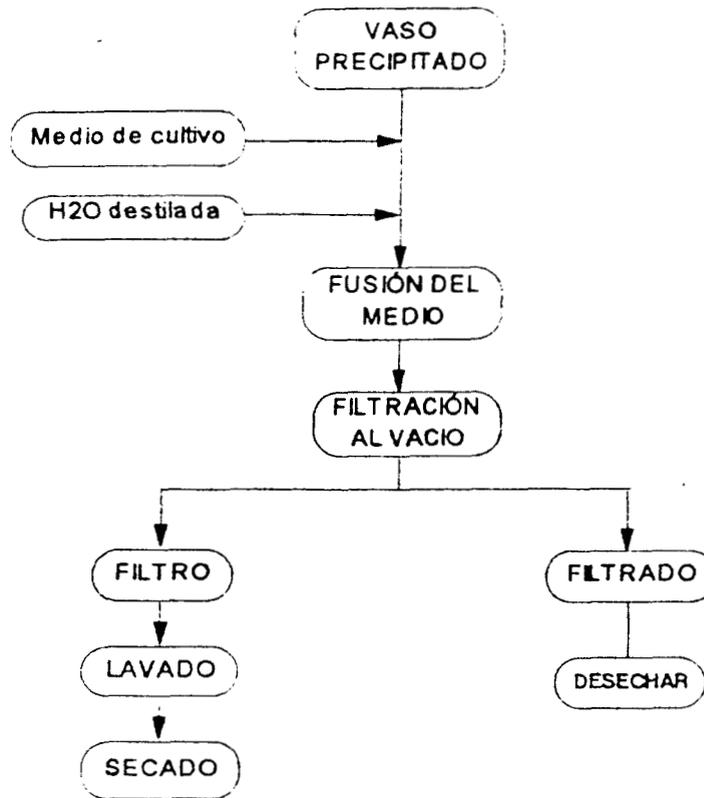


Figura 5.1. Procedimiento seguido para la cuantificación de biomasa por peso seco

El medio de agar crecido se pasa a un vaso de precipitado y se le adiciona 100 ml de agua destilada y se funde el medio calentando a ebullición, seguidamente se filtra a vacío sobre papel de filtro Whatman 41 (previamente secado y tarado) y se lava con tres porciones de agua destilada de 400 ml cada una. Finalmente, el residuo se seca a 60° C por 24 horas, la diferencia entre el peso final y el peso inicial, dividido por el área de la colonia se reporta como densidad de crecimiento.

## 5.4 Condiciones de cultivo para la producción de ácido jasmónico

### 5.4.1 Cultivo líquido

#### A. Inoculación

El inóculo se obtuvo en cultivos superficiales en cajas Petri de plástico (*S* y *M* laboratorios) estériles y desechables de 85 mm de diámetro, conteniendo 25 ml de EMA, inoculados por estria con micelio de *B. theobromae* procedente de tubos inclinados crecidos durante 3 días. Las cajas se incubaron por tres días a 30° C. La inoculación se realizó empleando 5 bocados de 7 mm de diámetro obtenidos a partir de cajas crecidas y con ayuda de un sacabocado estéril, en un erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml de medio de cultivo según se vió en 5.2.

### 5.4.2 Fermentación en medio sólido

La FMS se desarrolló de acuerdo a la metodología propuesta por Raimbault y Alzard (1980) la cual se detalla más adelante.

#### A. Desarrollo del inóculo

El inóculo de *B. theobromae* se obtuvo en cultivos superficiales en matraces erlenmeyers de 250 ml conteniendo 25 ml de EMA. En cada matraz se inoculó con 0.5 ml de una suspensión de esporas obtenidas de un cultivo crecido en tubos inclinados con EMA y se incubó a 30° C. Después de 50 horas de incubación las esporas se colectan adicionando 30 ml de una solución de Tween 80 (0.1 %) con agitación magnética por 10 min.

#### B. Preparación del soporte

Se utilizó como soporte inerte bagazo de caña procedente del central "Emiliano Zapata", Cuernavaca, Morelos. La metodología seguida para el tamizado y lavado del bagazo fue la siguiente: 2 kg del material húmedo se secan a temperatura ambiente y se tamizan (de malla 4), eliminando de esta manera las partículas más gruesas, posteriormente se realizó otro tamizado (mallas de 30 a 20) con el objetivo de eliminar las partículas menores de 0.84 mm y mayores 0.59 mm. Una vez tamizado el bagazo, se le adicionaron 40 l de agua a 45° C y se dejó en reposo por

dos horas, agitando periódicamente. Luego se decantó y se añadió nuevamente agua a 75° C, dejando en reposo por 30 minutos con agitación periódica, repitiendo esta operación 4 veces. Finalmente, el material se lavó con 20 l de agua destilada a temperatura ambiente procediendo de forma similar a los anteriores lavados. El bagazo resultante se prensó y se secó en estufa a 55° C por 3 días. Finalmente al material se le determina la humedad final y se almacena en bolsas de polipapel a temperatura ambiente. La humedad final fue del 4.89 %.

### C. Preparación del medio de fermentación.

El medio de cultivo que se utilizó fue el medio Miersch modificado según se describe en 5.3.1.B. El bagazo una vez tamizado y lavado se pesó y mezcló con un 20 % del total de agua necesaria para obtener la humedad inicial deseada que fue del 70 %. De forma simultánea se pesan la sacarosa y las sales del medio y se mezclan con agua destilada; seguidamente se esterilizan estos medios por separados y se mezclan uniformemente con una suspensión de esporas de *B. theobromae* obtenida según se describe en 5.3.2.A., finalmente se empacan las columnas a una densidad de empaque de 0.3 g/cm<sup>3</sup>. Las columnas poseen un diámetro de 2.1 cm y una longitud de 15 cm.

### D. Desarrollo de la fermentación

En la figura 5.2 se muestra el esquema de los dispositivos utilizados para el desarrollo de los experimentos de fermentación en cultivo sólido.

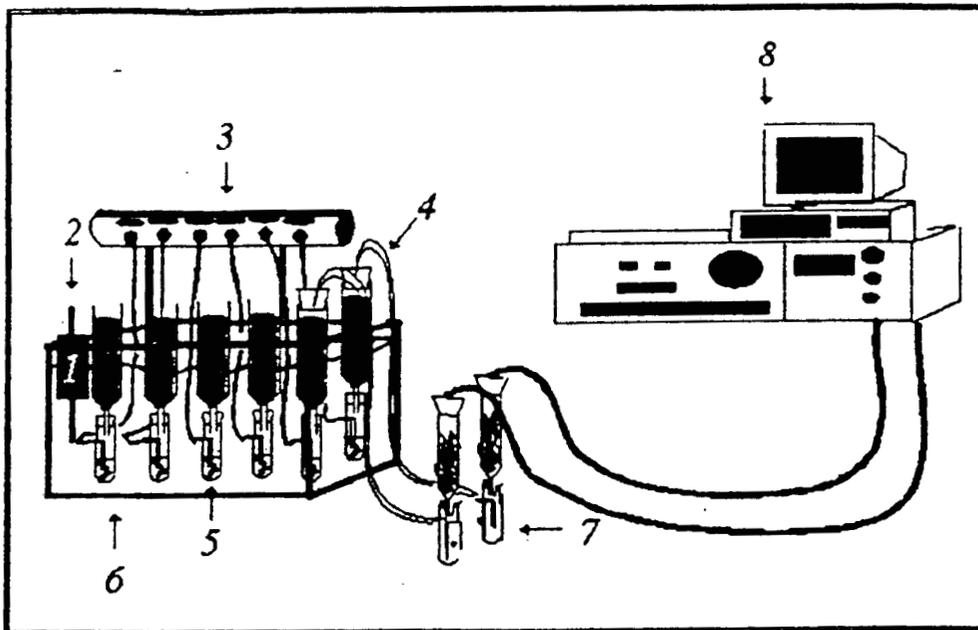


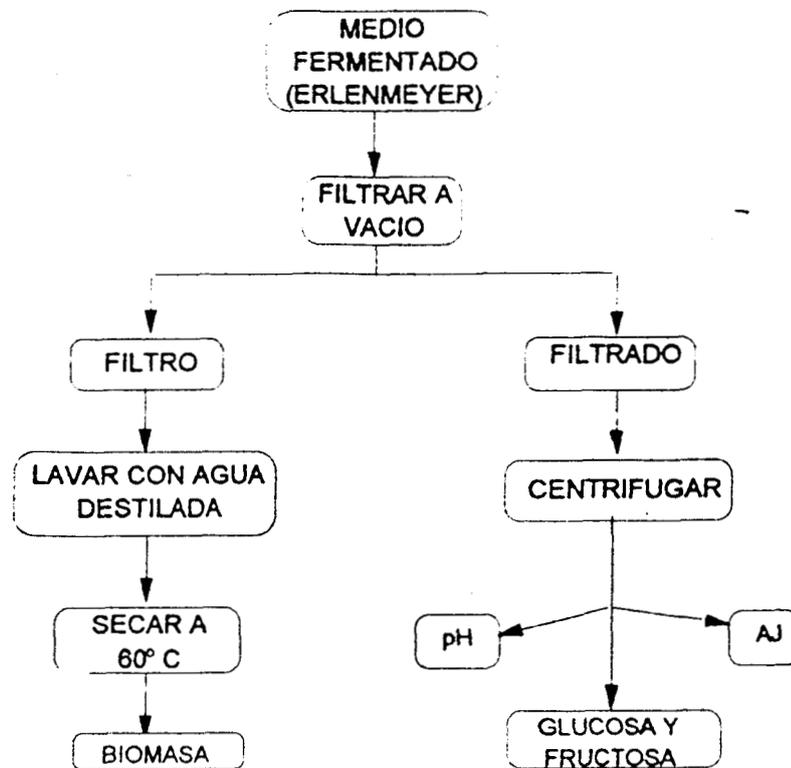
Fig. 5.2. Esquemas de los dispositivos utilizados en la FMS, donde: (1) regulador de temperatura, (2) termómetro, (3) distribuidor de aire, (4) columnas de fermentación, (5) burbujeadores, (6) baño de agua, (7) secadores de aire, (8) cromatógrafo de gases.

Una vez empacadas las columnas, se incubaron en una baño de agua a temperatura controlada a 30° C durante 15 días. Se suministró aire saturado a un flujo de 1 V.Kg.m que corresponden a 1 L de aire por Kg. de materia húmeda por minuto, utilizando un burbujeador colocado en la parte inferior de cada columna, el cual a su vez está conecta a la línea de aire. La salida de dos columnas por cada condición experimental ensayada se conecta a la entrada de un cromatógrafo de gases (GOW MAC) el cual permitió la detección y cuantificación del bióxido de carbono formado y el consumo de oxígeno por *B. theobromae* durante el desarrollo de la fermentación.

## 5.5 Tratamiento de las muestras

### 5.5.1 Fermentación en cultivo líquido

En la figura 5.3 se presenta el esquema de los pasos seguidos para el procesamiento de las muestras obtenidas en el cultivo líquido.



**Figura 5.3.** Procedimiento seguido en el procesamiento de las muestras obtenidas por cultivo líquido.

La muestra se filtra a vacío sobre papel de filtro Whatman 41 previamente secado a 60° C por 24 horas y tarado, el sobrenadante se centrifuga a 4000 rpm durante 40 minutos y se guarda en congelación para realizar los análisis de glucosa, fructosa y AJ; la biomasa separada en el filtro se lava con 3 porciones de agua destilada de 400 ml cada una y se le determinó su magnitud por peso seco según se describe más adelante.

### 5.5.2 Fermentación en medio sólido

En la figura 5.4 se muestra el esquema de los pasos seguidos para el procesamiento de las muestras obtenidas por FMS.

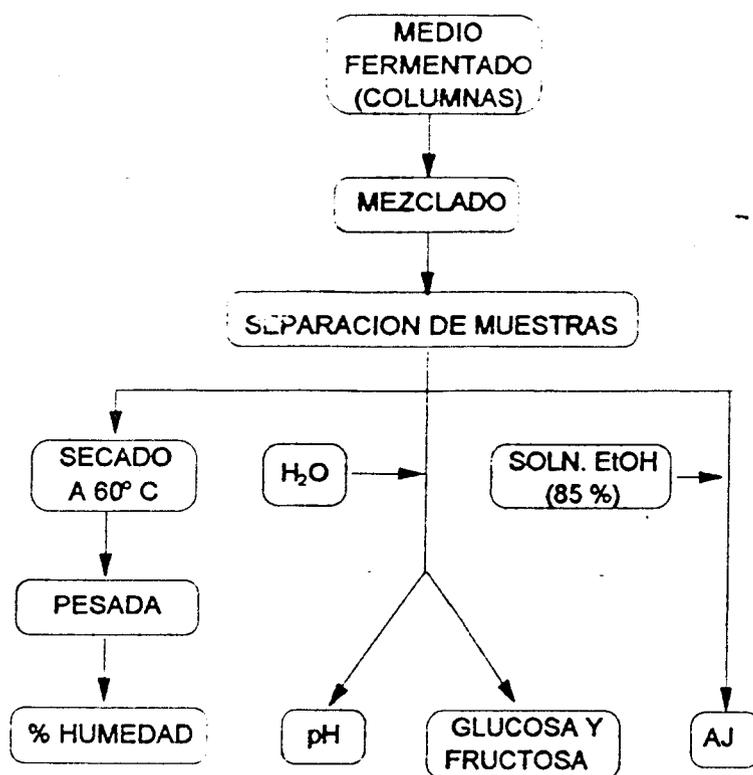


Figura 5.4. Procedimiento seguido para el tratamiento de las muestras obtenidas por FMS.

El medio fermentado contenido en la columna se mezcló de forma homogénea en un recipiente adecuado y se dividió en 3 porciones. La primera de un 1 g de muestra aproximadamente se destina para realizar la determinación de humedad por peso seco, la segunda de 1 g también se le adicionó 10 ml agua destilada para las determinaciones del pH, glucosa y fructosa, y la última de ellas de 10 gramos se destinó para realizar la extracción del AJ, la cual se realizó empleando una solución de etanol al 85 % (v/v), se ajustó el pH a 2.0 con HCl (1 N) y posteriormente se prensó a 2000 PSI; el material sólido se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 4000 rpm durante 40 minutos.

## 5.6 Técnicas analíticas

### 5.6.1 Análisis de muestras de la fermentación en cultivo líquido

#### A. Biomasa por peso seco

El contenido del erlenmeyer se filtra a vacío con papel Whatman 41, y el residuo se seca en estufa a 60°C por 24 horas, la diferencia entre el peso final y el peso inicial, dividido por el volumen de medio fermentado se reporta como la biomasa formada.

#### B. pH

El sobrenadante obtenido en la determinación de biomasa se le mide el pH directamente en un potenciómetro Conductronic pH 20, previa calibración del equipo con buffers de referencia de fosfatos de sodio y potasio de pH 7 y pH 4 (Sigma de México SA de CV).

#### C: Glucosa, fructosa, glicerol y ácido cítrico

Para la detección de glucosa, fructosa, glicerol y ácido cítrico se usó una técnica por Cromatografía de Alta Resolución, HPLC. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer (Binary LC Pump 250) conectado a un detector de índice de refracción Perkin Elmer (LC-30 RI Detector). Se utilizó como fase móvil ácido sulfúrico 30 mM y como precolumna el mismo soporte de la columna empleada. A continuación se presentan las características de la columna utilizada para el análisis de estos azúcares:

Columna:	Phenomenex ROA Organic Acid
Material de empaque:	Sulphonated Styrene Divinil Benzene
Tamaño de partícula:	8 $\mu$

Las condiciones de operación usadas para el análisis del AJ se muestran a continuación:

Flujo de la fase móvil:	0.6 ml/min
Temperatura:	50°C
Presión:	500 PSI
Volumen de inyección:	20 $\mu$ l

#### D. Ácido jasmónico

Para la detección y cuantificación del AJ en las muestras se desarrolló una técnica por HPLC. Se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer (Binary LC Pump 250), conectado a un detector ultravioleta Perkin Elmer (UV/Vis Spectrometric Detector LC 290) a 210 nm para la detección del AJ. Se utilizó como fase móvil metanol: ácido acético (60:0.1) (Koda, 1992). Se utilizó una precolumna con el mismo soporte de la columna empleada. A continuación se presentan las características de la columna utilizada para el análisis de esta molécula:

Columna:	Spherisorb 5 $\mu$ , ODS-2 (Phase Sep)
Material de empaque:	ODS
Tamaño de partícula:	5 $\mu$
Tamaño de poro:	80 Å
Volumen de poro:	0.5 ml/g
Área de superficie:	220 m <sup>2</sup> /g
Carga de carbono:	12 %, monomérica

Las condiciones de operación usadas para el análisis del AJ se muestran a continuación:

Flujo de la fase móvil:	0.85 ml/min
Temperatura:	ambiente
Presión:	2700 PSI
Volumen de inyección:	20 $\mu$ l

Previo al análisis, las muestras se filtraron con filtros de membrana (*Phenomenex*) de 13 mm con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m. La fase móvil fue desgasificada en un sonificador Branson 2200 y filtrada con filtros de membrana de 47 mm de diámetro (*Millipore*) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m. Las muestras se inyectaron con una jeringa Hamilton de 100  $\mu$ l de capacidad.

## 5.6.2 Análisis de las muestras de fermentación en medio sólido

### A. Humedad

A 1 g de muestra fermentada se seca a 60° C durante 24 horas, la diferencia entre el peso inicial y final, dividido entre el peso inicial representa el % de materia seca, y la diferencia entre el 100 % y el % de materia seca se reporta como el % de humedad de la muestra.

### B. pH

1 g de muestra fermentada se le adicionan 10 ml de agua destilada, se agita por 10 minutos empleando un agitador magnético y se mide el pH en un ponteciómetro Conductronic pH 20, previa calibración de equipo con buffers de referencia de fosfatos de sodio y potasio de pH 7.0 y pH 4.0 (Sigma de México SA de CV).

### C. Glucosa y fructosa

Para la detección y cuantificación de glucosa y fructosa se usó la técnica por HPLC según se describe en 5.5.1.C

### D. Ácido jasmónico

Para la detección y cuantificación del AJ se usó la técnica según se describe en 5.5.1.D.

### E. Bióxido de carbono, y oxígeno

Para la detección y cuantificación del bióxido de carbono y oxígeno se utilizó un cromatógrafo de gases (GOW MAC) serie 580 (modelo 69-580) con las siguientes características: columna CTR (Altech Associates, Inc), detector de conductividad térmica y toma muestras automático y como gas acarreador, helio. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Temperatura de la columna:	43° C
Temperatura del detector:	43° C
Temperatura del inyector:	44° C
Presión del gas acarreador	40 PSI
Flujo del gas acarreador	40 ml/min
Volumen de inyección	2 ml

Para determinar el contenido de bióxido de carbono y oxígeno, se corrieron curvas de calibración, empleando patrones con proporciones conocidas en porcentos de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. (5/14.1; 6/18; 9,97/20.98). Las muestras fueron tomadas con un toma muestras automático.

### **5.7 Análisis estadístico**

Para los diferentes experimentos se llevaron a cabo análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.01 ( $\alpha=0.01$ ) para así determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, los datos fueron analizados con el uso de la prueba Tukey con un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha=0.05$ ) (Montgomery, 1991). Los análisis de varianza y de regresión se realizaron con el paquete estadístico Statgrafic Statistical Graphics System.

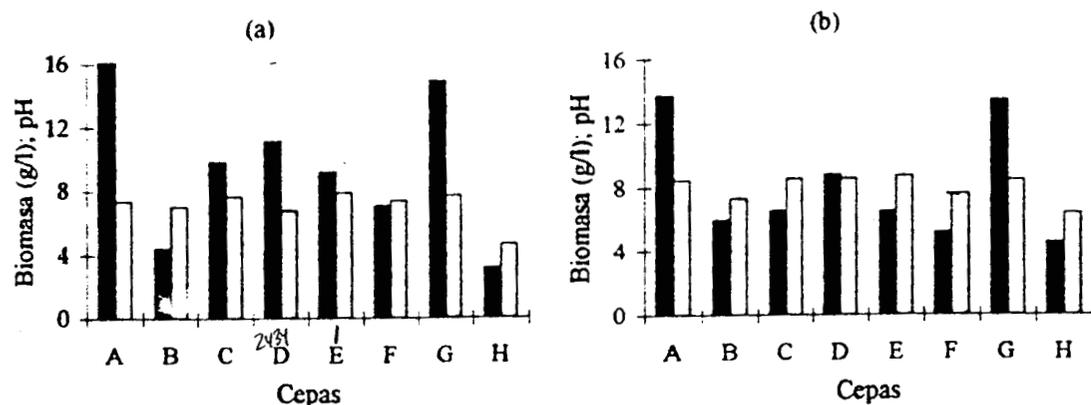
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se divide en cuatro partes, la primera trata sobre la selección de cepas para la producción de AJ en cultivo líquido, en la segunda se estudia la influencia de algunos factores ambientales y nutricionales en la producción de este metabolito por cultivo líquido, seguidamente en la tercera se ensaya el efecto del medio de cultivo, la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* y finalmente, en la cuarta parte se estudia algunos factores nutricionales que afectan la producción del AJ por FMS.

### 6.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO JASMÓNICO

De los estudios realizados para la producción de AJ por vía microbiana el microorganismo que posee mayor capacidad para producir este metabolito en medio líquido es *B. theobromae* (Miersch y col., 1987 y 1993), por lo que, este trabajo comenzó con una selección con el objetivo de encontrar cepas con buena capacidad para producir AJ por cultivo líquido. Para ello se contó con ocho cepas aisladas de fuentes naturales (ver epígrafe 5.1). La selección se realizó en cultivo líquido pues es donde existen experiencias previas para la producción de este metabolito (Miersch y col., 1984; Thomas y col., 1989; Thomas y col. 1990).

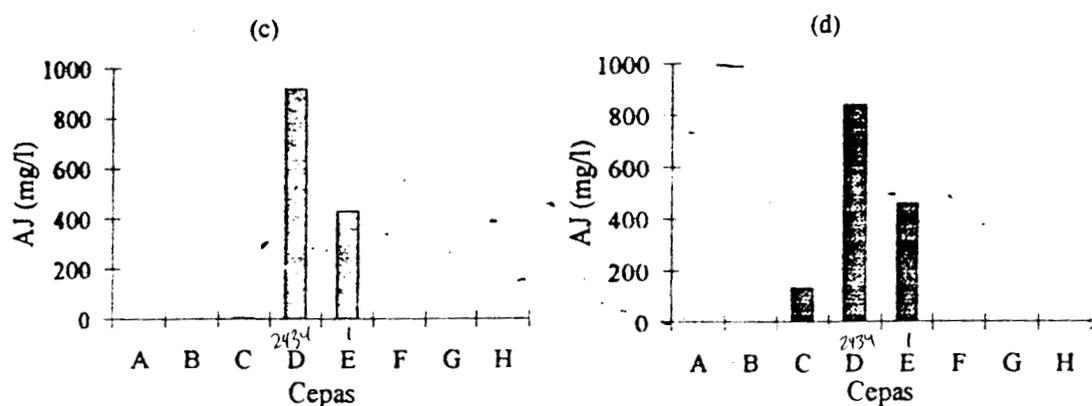
Las cepas se crecieron en el medio Mierch modificado (ver epígrafe 5.2). La inoculación se realizó con micelio crecido sobre EMA, según se detalla en el epígrafe 5.3.1. La fermentación se realizó a una temperatura de 30° C y se tomaron muestras a los diez y quince días de fermentación para ser analizadas en cuanto a la concentración de AJ, biomasa y pH. En la figura 6.1 se presenta la producción de biomasa y el comportamiento del pH de las cepas estudiadas; se puede apreciar que a los 10 días de fermentación todas las cepas presentan un buen crecimiento a excepción de las cepas 489 y 1119 donde la producción de biomasa fue menor, las demás cepas presentan un crecimiento similar, siendo superior para las cepas 2 y 1368. A los 15 días la producción de biomasa disminuye en todas las cepas debido posiblemente a que ya se encuentran en fase de lisis celular.



**Figura 6.1** Producción de biomasa (barras en negro) y comportamiento del pH (barras en blanco) de las cepas de *B. theobromae* durante 10 días de fermentación (a) y 15 días de fermentación (b). Cepas: A: 2, B: 489, C: 2F, D: 2434; E: 1; F: 1F; G: 1368; H: 1119.

Respecto al pH puede apreciarse que en todas las cepas debido a su actividad metabólica, el valor del pH inicial se incrementa de 5.5 hasta valores entre 7 y 8, a excepción de la cepa 1119 donde los valores están por debajo de este intervalo (4.6 y 6.3 para 10 y 15 días de fermentación, respectivamente).

En la figura 6.2 se presenta la producción de AJ para las cepas estudiadas. Puede apreciarse que sólo las cepas 1 y 2434 producen AJ a los 10 días de fermentación en concentraciones del orden de los 430 y 915 mg/l, respectivamente.



**Figura 6.2.** Producción de AJ empleando diferentes cepas de *B. theobromae* durante 10 días de fermentación (c) y 15 días de fermentación (d). Cepas: A: 2, B: 489, C: 2F, D: 2434; E: 1; F: 1F; G: 1368; H: 1119.

A los 15 días de fermentación la cepa 1 incrementa ligeramente la producción de AJ hasta 460 mg/l y la cepa 2434, la concentración del AJ se redujo hasta 835 mg/l, la cepa 2F produjo 130 mg/l de AJ.

En la tabla 6.1 se presenta los rendimientos de la producción de biomasa ( $Y_{x/s}$ ), de AJ ( $Y_{p/s}$ ) y la productividad de las cepas 1, 2F y 2434 para la producción del AJ. Como se aprecia los valores de  $Y_{x/s}$  para las cepas 1 y 2F son similares, sin embargo, para la cepa 2434 el valor de  $Y_{x/s}$  es ligeramente superior, esto significa que ésta cepa sintetizó una mayor cantidad de biomasa por gramo de sacarosa consumida, y por tanto mostró una eficiencia superior para la utilización del sustrato para el crecimiento con respecto a las primeras.

**Tabla 6.1.** Rendimientos de la formación de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y AJ ( $Y_{p/s}$ ) y con respecto al consumo de sacarosa a los 15 días de fermentación y productividad de las cepas 1, 2F y 2434.

Cepa	$Y_{x/s}$ (g biomasa/g sacarosa)	$Y_{p/s}$ (g AJ/g sacarosa) $\times 10^{-3}$	Productividad (mg AJ/l/d)
1	0.129	9.15	30.7
2F	0.130	5.61	8.7
2434	0.175	16.70	91.5

Por otro lado, el  $Y_{p/s}$  para la producción de AJ de la cepa 2434 es aproximadamente de dos y tres veces superior a los rendimientos de las cepas 1 y 2F, respectivamente, lo cual indica que ésta cepa utiliza más eficiente el sustrato para la producción del metabolito. En cuanto a la productividad la mejor cepa de las estudiadas es la 2434, le sigue en orden descendente la cepa 1 y la 2F muestra una productividad comparativamente mucho menor a las anteriores.

Estos resultados no concuerdan con los reportados por Aldridge y col. (1971) y Thomas y col (1990); los cuales seleccionaron cepas de *B. theobromae* de diferentes procedencia para la producción de AJ con rendimientos de 500 y 800 mg/l de AJ, y productividades de 38.5 y

||| disc

80 mg/d, respectivamente. Por tanto, la productividad de la cepa 1 es inferior, mientras que la de la cepa 2434 es superior a las reportadas por estos autores.

## **CONCLUSIONES**

Las cepas estudiadas presentaron un buen crecimiento en las condiciones en que se desarrolló el experimento a excepción de las cepas: 489 y 1119, mientras que el pH de los medios de cultivo se incrementó de 5.5 a valores entre 7 y 8.

Las cepas estudiadas que presentaron mayor capacidad para producir AJ son la cepa: 2434 y la cepa 1, por lo cual éstas cepas fueron seleccionadas para los estudios posteriores de producción de AJ por cultivo líquido. La cepa mejor adaptada para la producción de este metabolito fue la 2434 pues utilizó más eficiente el sustrato para la producción de biomasa y el AJ, y en un menor tiempo sintetiza la concentración máxima del metabolito comparada con las demás cepas ensayadas, además presentó una mayor potencialidad para producir AJ que las reportadas en la literatura.

## 6.2 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO EN CULTIVO LÍQUIDO

### 6.2.1 EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO:NITRÓGENO

Se ha demostrado que la relación carbono:nitrógeno ( $rC/N$ ) es uno de los factores que afecta la producción de metabolitos secundarios. Lonsane y Kumar (1992) señalaron que se han utilizado  $rC/N$  de 6:1 a 188:1 para la producción de ácido giberélico y que este es el factor más importante que influye en la producción de este metabolito. González y col. (1994) señalan que la  $rC/N$  óptima para la producción de ácido giberélico con *Gibberella fujikuroi* IMI 58289 es de 68.795 (correspondiente a 30.27 g/l de C y 0.44 g/l de N).

Borrow y col. (1961) estudiando la producción de ácido giberélico encontraron que cuando se agota el nitrógeno en el medio, la masa celular se incrementa debido a la acumulación de carbohidratos y lípidos, iniciándose la producción del ácido giberélico. También se conoce que cuando el medio es rico en carbono pero deficiente en nitrógeno, o sea, cuando se limita el crecimiento, la producción de lípidos en la célula se ve favorecida por la reducción de la síntesis de otros componentes celulares (Rose, 1989). Estos reportes sugieren que el empleo de una  $rC/N$  alta podría favorecer la producción de ácido  $\alpha$ -linolénico y por ende la del AJ.

Thomas y col. (1990) señalaron que en la producción de AJ con *B. theobromae* D7/2 puede emplearse en el medio una concentración de nitrato de potasio como fuente de nitrógeno entre 2 y 5 g/l, mientras que la concentración de la fuente de carbono (sacarosa) fue de 50 g/l, lo cual significa que estos autores utilizaron una  $rC/N$  entre 75.87 y 30.34.

Con base en estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de la  $rC/N$  en la producción de AJ, empleando tres  $rC/N$  (17, 35 y 70) y manteniendo la concentración inicial de carbono constante y variando la concentración de nitrógeno en forma de nitrato de sodio.

Para realizar los estudios de la influencia de la  $rC/N$ , la fermentación se realizó empleando el medio Miersch modificado en matraces de 125 ml con 25 ml de medio e inoculados con 2 ml de suspensión de esporas  $2.58 \cdot 10^7$  esp/ml de *B. theobromae* cepa 1 e incubados a 30° C.

En la figura 6.3 se presentan las cinéticas de producción de biomasa, producción de AJ y el comportamiento del pH.

11 d

inoculo  
susp esporas

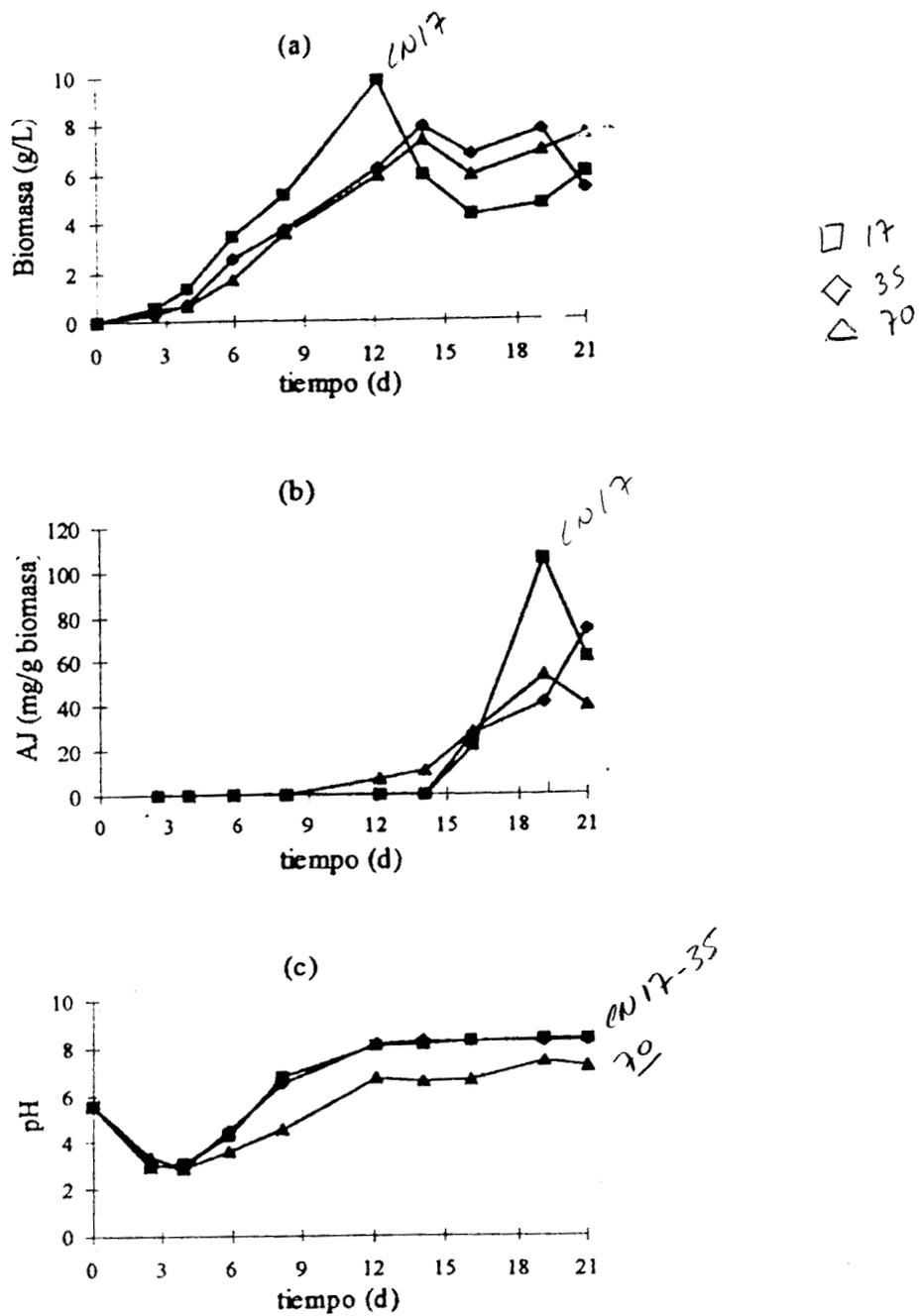


Figura 6.3. Cinéticas de producción de biomasa (A), AJ (b) y comportamiento del pH c) de *B. theobromae* cepa 1 con diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno y una rC/N variable [(■) rC/N 17, (◆) rC/N 35, (▲) rC/N 70].

Puede apreciarse para las curvas de producción de biomasa, primeramente una fase lag de aproximadamente dos días, en la cual el microorganismo se adapta al nuevo medio de cultivo, seguidamente la fase de crecimiento rápido la cual transcurre hasta las doce días

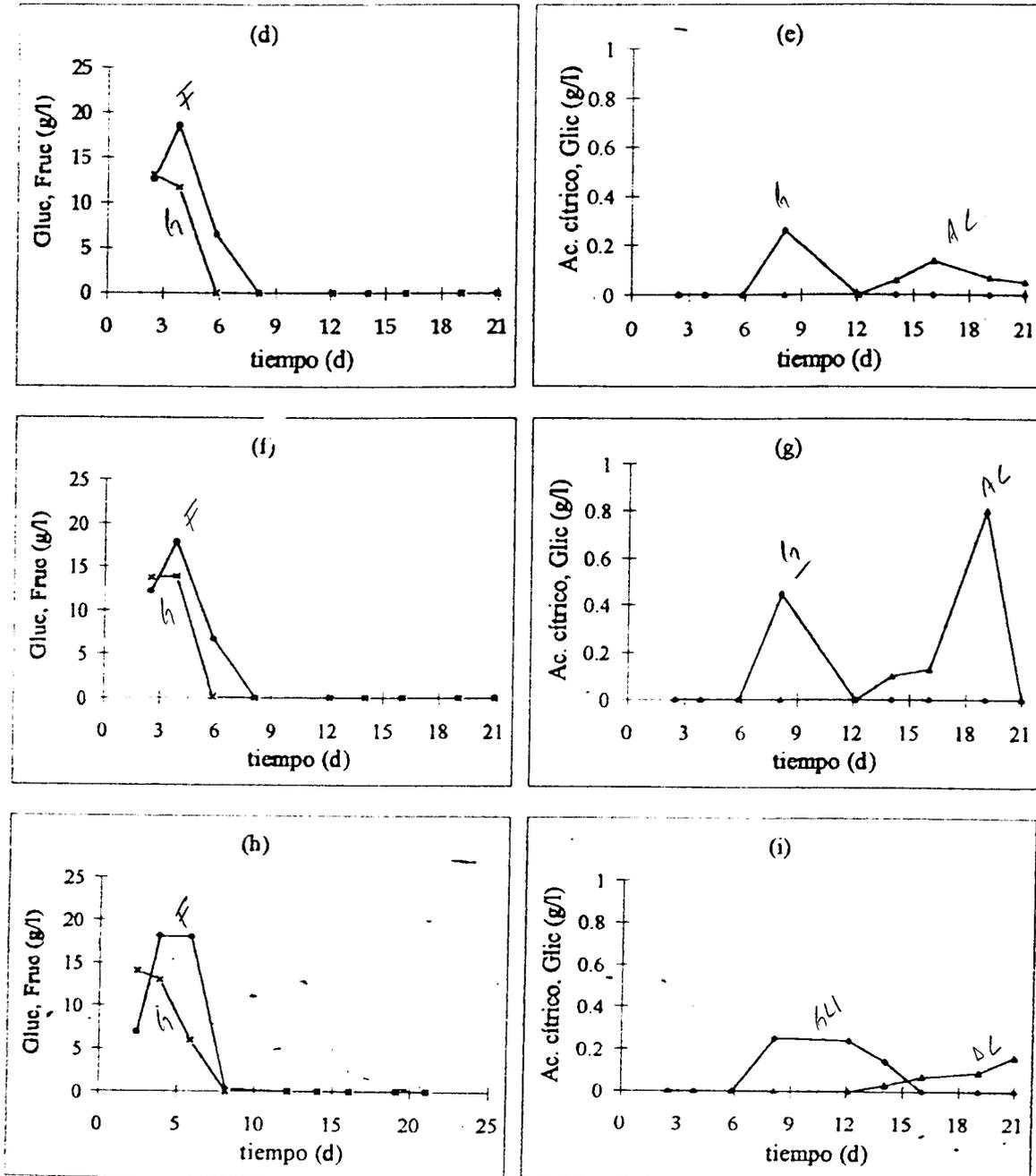
para la rC/N 17 donde se alcanzó una mayor concentración de biomasa con respecto a las demás variantes, para luego disminuir apreciablemente al concluir esta fase y comenzar la fase estacionaria, mientras que para la rC/N 35 y 70 el crecimiento rápido duró aproximadamente hasta los cuatro días, a partir de la cual comenzó la fase estacionaria alcanzándose valores de biomasa muy semejantes para las variantes con rC/N 35 y 70, e inferior para la rC/N 17.

Puede apreciarse (ver figura 6.3.a) que cuando comienza a limitarse el crecimiento comienza la producción de AJ, mostrándose un comportamiento característico de metabolismo secundario. Como la producción de biomasa en las variantes en estudio fue diferente se expresó la concentración de AJ en términos de producción específica (mg AJ/g de biomasa). Para la rC/N de 70 (ver figura 6.3.b) la producción de AJ comienza primero, pues para las restantes variantes la producción se retarda aproximadamente tres días al no encontrarse producción a las 14.5 días.

Con la rC/N 17 se obtiene una producción específica máxima de 109 mg/g de biomasa a los 19 días, tiempo al cual la concentración del AJ comenzó a disminuir. Para la rC/N 35 la producción de AJ comienza aproximadamente a los quince días y se incrementa hasta el final de la fermentación hasta 73.7 mg/g de biomasa. Mientras que para la rC/N 70 la producción específica máxima llegó a 53.5 mg/g de biomasa disminuyendo a partir de este momento. La productividad para cada una de las variantes fue la siguiente: para la rC/N 15 fue de 26.1 mg/l.d, para la rC/N 35 fue de 18.5 mg/l.d y finalmente, para la rC/N 70 fue de 19.5 mg/l.d. Si comparamos la productividad de la variante con rC/N 17 con la obtenida en el experimento anterior de selección de cepas productoras de AJ (ver tabla 6.1), se puede apreciar que estos resultados no concuerdan, debido posiblemente a que no se utilizó la misma forma de inoculación, siendo este aspecto objeto de estudio en el próximo experimento.

Para el comportamiento del pH (ver figura 6.3.c), puede observarse como producto del metabolismo de *B. theobromae* cepa 1 que para todas la rC/N el pH disminuye hasta 3 hasta el cuarto día de incubación, para incrementarse hasta alcanzar el valor de 8 a las 12.5 días coincidiendo con la fase de crecimiento rápido de este microorganismo, se puede notar además que para la rC/N 70 se alcanza un pH inferior, de aproximadamente 7, con respecto a las demás variantes.

El consumo de los azúcares procedentes de la inversión de la sacarosa por *B. theobromae* cepa 1 y la aparición de glicerol y ácido cítrico para las rC/N de 17, 35 y 70 se presentan en la figura 6.4.



**Figura 6.4.** Cinética de consumo glucosa (Gluc), fructosa (Fruc) y aparición de ácido cítrico (Ac. cítrico) y glicerol (Glic). Para (d) y (e) rC/N 17; (f) y (g) rC/N 35 y (h) y (i) rC/N 70, durante el crecimiento de *B. theobromae* cepa 1. (x) Glucosa, (●) fructosa, (◆) glicerol, (▲) ácido cítrico.

Puede apreciarse en la figura 6.4 que la sacarosa es invertida por el hongo a sus monómeros correspondientes (glucosa y fructosa). En todos los casos la concentración de fructosa se incrementó del tercer al cuarto día hasta aproximadamente 20 g/l, lo cual indica que hasta este último tiempo ocurrió la inversión de la sacarosa, seguidamente la concentración de fructosa comenzó a disminuir por el consumo de la misma por *B. theobromae* cepa 1.

La glucosa es asimilada más rápidamente que la fructosa, pues ésta se agota a los seis días para las rC/N 17 y 35, mientras que para la rC/N 70, se consume a los ocho días de fermentación. La fructosa se consume completamente a los ocho días de fermentación en todos los casos.

En el transcurso de la fermentación también se detectó la producción primero de glicerol y luego del ácido cítrico, lo cual es indicativo de la actividad metabólica desarrollada por este microorganismo como se verá más adelante.

Puede apreciarse que la producción de glicerol inició a los 6 días para todas las rC/N ensayadas, y se incrementó su concentración hasta el día ocho hasta valores de 0.3, 0.45, y 0.25 g/l para las rC/N 17, 35 y 70, respectivamente, pasado este tiempo disminuye la concentración de glicerol hasta que se hace cero al día doce y comienza la acumulación del ácido cítrico. Para la variante con rC/N 70, la producción del glicerol se mantuvo constante hasta el día 12, tiempo al cual inició la producción del ácido cítrico. De forma similar a los casos anteriores la concentración del glicerol disminuyó a cero al día diez seis. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Legisa (1986) en la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*, en los cuales se reporta que la producción de glicerol y la acumulación de ácido cítrico se encuentran asociadas, ya que cuando cesa la producción del glicerol, comienza la producción del ácido cítrico.

Por otro lado, la producción de ácido cítrico para la variante con rC/N 17 a los dieciséis días se alcanzó la producción máxima de este metabolito hasta 0.14 g/l, mientras que para la variante de la rC/N 35 la producción máxima de ácido cítrico llegó hasta los 0.8 g/l a los diecinueve días de fermentación, en ambas variante la producción se hizo mínima al tiempo final, posiblemente porque este producto fue consumido como fuente de carbono, al estar el medio muy limitado en nutrientes. Para el caso de la variante con rC/N 70 la producción de este metabolito se incrementó linealmente en el tiempo hasta el final del experimento hasta

una concentración de 0.16 g/l. Puede notarse además que donde se produjo más glicerol también se acumuló la mayor cantidad de ácido cítrico.

El incremento de la rC/N de 17 a 35 en el medio de cultivo en las condiciones en que se realizó el experimento favoreció la acumulación de ácido cítrico en el medio de fermentación. Esto posiblemente se deba a que como en la variante con rC/N 35 se sintetizó una cantidad mayor de glicerol, éste fue utilizado como fuente de carbono en la ruta glicolítica y convertido en ácido cítrico, obteniéndose una mayor cantidad de este metabolito que en la variante de rC/N 17. Estos resultados concuerdan con los estudios reportados por Trumphy y Millis (1963) acerca de la producción de ácido cítrico por cultivo líquido. Estos autores estudiando los requerimientos nutricionales de una mutante de *A. niger* para la producción de ácido cítrico encontraron que la acumulación del ácido cítrico se favorece un medio limitado en nitrógeno y minerales.

Pero si analizamos el efecto de la rC/N con respecto a la producción del AJ, podemos apreciar que el comportamiento es a la inversa al descrito para el ácido cítrico, ya que la producción de AJ se favorece en el caso de la rC/N 17, con respecto a las demás rC/N. Una posible explicación a estos resultados podría estar en el hecho de que las rutas metabólicas para la síntesis del AJ y el ácido cítrico presentan como intermediario común el acetil-CoA, por lo cual cuando se favorece la síntesis de uno de ellos por las condiciones del medio, en la otra ruta metabólica se limita la síntesis del otro compuesto, y viceversa.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y en las condiciones en que se desarrolló el experimento el factor rC/N afectó marcadamente la producción de AJ con *B. theobromae* cepa 1 en tanto que se favoreció positivamente la producción específica y la productividad de AJ a la rC/N 17 con respecto a la rC/N 35 y 70.

En la variante con rC/N 35 se favoreció preferentemente la producción de glicerol y la acumulación de ácido cítrico con respecto a las demás variantes estudiadas.

La síntesis de AJ se inició primero en la variante con rC/N 70, o sea, en el medio más limitado en nitrógeno.

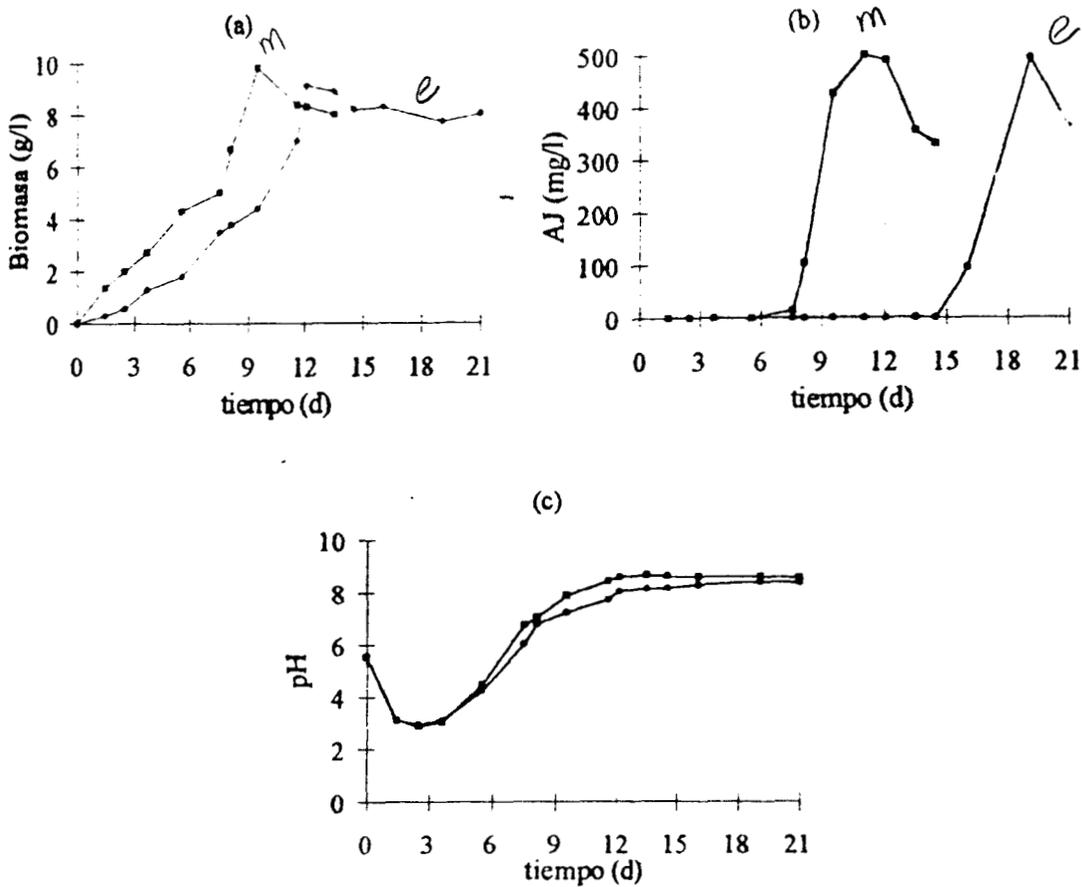
### 6.2.2 EFECTO DEL TIPO DE INÓCULO

Con el objeto de estudiar si la variación en la forma o tipo de inóculo provoca algún efecto sobre el crecimiento y la producción de AJ por *B. theobroma* cepa 1, se realizaron fermentaciones en las que se inoculó utilizando micelio y por otro lado esporas. Ambos inóculos se obtuvieron del crecimiento superficial de la cepa en EMA según se detalla en los epígrafes 5.3.1 y 5.3.2.A. En este caso no se empleó la cepa 24<sup>34</sup>, pues según experiencias previas esta no cepa no esporula abundantemente.

La inoculación con micelio se realizó empleando 5 bocados de agar crecido de micelio, mientras que la inoculación con esporas se realizó adicionando 2 ml de una suspensión de  $2.50 \times 10^7$  esp/ml a 25 ml del medio Miersch modificado y una rC/N de 17. En la figura 6.5 se muestran las cinéticas de crecimiento de *B. theobromae* cepa 1, de producción de AJ, y las variaciones del pH para las dos variantes de inoculación empleadas.

En la variante que se empleó la inoculación con micelio la ideofase se alcanza aproximadamente a los 9 días de fermentación, y el crecimiento comenzó a declinar después del día 12, mientras que para la variante inoculada con esporas la ideofase se alcanzó a los 12 días, el crecimiento disminuye a partir del día 14 de fermentación. El crecimiento máximo alcanzado por el microorganismo en éstas variantes es ligeramente superior para la variante inoculada con micelio (9.80 g/l), pues en la variante inoculada con esporas se alcanzó una concentración de 9.13 g/l.

La producción de AJ en la variante inoculada con micelio inició en la fase tardía del crecimiento al día 8 de fermentación, obteniéndose una concentración máxima de 499 mg/l de AJ a los 11 días de fermentación, después de este tiempo la biosíntesis de este compuesto disminuyó coincidiendo como el comienzo de la lisis celular. Por otro lado, en la variante inoculada con esporas la producción máxima de AJ se alcanzó a los 19 días con una concentración de 490 mg/l de AJ, de forma similar después de este tiempo la concentración de AJ disminuye. El tiempo de producción máxima de AJ empleando la inoculación con micelio se reduce en unos 8 días con respecto a la variante inoculada con esporas.



**Figura 6.5.** Cinética de producción de biomasa (a), AJ (b), y comportamiento del pH (c) de *B. theobromae* cepa 1 empleando como fuentes de inóculo: micelio (■) y esporas (●).

Respecto al pH puede observarse en la figura 6.5.C que para las dos variantes de inoculación el pH disminuye hasta hacerse mínimo aproximadamente al tercer día y alcanzar valores de aproximadamente 3, luego se incrementa exponencialmente producto de la actividad metabólica del microorganismo hasta un valor de aproximadamente 8 donde se estabiliza coincidiendo con la fase estacionaria del microorganismo. Puede apreciarse además que esta estabilización del pH se alcanza también con mayor rapidez para el caso de la variante inoculada con micelio respecto a la variante inoculada con esporas.

En la tabla 6.2 se presenta los rendimientos de la producción de biomasa ( $Y_{x/s}$ ), AJ ( $Y_{p/s}$ ) y la productividad para la producción de AJ para las variantes en estudio.

**Tabla 6.2.** Rendimientos de la formación de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y AJ ( $Y_{p/s}$ ) con respecto al consumo de biomasa y productividad de las fuentes de nitrógeno ensayadas.

Tipo de inóculo	$Y_{x/s}$ (g biomasa/g sacarosa)	$Y_{p/s}$ (g AJ/g sacarosa) $\times 10^{-3}$	Productividad (mg AJ/l/d)
Micelio	0.196	9.98	45.45
Esporas	0.183	9.88	26.31

(Se consideró la concentración de biomasa al final del crecimiento rápido del microorganismo y la producción máxima de AJ para los cálculos de los rendimientos).

Como se aprecia los rendimientos  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  son similares para la inoculación con micelio y esporas lo cual significa que la eficiencia para la utilización de la sacarosa para la formación de biomasa y la producción AJ es casi la misma en las variantes ensayadas.

La productividad para la producción del AJ se incrementó al emplear la inoculación con micelio respecto a la de las esporas en 1.7 veces. Este comportamiento se puede explicar en base a que la fase estacionaria de crecimiento en la variante inoculada con micelio se alcanzó más rápidamente que en la variante inoculada con esporas según se describió anteriormente, y es precisamente en esta fase donde se acumula el AJ.

Un comportamiento similar al aquí reportado fue observado por Barrios y col. (1993). Estos autores encontraron que la inoculación con micelio mostró un efecto positivo en la producción de penicilina con *Penicillium chrysogenum* con respecto a la producción por el control inoculado con esporas de este hongo, reduciéndose el tiempo de producción del antibiótico hasta en un 30 %, además notaron que la mayor producción no se debió a una mayor concentración de biomasa.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos puede plantearse que la inoculación con micelio de *B. theobromae* cepa 1 para la producción de AJ se ve favorecida respecto a la inoculación con esporas, pues se reduce considerablemente el tiempo al cual se alcanza la fase estacionaria,

incrementándose la productividad en 1.7 veces con respecto a la inoculación con esporas. Los rendimientos obtenidos para de la formación de biomasa y del AJ fueron similares para las dos variantes ensayadas.

### 6.2.3 EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA

Este experimento se realizó con el objetivo de conocer el efecto de la adición de extracto de levadura al medio sobre el crecimiento y la producción de AJ por *B. theobromae* cepa 1, teniendo en cuenta que en la síntesis del ácido  $\alpha$ -linolénico (intermediario de la síntesis de AJ) se necesita la presencia de vitaminas (como la biotina) y además que este medio contiene entre sus componentes principales de un 7 a 9.5 % de nitrógeno orgánico, cofactores, vitaminas y minerales. Por ejemplo, Granger y col. (1993) en sus estudios sobre la limitación de los nutrientes del medio en la producción del ácido  $\alpha$ -linolénico con *Rhodotorula glutinis* emplearon 1 g/l de extracto de levadura en el medio de cultivo. Broadbent (1969) señaló extracto de levadura como uno de los componentes del medio de cultivo para la producción de AJ.

El experimento se diseñó sobre la base de determinar el aporte de nitrógeno del extracto de levadura adicionado al medio y evaluar la cantidad de nitrato de sodio necesaria para mantener la misma cantidad de nitrógeno en la variante en la que no se adicionó el extracto de levadura, y de esta forma no modificar la rC/N. Para la variante a la cual se le puso extracto de levadura al medio de cultivo se adicionó en una concentración de 1 g/l, considerando a esta sustancia fundamentalmente como fuente de vitaminas (Pirt, 1975). La fermentación se realizó empleando el medio Miersch modificado e inoculado con 5 bocados de micelio de *B. theobromae* cepa 1 y a 30° C. En la figura 6.6 se presenta la cinética de crecimiento, de producción de AJ, el consumo de los azúcares y las variaciones del pH, obtenidas para los medios fermentados para cada una de las condiciones probadas.

Respecto al crecimiento de *B. theobromae* cepa 1, la adición de extracto de levadura no provocó un aumento en la concentración de biomasa, pero si el alcance de la fase estacionaria más rápidamente con respecto al control sin extracto de levadura.

1 inoc. micelio  
cep 1  
+ T.E.

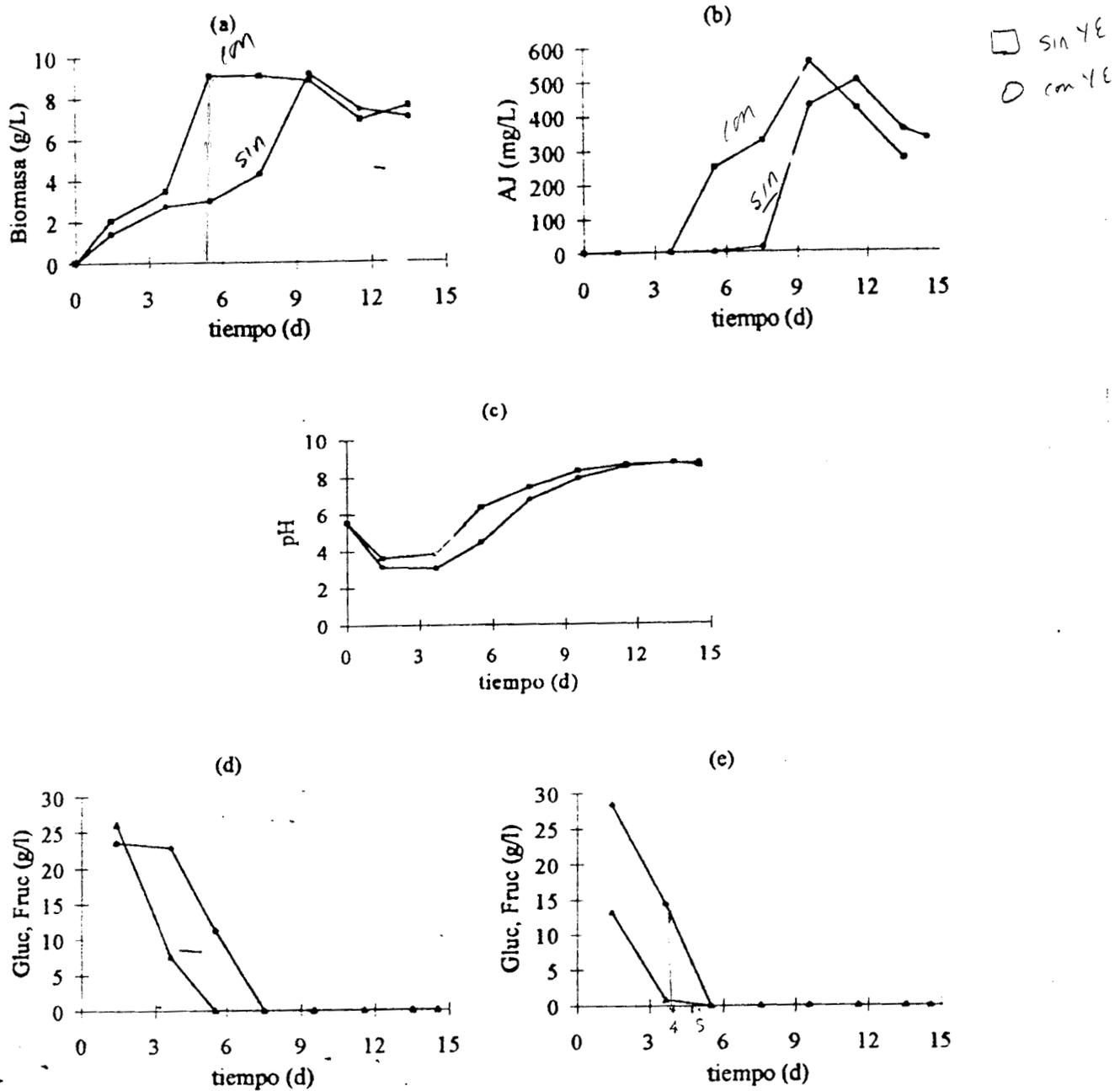


Figura 6.6. Cinética de producción de biomasa (a) y AJ (b), comportamiento del pH (c) de *B. theobromae* cepa 1 empleando como fuente de nitrógeno: nitrato de sodio:(■) y nitrato de sodio y extracto de levadura (●). Consumo de glucosa (▲) y Fructosa(◆) para la variante de nitrato de sodio (d) y nitrato de sodio y extracto de levadura (e)].

Para la variante con extracto de levadura la ideofase se alcanzó a los 5 días de fermentación, continuando hasta el día 9, tiempo al cual el crecimiento comenzó a disminuir, mientras que

la ideofase para el control se alcanzó aproximadamente el día 9 de fermentación y su duración fue menor, pues a partir de este tiempo, el crecimiento disminuyó. Este comportamiento puede explicar el hecho de que la producción máxima de AJ se alcance más rápidamente en la variante con extracto de levadura respecto al control, ya que es en la fase estacionaria donde se acumula el AJ.

La adición del extracto de levadura al medio de cultivo provocó un efecto positivo al propiciar un adelanto del inicio de la síntesis del AJ y por tanto disminuir el tiempo al cual se alcanza la producción máxima de AJ, apreciándose una mejora de aproximadamente 2 días, con respecto al control sin extracto de levadura, sin embargo, la producción del metabolito no se incrementó apreciablemente en comparación con el control.

Para la variante a la cual se le adicionó extracto de levadura se obtuvo una producción máxima de 550 mg/l de AJ a los diez días de fermentación, luego de este tiempo la biosíntesis de este metabolito disminuyó coincidiendo con la fase de lisis celular, mientras que para la variante control la producción máxima se alcanzó a los doce días de fermentación y una concentración de 500 mg/l, de forma similar disminuye su concentración después de transcurrido este tiempo.

Para la variante con extracto de levadura los azúcares se consumen aproximadamente a los 6 días, mientras que para el control se agotan aproximadamente a los 7.5 días de fermentación.

Para la variante con extracto de levadura el pH disminuye hasta hacerse mínimo aproximadamente al segundo día, alcanzando valores cercanos a 4, luego se incrementa exponencialmente hasta aproximadamente 8. El comportamiento del control resulta similar, pero con la diferencia que los valores de pH en toda la cinética son inferiores, puede apreciarse además que la estabilización del pH se alcanza prácticamente al mismo tiempo para las dos variantes.

En la tabla 6.3 se presenta los rendimientos de la producción de biomasa ( $Y_x/s$ ), AJ ( $Y_p/s$ ) y la productividad para la producción de AJ para las variantes en estudio. Como se aprecia los valores obtenidos de  $Y_x/s$  y  $Y_p/s$  son muy similares, lo cual se debe a que la producción de biomasa y AJ fue similar también para ambas variantes como se vio anteriormente.

La productividad se incrementó para la variante con extracto de levadura con respecto al control en 1.33 veces. Una explicación a este comportamiento está en el hecho de que la adición de extracto de levadura permite a la célula tomar del medio vitaminas y cofactores que favorecen el metabolismo de *B. theobromae* para sintetizar el AJ. La variante control mostró que *B. theobromae* posee la capacidad de sintetizar este metabolito sin la presencia de estos compuestos, pero se necesita de un tiempo mayor para alcanzar el mismo título del metabolito.

**Tabla 6.3.** Rendimientos de la formación de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y AJ ( $Y_{p/s}$ ) con respecto al consumo de biomasa y productividad de las fuentes de nitrógeno ensayadas.

Fuente de nitrógeno	$Y_{x/s}$ (g biomasa/g sacarosa)	$Y_{p/s}$ (g AJ/g sacarosa) $\times 10^{-2}$	Productividad (mg AJ/d)
NaNO <sub>3</sub>	0.183	1.00	41.6
NaNO <sub>3</sub> y extracto de levadura	0.181	1.11	55.5

(Se consideró la concentración de biomasa al final del crecimiento rápido del microorganismo y la producción máxima de AJ para los cálculos de los rendimientos).

Los resultados reportados en este experimento no concuerdan con lo reportado por Thomas y col. (1990) quienes emplearon nitrato, preferiblemente nitrato de calcio, potasio, o sodio como fuente de nitrógeno en la producción de AJ; señalando además que la adición de otras fuentes de nitrógeno y especialmente orgánicas, no deben ser añadidos al medio de cultivo. Como se vio anteriormente la adición de extracto de levadura provocó un efecto positivo en la producción de este metabolito en cuanto se incrementó la productividad del mismo.

## CONCLUSIONES

La adición de 1 g/l de extracto de levadura al medio Miersch modificado provocó un efecto positivo en la producción de AJ en cuanto disminuyó el tiempo de producción del AJ en dos días aproximadamente, incrementándose la productividad en 1.3 veces con respecto al medio sin extracto de levadura. La producción máxima del metabolito no se incrementó de manera

apreciable y por ende, no se incrementó el rendimiento (Yp/s). También el Yx/s fue similar en ambas variantes.

*B. theobromae* no requiere de la adición de vitaminas o cofactores para realizar la síntesis del AJ, ya que posee la capacidad de sintetizar todos los intermediarios necesarios para llevar a cabo este proceso si el medio contiene una fuente de carbono como la sacarosa, y sales minerales como nitrato de sodio, fosfato de potasio, cloruro de potasio, sulfatos de magnesio, hierro, cobre, manganeso y zinc y además molibdeno de sodio.

#### 6.2.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA

La temperatura es un parámetro muy importante para el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, ya que no siempre la temperatura de máximo crecimiento corresponde con la máxima producción de éstos (Pirt, 1975). El experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la temperatura sobre la producción de AJ, para ello se utilizaron las siguientes temperaturas: 25, 27, 30, 32, 35° C. En esta oportunidad se ensayó la influencia de esta variable con dos cepas de *B. theobromae*: 1 y 2434. La fermentación se llevo a cabo empleando el medio Miersch modificado y suplementado con 1 g/l de extracto de levadura, inoculado con 5 bocados de micelio e incubados por 10 días.

En la figura 6.7 puede apreciarse el efecto de la temperatura en la producción de AJ con *B. theobromae* cepas: 1 y 2434.

La máxima producción de AJ para ambas cepas ocurre a 30° C. Para *B. theobromae* cepa 1 la producción ocurre en un intervalo de 27 a 35° C y para *B. theobromae* cepa 2434 el rango de producción de AJ es más amplio, pues en todas las temperaturas ensayadas se produce el AJ, por lo cual ésta cepa muestra una mejor adaptación a las condiciones del ambiente para producir este metabolito y mayores ventajas para ser usada en la producción de este metabolito por FMS.

Inoc micelio  
4 E  
2 C 021

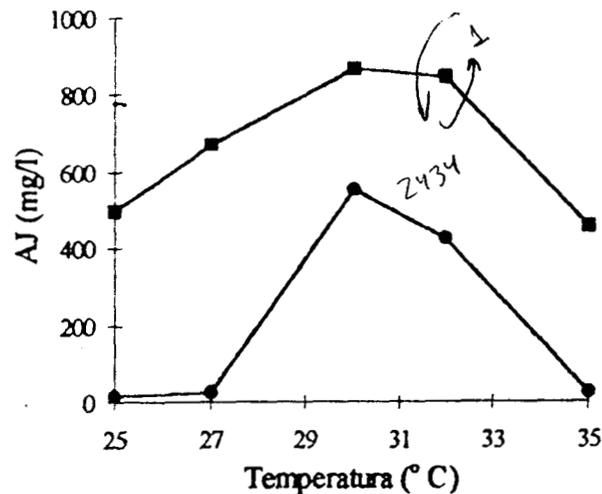


Figura 6.7. Efecto de la temperatura en la producción de AJ con *B. theobromae* cepas: 1 (■) y 2434 (●) a los 10 días de fermentación.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Thomas y col. (1990) donde se señalan que el rango óptimo para la producción del AJ por fermentación en lote se encuentra entre 27 y 30° C.

### CONCLUSIONES

La mejor temperatura para la producción de AJ con *B. theobromae* cepas: 1 y 2434 empleando el medio Miersch modificado y suplementado con extracto de levadura e inoculado con micelio es de 30° C.

La cepa 2434 produce AJ en un amplio intervalo de temperaturas (25-35° C), mostrando una adaptación mayor a las condiciones del ambiente para la producción de este metabolito respecto a la cepa 1.

## 6.2.5 EFECTO DE LA AGITACIÓN

La agitación de los frascos de cultivos cumple con la función de favorecer la transferencia de masa entre las diferentes fases del sistema (gas, líquido y sólido) presentes en el cultivo y la mezcla del cultivo para mantener homogéneas las condiciones físicas y químicas en el cultivo (Pirt, 1975), esto es particularmente importante para dispersar la biomasa en el medio y proveer de oxígeno y nutrientes a las células en crecimiento.

La agitación del medio ha sido una de las más variables estudiadas en la producción de AJ. Por ejemplo Thomas y col. (1990) reportan que la agitación en fermentadores no debe sobrepasar las 190 rpm, pues a velocidades mayores la producción de éste metabolito es severamente afectada por la producción simultánea de un polisacárido extracelular.

Teniendo en cuenta la premisa anterior, se estudió la influencia de la agitación en incubador agitado y controlado térmicamente a tres velocidades que fueron: 50, 100 y 150 rpm, los resultados se comparan con el control que fue la variante sin agitación.

La fermentación se realizó empleando el medio Miersch modificado y suplementado con extracto de levadura e inoculado con micelio de *B. theobromae* cepa 2434 y a 30° C.

En la figura 6.8 se presenta las cinéticas de producción de AJ, de crecimiento, y las variaciones del pH, obtenidas para los medios fermentados para cada una de las condiciones probadas de agitación.

Puede apreciarse que la producción del AJ inició al cuarto día de fermentación para todas las variantes en el comienzo de la ideofase. La producción máxima de AJ de las variantes agitadas se alcanzó a los ocho días de fermentación en concentraciones de 200, 300 y 350 mg/l para las variantes de 100, 150 y 50 rpm, respectivamente; luego de este tiempo las concentraciones del metabolito disminuyeron en el tiempo hasta valores próximos a 50 mg/l. Para la variante sin agitación la producción continuo creciendo hasta el final de la fermentación obteniéndose un concentración de 900 mg/l de AJ.

C 2131  
1700 micelio  
4 E

222264

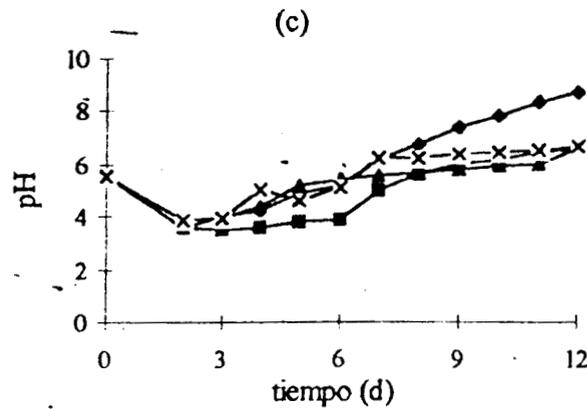
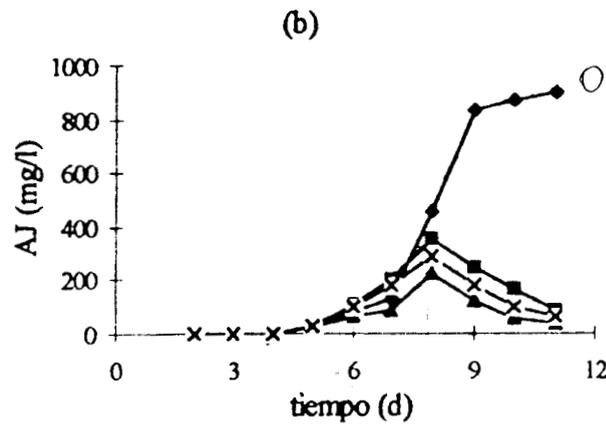
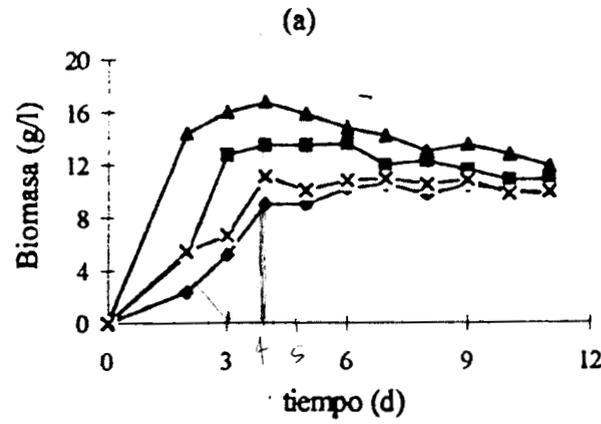


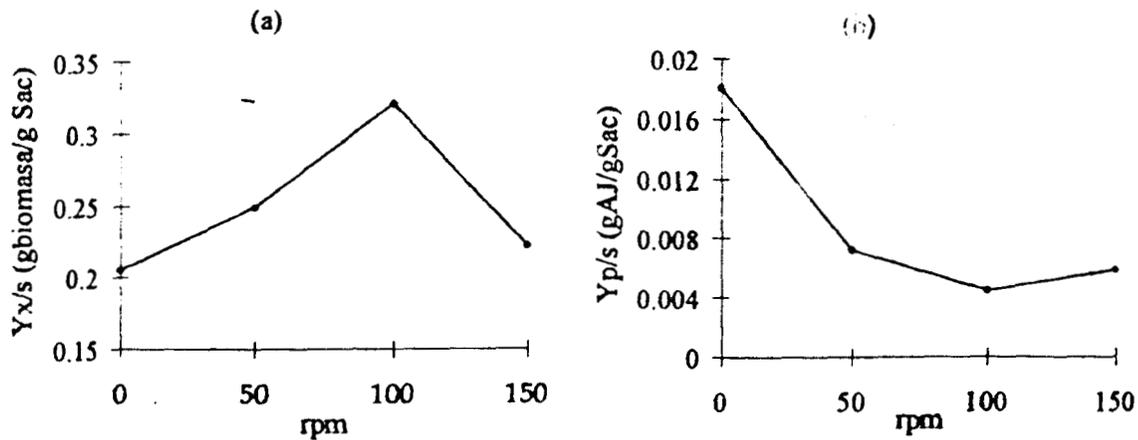
Figura 6.8. Efecto de la agitación [(◆) 0, (■) 50 rpm, (▲) 100 rpm, (x) 150 rpm] en la producción de biomasa (a), AJ (b) y comportamiento del pH con *B. theobromae* cepa 2434.

## Resultados y discusión

Por otro lado el crecimiento de *B. theobromae* 2434 en las variantes agitadas resultó ser mayor en todos los casos con respecto al control sin agitación.

Respecto al pH del medio fermentado puede apreciarse que producto del metabolismo del hongo, el pH inicial disminuye hasta valores entre 3.5 y 4 al segundo día de la fermentación, incrementándose a partir de este momento hasta valores entre 6 y 7 para las variantes agitadas y para el control llegó 8.8.

En la figura 6.9 se muestran los rendimientos de la producción de biomasa y AJ con respecto a la sacarosa consumida. Puede apreciarse más claramente como la agitación afectó la producción de biomasa y del AJ. Al incrementar la velocidad de agitación a 50, 100 y 150 rpm respecto del control (sin agitación), el rendimiento para la formación de biomasa alcanzó un máximo a 100 rpm de 0.32 g biomasa/g Sac consumida, para posteriormente disminuir el valor de 150 rpm hasta un valor próximo al rendimiento del control de 0.22 g biomasa/g Sac consumido. En tanto para los rendimientos para la producción del AJ para todas las velocidades de agitación ensayadas disminuyeron apreciablemente de 0.018 para el control a un 0.007 a 0.006 gAJ/g Sac consumida para 50 y 150 rpm, respectivamente; a 100 rpm se obtuvo un rendimiento mínimo de 0.004 gAJ/g Sac, coincidiendo con el rendimiento máximo de biomasa. Estos resultados sugieren una desviación del metabolismo, en la que al agitar el medio de cultivo, *B. theobromae* cepa 2434 consumió el sustrato para la formación de sus componentes celulares, en tanto que en el medio sin agitar se favoreció la síntesis del AJ. La disminución del rendimiento  $Y_{x/s}$  a 150 rpm tampoco provocó un efecto favorable a la producción de este metabolito, lo cual probablemente podría explicarse por la desviación del metabolismo a la síntesis de otros metabolitos.



**Figura 6.9.** Rendimientos de la formación de biomasa y AJ con respecto al sustrato consumido (sacarosa: Sac),  $Yx/s$  (a),  $Yp/s$  (b) a las velocidades de agitación 0 (control), 50, 100 y 150 rpm; considerando la concentración de biomasa final del crecimiento rápido del microorganismo y la producción máxima de AJ para los cálculos de los rendimientos.

Thomas y col. (1989) reportan que *B. theobromae* cepa D7/2 en condiciones de cultivo estático a nivel de matraz y un medio compuesto principalmente por suero de leche y residuos de la extracción de aceites permitieron alcanzar una concentración de 500 mg/l de AJ en 10 días de fermentación. Sin embargo, la producción del metabolito disminuyó hasta lo 300 mg/l cuando se realizó la síntesis en condiciones de agitación a 250 rpm.

## CONCLUSIONES

La agitación a las velocidades ensayadas (50, 100 y 150 rpm) no incrementa de manera significativa la producción máxima de AJ de *B. theobromae* cepa 2434 con respecto al control (sin agitación), pues en todos los casos la producción de AJ se redujo apreciablemente, posiblemente por la desviación del metabolismo del hongo hacia la producción de sus componentes celulares y otros metabolitos según lo demuestran los valores obtenidos de  $Yx/s$  y  $Yp/s$ .

### 6.2.6 EFECTO DEL TIPO DE FUENTE DE CARBONO

El objetivo de estudiar el efecto de la fuente de carbono fue el determinar la eficiencia de *B. theobromae* cepa 2434 para utilizar diferentes fuentes de carbono en la producción del AJ y mejorar el medio de cultivo.

Entre las fuentes de carbono que más se han utilizado para la producción de AJ se encuentran medios orgánicos complejos como harina de soya, extractos de cítricos, licor de maíz (Miersch y col., 1984) y suero de leche (Thomas y col., 1989). También se recomienda el empleo de medios sintéticos a base de fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa, siendo la glucosa y la sacarosa las más utilizadas y las que reportan los mayores rendimientos (Thomas y col., 1990).

Diferentes autores (Ekundaya y Oso, 1991; Navaratnam y col. 1996) señalan que *B. theobromae* produce  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas que hidrolizan al almidón a sus monómeros correspondientes, por tanto sería muy adecuado evaluar el efecto de ésta de lenta asimilación fuente y su mezcla con sacarosa en la producción de AJ.

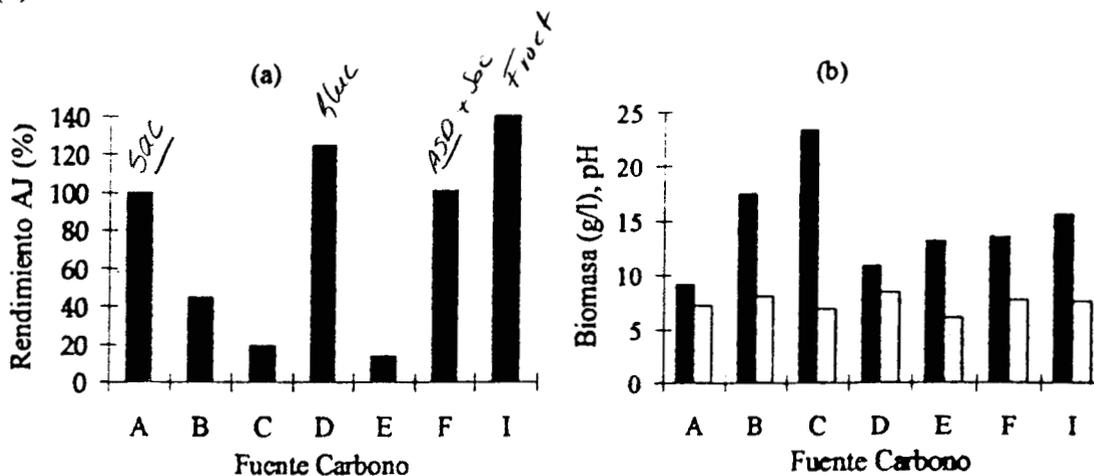
Basados en los antecedentes anteriores se seleccionaron la fuentes de carbono a ensayar. Éstas fueron: almidón soluble de papa (ASP), ASP más sacarosa (50-50 %), fructosa, glucosa, lactosa, sorbitol, y sacarosa (como control). Se incluyó en ésta lista al sorbitol por ser un azúcar de fácil disponibilidad.

Los ensayos se realizaron utilizando el medio Miersch modificado y suplementado con extracto de levadura, inoculados con micelio e incubados a 30° C por 10 días. Para cada una de las fuentes seleccionadas, se calculó el % de carbono aportado por el control, y en base a este % se calcularon el peso de estos compuestos y como fuente de nitrógeno se utilizó nitrato de sodio.

La producción de AJ por *B. theobromae* 2434 con las seis fuentes de carbono se comparan con el control, considerando el rendimiento de AJ en el medio que contiene sacarosa como el 100 % (902 mg/l de AJ), por tanto, los mejores sustratos presentarán rendimientos similares o superiores al 100 %.

I mic  
18  
2434

En la figura 6.10 se presentan los rendimientos obtenidos de AJ para las diferentes fuentes de carbono empleadas (a), así como la producción de biomasa y el pH al final del experimento (b).



**Figura 6.10.** Producción de AJ (a) y biomasa [en barras en negro] (b) y pH final [en barras en blanco] (b), empleando diferentes fuentes de carbono con *B. theobromae* cepa 2434. Fuentes de carbono A: sacarosa (control); B: ASP, C: sorbitol, D: dextrosa, E: lactosa; F: ASP+sacarosa y I: fructosa.

Puede apreciarse que los mejores sustratos son la fructosa y la glucosa con rendimientos del 139.9 y 124.9 %, respectivamente. Le sigue en orden la mezcla de ASP y sacarosa con un rendimiento muy similar al control (100.4 %) y los sustratos más pobres para producir el AJ —son el ASP, el sorbitol y la lactosa con un rendimiento de 44.4, 19.1 y 13.8 %, respectivamente.

Estos resultados no concuerdan con los reportados por Thomas y col. (1989, 1990) quienes proponen como fuente de carbono preferiblemente a la sacarosa o glucosa para la producción de AJ, ya que como se observó la fuente con el rendimiento más alto y por tanto la más eficiente para la producción de AJ fue la fructosa.

Una explicación a este comportamiento se podría deber al hecho de que la glucosa a diferencia de la fructosa al entrar a la glucólisis necesita de dos pasos de reacción que implican el consumo de un ATP para llegar a la fructosa-6-fosfato, mientras que la fructosa sólo necesita de su fosforilación para entrar a esta ruta, por otro lado la sacarosa inicialmente es invertida por el enzima invertasa a glucosa y fructosa, y luego es que ocurre la entrada de estos azúcares a la glucólisis, por tanto, el empleo de sacarosa y la glucosa

implican un consumo mayor de energía por la célula para llegar a piruvato y de ahí al acetilCoA que en el caso de la fructosa.

Para el ASP y lactosa también requieren de hidrólisis enzimáticas para la formación de sus respectivos monómeros y para el caso del sorbitol, se requiere de su transformación a glucosa.

En cuanto a la biomasa formada se puede observar que en todos los medios se alcanzaron altos títulos de biomasa y superiores al control de sacarosa, destacando principalmente el ASP y el sorbitol.

Con respecto al pH pude apreciarse que en todos los medios se alcanzaron valores entre 7 y 8, a excepción en el medio con lactosa donde el pH fue de 6.

## **CONCLUSIONES**

De las fuentes de carbono ensayadas para la producción de AJ con *B. theobromae* cepa 2434 las que mostraron mayor eficiencia con respecto al control de sacarosa fueron: la fructosa y la glucosa. La mezcla de un sustrato de lenta asimilación como el ASP con la sacarosa mostró un rendimiento muy similar al control, pero cuando se ensayo por separado se obtuvo un rendimiento inferior del 50 %. Los sustratos más pobres para la producción de AJ fueron el sorbitol y la lactosa.

### **6.2.7 EFECTO DEL TIPO DE FUENTE DE NITRÓGENO**

En los estudios realizados de producción de AJ se han empleado como fuente de nitrógeno fundamentalmente: extracto de levadura, harina de soya, glicina, nitratos de sodio, potasio o calcio (Broadbent, 1968; Miersch y col., 1984; Thomas y col., 1989, 1990)

De forma similar al experimento anterior se procedió a estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de AJ con *B. theobromae* 2434 con el objetivo de determinar la eficiencia de diferentes fuentes y contribuir a la optimización del medio de cultivo. Las fuentes seleccionadas fueron: cloruro de amonio, extracto de levadura, fosfato de amonio dibásico, sulfato de amonio, urea y nitrato de sodio (como control).

Los ensayos se utilizó el medio Miersch modificado y suplementado con extracto de levadura, inoculados con micelio del hongo e incubados a 30° C y 10 días. Para la fuente de nitrógeno se calculó la contribución de nitrógeno aportado por el control, y en base a este se calcularon el peso de las fuentes de nitrógeno utilizadas; y como sustrato sacarosa.

Se comparó la producción de AJ de *B. theobromae* cepa 2434 de las seis fuentes de nitrógeno con el control en este caso el nitrato de sodio. Si consideramos el rendimiento de AJ en un medio que contiene nitrato de sodio como fuente de nitrógeno como el 100 % (902 mg/l de AJ), por tanto, las mejores fuentes presentarán rendimientos similares o superiores al 100 %. En el figur 6.10 se presenta los rendimientos obtenidos de AJ para las diferentes fuentes de nitrógeno empleadas (a), así como la producción de biomasa y el pH final (b). Puede apreciarse que los rendimientos obtenidos empleando las diferentes fuentes de nitrógeno fueron bajos: el rendimiento más alto correspondió a la variante con extracto de levadura alcanzándose un rendimiento del 44.5 %; para la urea y el nitrato de amonio los rendimientos fueron del 8.2 y 3.2 %, respectivamente y para las demás fuentes los rendimientos fueron nulos.

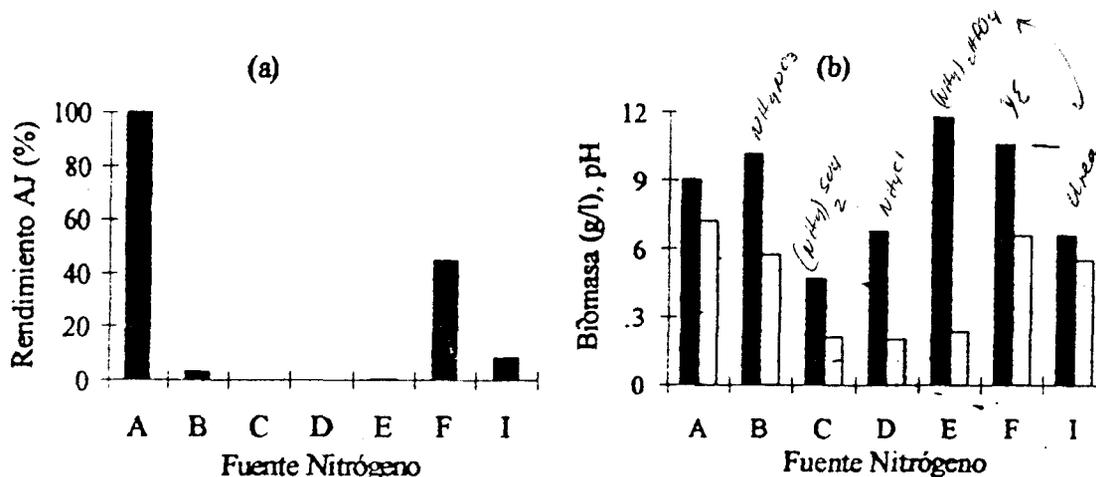


Figura 6.11. Producción de AJ (a), biomasa en barras en negro y pH final en barras en blanco (c), empleando diferentes fuentes de nitrógeno con *B. theobromae* cepa 2434. Fuentes de nitrógeno: A: nitrato de sodio, B: nitrato de amonio, C: sulfato de amonio, D: cloruro de amonio, E: fosfato de amonio dibásico, F: extracto de levadura y I: urea.

El crecimiento alcanzado a los 10 días de fermentación por *B. theobromae* 2434 fue mayor en los medios que contenía nitrato de amonio, extracto de levadura y urea con respecto al

control, sin embargo, para los medios con cloruro de amonio, fosfato de amonio dibasico y

sulfato de amonio el crecimiento fue menor; a su vez éstos últimos presentan un pH inferior a 3, una posible explicación a este comportamiento pueda deberse al hecho de que al irse consumiendo los iones amonio, se genera en el medio una hidrólisis ácida debido a la presencia de los iones cloruros, sulfatos y fosfatos, lo cual resultó muy negativo para el crecimiento del hongo y por ende para la producción del AJ. Este comportamiento es menos acentuado para el caso del nitrato de amonio, posiblemente porque se consumen primero los iones amonio, generándose la hidrólisis ácida por la presencia de los iones nitratos, pero al agotarse los iones amonio, los nitratos son reducidos a nitritos y luego a amonio por la acción de los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa (Pateman y Kinghorn, 1975), lo cual incrementa el pH hasta un valor próximo a 6, además se alcanza un crecimiento mayor al del control y se produzca el de AJ.

Las fuentes de nitrógeno orgánicas ensayadas como el extracto de levadura y la urea no mostraron ser superiores respecto al control de nitrato de sodio, a pesar de que en estas variantes se produce un mayor crecimiento, posiblemente por el hecho de que estos cultivos se desarrollaron en un rango de pH entre 5 y 6, y no alcanzaron el intervalo característico de pH de 7 a 8, que se produce cuando se utiliza nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

## **CONCLUSIONES**

De las fuentes evaluadas para la producción de AJ con *B. theobromae* cepa 2434 ninguna de ellas fue superior al control de nitrato de sodio.

El crecimiento de la cepa fue afectado en los medios que contenían cloruro de amonio, fosfato de amonio dibásico y sulfato de amonio, posiblemente por el efecto del pH, el cual fue inferior a 3 en los medios que contenían estas sales. Este efecto fue menos acentuado en el medio que contenía nitrato de amonio, pudiéndose acumular una pequeña cantidad de AJ en este medio.

De las fuentes de nitrógeno ensayadas las orgánicas como el extracto de levadura y urea mostraron ser superiores a las inorgánicas para la producción de este metabolito.

### **6.2.8 EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITE DE SOYA (PRECURSOR)**

Un precursor se define como aquella(s) sustancia(s) adicionada(s) al medio de fermentación antes o simultáneamente con el proceso, las cuales son incorporadas a la molécula del producto de la fermentación y que incrementa la producción y/o mejora la calidad del producto (Bu'lock; 1965). Los precursores requeridos en las fermentaciones industriales son proporcionados por los constituyentes nutritivos del medio o por la adición de algunos compuestos o por la combinación de ambos. De esta forma el principal criterio para emplear un precursor es que este llegue a ser incorporado al producto de la fermentación.

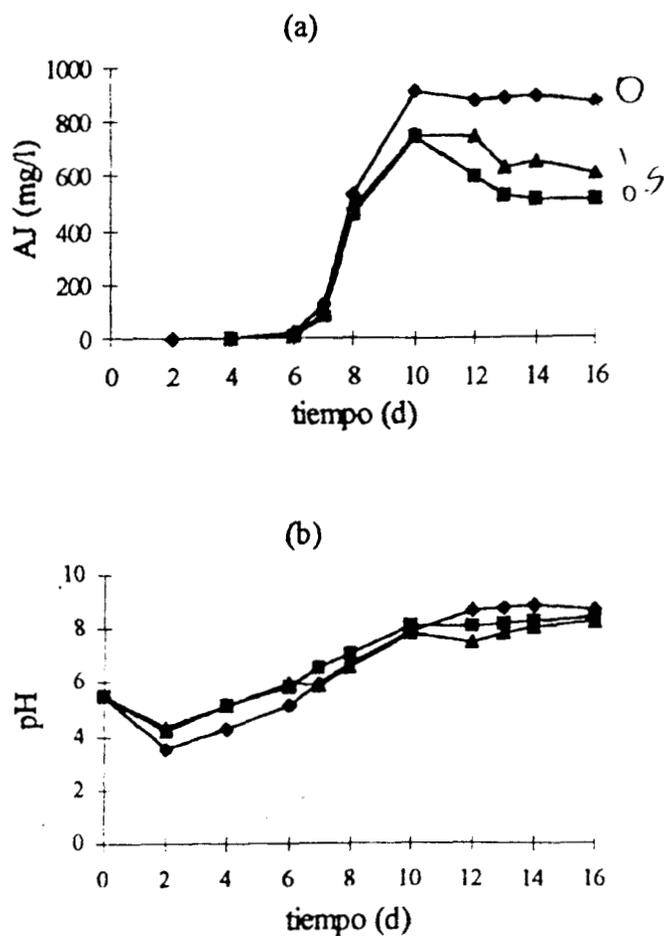
Como precursores de la síntesis de AJ pueden emplearse residuos de la extracción de aceites y harinas de semillas oleaginosas de girasol, soya, colza, entre otros, según reportan Thomas y col. (1989).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho de que el ácido  $\alpha$ -linolénico es el intermediario principal de la síntesis del AJ, se seleccionó el aceite de soya como precursor, con el objetivo de estudiar su efecto en la producción del AJ. En este caso se escogió al aceite de soya, pues se conoce que en su composición se encuentra aproximadamente de 5 a 11 % (v/v) el ácido  $\alpha$ -linolénico (Pylar, 1972).

Se usó un aceite comercial que presenta la siguiente composición: 15 % de ácidos grasos saturados, 22 % de ácidos grasos monoinsaturados y 55 % de ácidos grasos poliinsaturados. Para este estudio se seleccionaron dos dosis de aplicación 0.5 y 1 ml de aceite de soya al medio de cultivo, considerando la concentración de ácido  $\alpha$ -linolénico del 5 % en el aceite de soya comercial, se calcularon los volúmenes a adicionar al medio de cultivo para concentraciones de 900 mg/l y 1800 mg/l de ácido  $\alpha$ -linolénico.

Los ensayos se realizaron empleando el medio Miersch modificado y suplementado con extracto de levadura, inoculados con micelio del hongo e incubados a 30° C y como fuente de carbono sacarosa y fuente de nitrógeno nitrato de sodio. Cabe destacar que el aceite de soya se esterilizó por separado en iguales condiciones que el medio de cultivo.

En la figura 6.11 se muestra el efecto de la adición de un precursor en la producción de AJ.



**Figura 6.12.** Efecto de la adición de aceite de soya (precursor) en la producción de AJ (a) y el pH (B) con *B. theobromae* cepa 2434. Dosis: (◆) 0 ml, (■) 0.5 ml, (▲) 1 ml.

Se puede apreciar que la adición de aceite de soya en las dosis empleadas no provocó un adelanto del inicio de la síntesis del AJ, ni se incrementa significativamente la producción de AJ con respecto al control sin aceite de soya. A los diez días de fermentación, para la dosis de 0.5 ml de aceite de soya se alcanzó una producción máxima de 744 mg/l y para la de 1 ml una producción máxima de 753 mg/l de AJ, mientras que para el control la producción máxima fue de 910 mg/l AJ. La productividad para cada una de las dosis fue la siguiente: para 0.5 ml de: 74.4 mg/l/d, para 1 ml de: 75.3 mg/l/d y para el control de: 91 mg/l/d.

El hecho de no observar un efecto positivo en la adición del aceite de soya puede deberse a la posible descomposición del ácido  $\alpha$ -linolénico por efecto del calor en la esterilización de este material, pues este ácido graso por presentar tres dobles enlaces es muy inestable térmicamente.

Para la dosis de 0.5 ml la producción máxima de AJ se alcanza a los diez días de fermentación y a partir de este momento la concentración del metabolito disminuyó. Mientras que para la dosis de 1 ml de aceite de soya la producción de AJ se mantiene hasta el día 12 de fermentación y luego disminuye. Sin embargo, este comportamiento no se presentó para la variante control, pues se mantuvo prácticamente constante hasta el día 16 la producción del AJ.

Respecto al pH pudo observarse que en todas las variantes el pH disminuye hasta 4 para las variantes a las cuales se le adicionó el precursor y hasta 3.5 para el control al segundo día de fermentación, a partir de este tiempo el pH se incrementa hasta alcanzar valores entre 7 y 8 a los diez días de fermentación.

## CONCLUSIONES

Las dosis utilizadas de aceite de soya-comercial adicionadas al medio de producción de AJ con *B. theobromae* cepa 2434 en las condiciones en que se realizó el experimento no favorecieron la producción de AJ, ni provocaron un adelanto de la síntesis de este metabolito, posiblemente por la descomposición del precursor en este caso el ácido  $\alpha$ -linolénico por efecto del calor en la esterilización. La productividad de las variantes donde se adicionaron el aceite fueron similares y menores a la productividad del control.

### 6.3 CRECIMIENTO SUPERFICIAL DE *Botryodiplodia theobromae*

El crecimiento superficial en medios sólidos es uno de los métodos básicos para estudiar la fisiología de los microorganismos (Pirt, 1975), debido a que el diámetro de las colonias y la velocidad radial de crecimiento (VRC) son parámetros muy empleados en bioensayos y en investigaciones fisiológicas (Trinci, 1969).

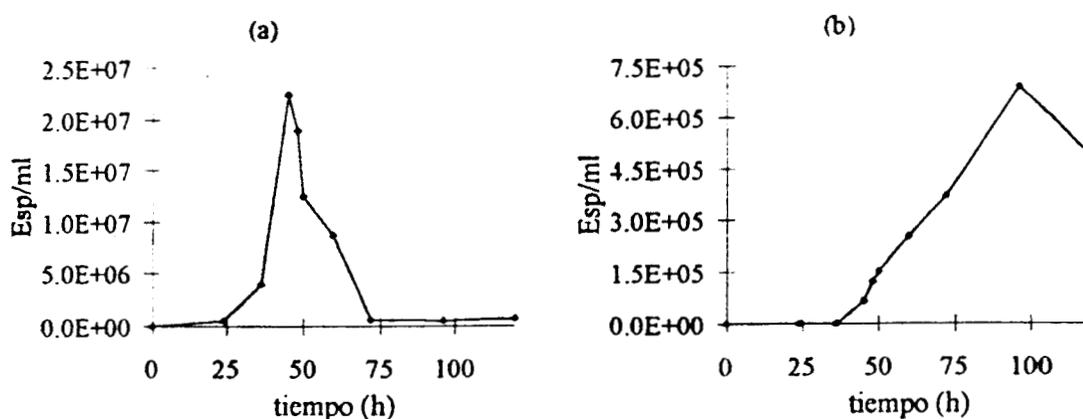
Con vistas a los estudios de producción de AJ por FMS se realizaron ensayos previos del crecimiento superficial de *B. theobromae* en medio sólido considerando su semejanza con la FMS, la cual consiste en que en ambas el crecimiento es apical y tiene su origen desde la superficie del sólido. Se realizaron cinéticas de esporulación de las cepas productoras de AJ en medio líquido en matraces erlenmeyer, enseguida se estudiaron en caja Petri la influencia del medio de cultivo, la temperatura y el pH inicial en la VRC y la densidad de crecimiento de *B. theobromae* cepa 1.

#### 6.3.1. Cinética de esporulación de *B. theobromae* cepas: 1 y 2434.

Las esporas constituyen una parte muy importante para la reproducción, supervivencia y dispersión de los hongos en el ambiente, constituyendo una etapa del ciclo de vida de los mismos. Esta etapa se caracteriza por mínima actividad metabólica, bajo contenido de agua y pérdida del movimiento citoplasmático. Aparte de permitir la sobrevivencia de las especies, las esporas se emplean en el mantenimiento de los cultivos, en la transformación de sustancias químicas y como inóculo en la producción de biomasa o metabolitos (Smith, 1974). Para la preparación del inóculo para la FMS se realizaron cinéticas de esporulación de *B. theobromae* 1 y 2434 con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de producción de esporas. Estos ensayos se realizaron en matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 ml de EMA, inoculando 0.5 ml de una suspensión de esporas obtenidas de un cultivo crecido en tubo inclinado con EMA e incubado a 30° C durante 125 horas. En la figura 6.12 se presentan las cinéticas de esporulación de *B. theobromae* cepas 1 y 2434. Puede apreciarse que para *B. theobromae* 1 entre las 45 y 48 horas se produce la máxima esporulación en el orden de  $2.25 \times 10^7$  esp/ml, y luego a partir de las 60 horas la esporulación disminuye hasta concentraciones del orden de  $10^5$  esp/ml, posiblemente a la germinación de las esporas.

para dar lugar a la formación de más micelio, pues el enheñeyel se cubre completamente de

micelio a las 72 horas de fermentación. La germinación de las esporas ocurre posiblemente por los nutrientes aportados por la lisis de la célula, la cual ocurre por el microorganismo rebasó su fase estacionaria de crecimiento y a la limitación de nutrientes se produce la fase de muerte celular (referencia).



**Figura 6.13.** Cinética de esporulación de *B. theobromae* cepa 1 (a) y 2434 (b) en matraces erlenmeyers y extracto de malta agar.

Para *B. theobromae* cepa 2434 la esporulación comienza a partir de las 50 horas y se hace máxima a las 100 horas de fermentación se alcanzan una concentración de  $6.5 \times 10^5$  esp/ml, tiempo al cual también comienza a disminuir posiblemente por las mismas causas que el comportamiento observado en la cepa 1.

## CONCLUSIONES

En el crecimiento superficial de *B. theobromae* 1 en matraces erlenmeyer en medio EMA la esporulación máxima ocurre entre las 45 y 48 horas de fermentación con un título de  $2.25 \times 10^7$  esp/ml; disminuyendo esta concentración a las 60 horas producto de la germinación de las mismas; mientras que para *B. theobromae* cepa 2434 la esporulación es escasa pues sólo se alcanzan una concentración del orden de  $6.5 \times 10^5$  esp/ml a las cien horas de fermentación.

### 6.3.2 Efecto de la temperatura y del medio de cultivo en el crecimiento superficial de *B. theobromae* cepa 1

Resulta de mucho interés en el caso de estudiar la fisiología de un microorganismo ensayar la utilización de diferentes medios de cultivos y de forma simultánea diferentes niveles de temperatura dentro del intervalo óptimo establecido para el crecimiento. Se espera obtener mejores resultados en cuanto a la velocidad de crecimiento del microorganismo con el aumento de la riqueza del medio empleado y la temperatura adecuada. Se ha observado que en dependencia del origen de la cepa, *B. theobromae* presenta variaciones en su temperatura óptima de crecimiento y las características del crecimiento (Goas y col., 1961). También se ha podido apreciar que la complejidad del medio influye marcadamente sobre el crecimiento del micelio, y por tanto en su velocidad de crecimiento y producción de biomasa (Webster y col., 1970; Peterson, 1976; Gabr y col., 1990).

Considerando las premisas anteriores se realizó un estudio del efecto de la temperatura y medios de cultivos de la velocidad radial y la densidad de crecimiento en cultivo superficial de *B. theobromae* cepa 1 con el objetivo de conocer su fisiología en medio sólido. Debido a que comúnmente en la FMS se ha utilizado como forma de inoculación las esporas del microorganismo a emplear, y como la cepa 2434, presentó una esporulación escasa, se decidió continuar con los estudios de fisiología en medio sólo con la cepa 1.

Para determinar el efecto de la temperatura y el medio de cultivo sobre la densidad de crecimiento y la velocidad radial de *B. theobromae* 1 se utilizaron 4 temperaturas 26, 30, 35 y 40° C y 5 medios: Czapek, Czapek (ajustado a pH 5.6), EMA, PDA y un medio de producción de AJ (MP) según Miersch y col. (1987) y. En la tabla 6.1 se muestran las VCR en función de la temperatura y de los medios de cultivos ensayados.

Tabla 6.4. Efecto de la temperatura y el medio de cultivo en las velocidades de crecimiento radial (VRC).

Medios (*)	Temperatura (°C)	VRC (mm/día)	(*)
Crapek (B)	26	11.550	A
	30	14.048	A
	35	14.260	A
	40	0	B
Czapck (pH 5.6) (A)	26	13.951	A
	30	14.273	A
	35	13.985	A
	40	0	B
EMA (C)	26	13.680	A
	30	12.318	A
	35	12.218	A
	40	0	B
MP (C)	26	13.835	A
	30	10.798	A
	35	11.974	A
	40	0	B
PDA (C)	26	12.972	A
	30	12.317	A
	35	11.985	A
	40	0	B

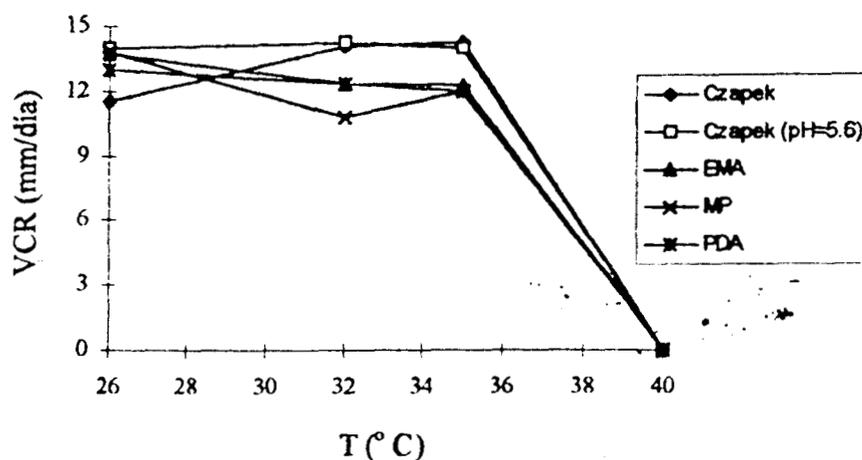
En la tabla 6.4 en la columna de **Medios** se puede observar el efecto de los medios de cultivo en la VRC y en la columna de la extrema derecha de forma similar se puede analizar el efecto de la temperatura sobre la VRC, indicándose en ambas columnas con letras iguales las medias sin diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Puede apreciarse que a 40° C *B. theobromae* cepa 1 no presentó crecimiento alguno en ninguno de los medios utilizados. Para las demás temperaturas y en cada uno de los medios no se observaron diferencias significativas en la VRC. Esto significa que el valor de la VCR en promedio es similar en el intervalo de 26 a 35° C. Este comportamiento pudiera explicarse en base a que esta variable no provoca cambios fisiológicos en el crecimiento a lo largo de la superficie de la caja, lo cual permite un desarrollo similar del micelio, el radio de la colonia y por tanto, en la VCR. A 40° C el desarrollo del micelio se hace nulo.

La VRC mostró niveles entre 10 y 14 mm/día, lo cual indica que es un hongo de crecimiento relativamente rápido si lo comparamos con microorganismos de crecimiento lento, como por ejemplo los hongos ectomicorrízicos. Volke (1995) reporta que *Suillus*

*granulatus* H13, *Amanita rubescens* H38 y *Pisolithus tinctorius* P3 mostraron VRC entre 1.60 y 2.90 mm/d, mientras que *Gibberella fujikuroi* RE11 hongo productor de ácido giberélico mostró una VRC de 3.367 mm/d a 25° C. Los niveles de VRC obtenidos para *B. theobromae* cepa 1 podrían resultar beneficiosos para la producción de AJ por FMS, permitiendo que no se produzcan contaminaciones con otros microorganismos.

Respecto al medio de cultivo se observa que hay diferencias significativas en el crecimiento radial como efecto de esta variable. El medio Czapek y el Czapek (ajustado a 5.6) influyen de forma significativa en la VCR, siendo ligeramente superior la VRC para el medio Czapek (ajustado a pH 5.6); mientras que para los medios de EMA, MP y PDA no se observaron diferencias significativas en el crecimiento radial por efecto del medio (Figura 6.13).



**Figura 6.14.** Efecto de la temperatura y el medio de cultivo en la velocidad radial del cultivo superficial de *B. theobromae* cepa 1.

En la tabla 6.5 en la columna de **Medios** se puede observar el efecto de los medios de cultivo sobre la densidad de crecimiento de *B. theobromae* cepa 1 y en la columna de la extrema derecha de forma similar se puede analizar el efecto de la temperatura sobre la densidad de crecimiento, indicándose en ambas columnas con letras iguales las medias sin diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). La densidad de crecimiento a 40° C y en todos los medios es nulo. Para la demás temperaturas y en todos los medios se observan diferencias significativas para la densidad de crecimiento. En general

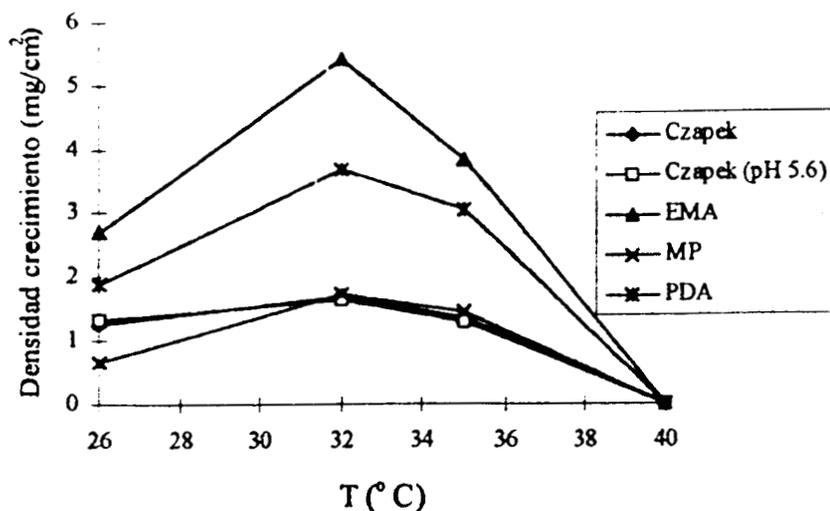
a 32 y 35° C se obtuvieron la mayores densidades de crecimiento, siendo máxima a 32° C en todos los casos.

**Tabla 6.5.** Efecto de temperatura y el medio de cultivo en la densidad de crecimiento ( $\rho_x$ )

Medio (*)	Temperatura (° C)	$\rho_x$ (mg/cm <sup>2</sup> )	*
Czapek (C)	26	1.243	C
	30	1.632	A
	35	1.291	B
	40	0	D
Czapek (pH 5.6) (C)	26	1.314	B
	30	1.632	A
	35	1.291	B
	40	0	C
EMA (A)	26	2.712	C
	30	5.418-	A
	35	3.861	B
	40	0	D
MP (D)	26	0.686	C
	30	1.735	A
	35	1.448	B
	40	0	D
PDA (B)	26	1.850	C
	30	3.675	A
	35	3.072	B
	40	0	D

(\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )).

Para los medios de cultivos ensayados también existen diferencias significativas en la densidad de crecimiento debidas al diferente grado de complejidad de los medios de cultivos ensayados. Pudo notarse que el MP es el más pobre de los ensayados, le siguen en orden ascendente el medio Czapek y el medio Czapek (ajustado a pH 5.6) sin diferencias significativas entre estos, y finalmente, los medios más ricos para el crecimiento de *B. theobromae* cepa 1 son PDA y EMA en este orden (ver figura 7.13).



**Figura 6.15.** Efecto de la temperatura y el medio de cultivo en la densidad de crecimiento en el cultivo superficial de *B. theobromae* cepa 1.

Un análisis de los resultados sobre el efecto de la temperatura en cada medio por separado de la VRC y la densidad de crecimiento muestra que la velocidad a que se expande la colonia es similar en promedio a las temperaturas ensayadas (excepto a 40° C), mientras que para la densidad de crecimiento alcanza un máximo a 32° C. Este comportamiento posiblemente se deba a que a esta temperatura se favorece una mayor frecuencia de ramificación de la hifa, permitiendo de esta forma la producción de más biomasa en la misma área superficial de medio (Righelato, 1975).

El análisis de los resultados obtenidos sobre el efecto que provoca el medio de cultivo en la VRC y la densidad de crecimiento muestra que existe una relación inversa entre ambas variables. La disminución en la riqueza del medio provocó un aumento de la VRC y un disminución de la densidad de crecimiento. Este comportamiento esencialmente pudiera explicarse en base a que al disminuir la riqueza del medio de cultivo el microorganismo tiende a desarrollar una menor frecuencia de ramificación de las hifas a un mayor crecimiento apical, para poder tener acceso a los nutrientes necesarios para su metabolismo, los cuales se encuentran menos disponibles por estar deficientes en el medio.

### B. Efecto del pH

Se conoce que el pH del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que influyen sobre el crecimiento de los microorganismos. Es por esta razón que se estudió el crecimiento de *B. theobromae* cepa 1 a diferentes valores de pH inicial del medio de cultivo. Para determinar el efecto del pH sobre la VRC y la densidad de crecimiento se seleccionó el EMA como medio de cultivo y una temperatura de 32° C, debido a que estas fueron las mejores condiciones para el crecimiento de *B. theobromae* 1 determinadas en el epígrafe anterior. El pH se evaluó en un rango de 5 a 10. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 6.6 y 6.7.

Puede observarse que tanto la VRC como la densidad de crecimiento no son significativamente diferentes en el rango de pH estudiado. Esto quiere decir que el crecimiento de este microorganismo no es afectado apreciablemente por el pH del medio de cultivo para el rango de estudio.

Hewitt y col. (1971) señalaron que algunas hongos de la familia *Diplodia* pueden alterar el pH tanto en el medio líquido como sólido en el periodo de crecimiento y esporulación alterando estos procesos. Esto sugiere que *B. theobromae* cepa 1 se encuentra adaptado a condiciones de en un amplio rango de pH sin afectación del crecimiento del mismo.

Tabla 6.6. Efecto del pH en la velocidades de crecimiento radiales (VRC)

pH	VRC (mm/día)	*
5.0	13.032	A
5.6	13.048	A
7.0	13.075	A
8.0	13.062	A
9.0	13.065	A
10.0	13.102	A

(\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ))

Tabla 6.7.. Efecto del pH en la densidad de crecimiento ( $\rho_x$ )

pH	$\rho_x$ (mg/cm <sup>2</sup> )	*
5.0	5.573	A
5.6	5.779	A
7.0	5.890	A
8.0	5.897	A
9.0	5.880	A
10.0	5.567	A

(\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ))

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Yaguchi y Nakamura (1992) los cuales encontraron que el efecto del pH del medio en el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en PDA no fue significativo, mostrando un buen crecimiento en un rango de pH de 4 a 10. Hewitt y col. (1971) observaron dos máximos de crecimiento en hongos de esta especie crecidos en PDA, el primero se presentó en un rango de pH entre 4.5 y 5, y el otro a 7.1.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos puede decirse que *B. theobromae* cepa 1 es poco sensible a cambios de temperatura, ya que no se observan diferencias en el crecimiento por efecto de esta variable en los medios ensayados. La cepa no presentó crecimiento alguno a 40° C ni en ninguno de los medios ensayados.

En general pudo observarse que al disminuir la riqueza del medio aumentó la VRC de cultivo, mientras que la densidad de crecimiento disminuyó. Para el medio EMĀ y a una temperatura de 32° C se obtiene la mayor densidad de crecimiento de *B. theobromae* con respecto a las demás condiciones experimentales ensayadas.

El pH inicial del medio (EMA) y a una temperatura de incubación de 32° C no influye significativamente en la densidad de crecimiento y la VRC de crecimiento de *B. theobromae* cepa 1 en el rango de pH de 5 a 10.

## 6.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO JASMÓNICO POR FMS

Dada la potencialidad de la FMS para la producción de metabolitos secundarios según se pudo apreciar en la revisión bibliográfica, se estudió la producción de AJ empleando este tipo de cultivo, incluyendo los factores nutricionales que afectan la producción de este tipo de sustancias: como la concentración de nutrientes, el tipo de fuente de nitrógeno y la rC/N.

### 6.4.1 Efecto de la concentración de los nutrientes del medio de cultivo

En los sistemas para la producción de proteínas por FMS es frecuente sólo el empleo de sales minerales y agua para balancear el medio de cultivo. Pero la producción de metabolitos secundarios requiere la suplementación de otros compuestos como glucosa, sacarosa, sales, vitaminas, etc, para estimular el crecimiento, la producción de enzimas, la degradación de materiales lignocelulósicos, la prolongación de la producción de metabolitos secundarios, entre otras (Mudgett, 1986).

Los estudios de optimización del medio de cultivo mediante técnicas estadísticas permiten la obtención de altos rendimientos y conocer los factores claves, precursores, y los nutrientes que regulan la producción de los metabolitos, entre otros. Por ejemplo, en la producción de alcaloides en FMS de granos de centeno se identificó a la sacarosa (250 g/l) como uno de los factores claves, junto con el triptofano (precursor) y el fosfato como nutriente limitante para obtener una alta producción (Trejo, 1992).

Se ha podido comprobar que en la FMS la concentración de los nutrientes en el medio puede incrementarse respecto a las usadas en el cultivo en sumergido, sin que se produzcan inhibición por el sustrato, por ejemplo, Barrios y col. (1988) encontraron que la producción de penicilina con *Penicillium chrysogenum* se ve favorecida por el aumento al doble de las concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo convencional, también estos autores señalaron que es posible con el medio más rico disminuir los tiempos de producción de la penicilina respecto del cultivo líquido. Por lo que decidió estudiar el efecto de la concentración de los nutrientes y observar si el aumento de la concentración de nutrientes del medio reportado por Miersch y col. (1987) para el cultivo líquido, incrementa la producción de AJ por FMS y su productividad.

El medio mas concentrado empleado es el mismo que se utilizó en los estudios de producción de AJ por cultivo líquido. Éste medio presentó 2.5 veces la concentración de nitrógeno, 10 veces la concentración de fósforo y para las sales el triple de concentración con respecto al medio Miersch según se detalla en el epígrafe 5.2. Se utilizó la misma concentración de sacarosa del medio original, resultando una rC/N de 17. Para la preparación del medio de fermentación se procedió según se detalla en el epígrafe 5.4.2.

En la figura 6.15 se presentan las cinéticas de producción de AJ, el consumo de los azúcares procedentes de la inversión de la sacarosa, el comportamiento de la humedad del soporte y el pH de *B. theobromae* cepa 1 para los medios Miersch y Miersch modificado.

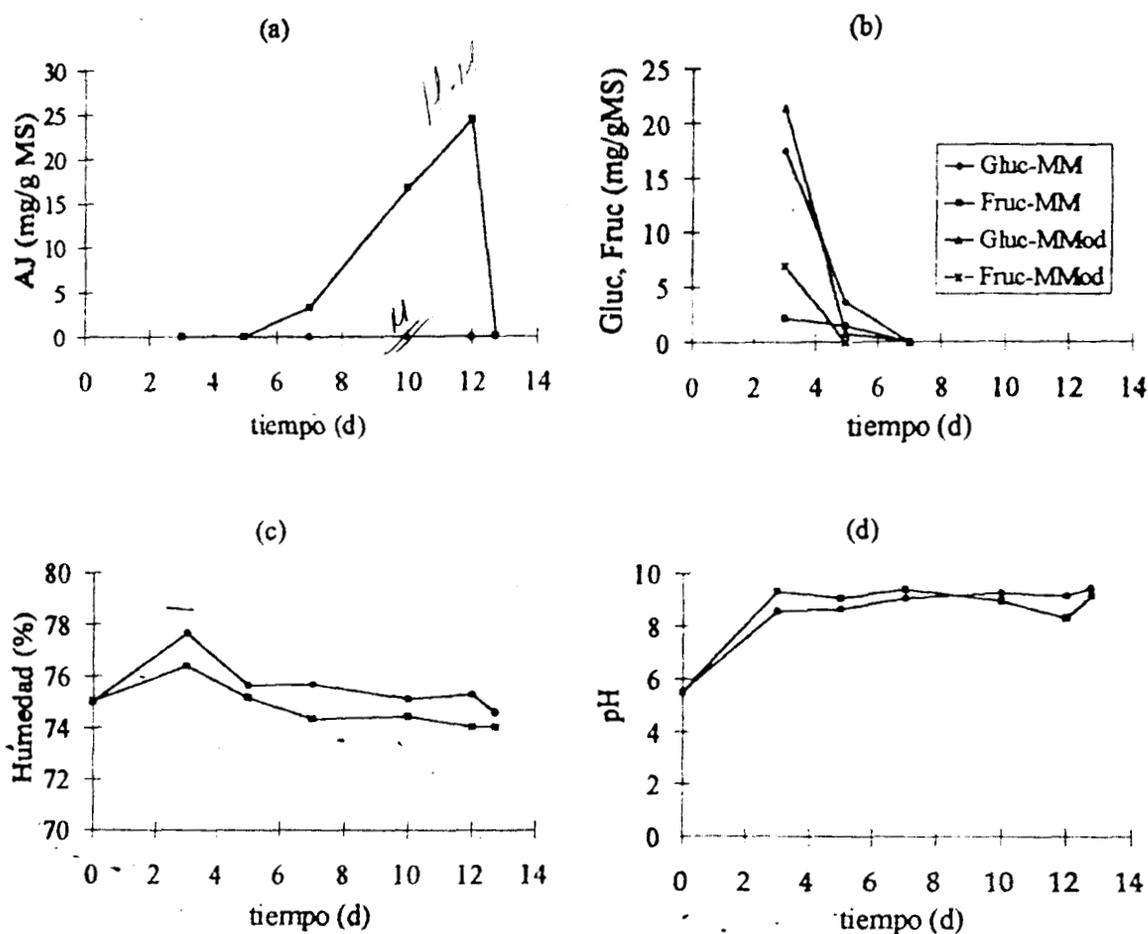


Figura 6.16. Cinéticas de producción de AJ (a), consumo de glucosa (Gluc) y fructosa (Fruc) (b), comportamientos de la humedad del soporte (c) y pH del medio (d) con *B. theobromae* cepa 1 y para los medios ensayados: Medio Miersch (MM) (●), Medio Modificado (MMod) (■)

Puede notarse que para el medio modificado se sintetizó el AJ, mientras que para el medio Miersch no ocurrió la síntesis del metabolito. La producción de AJ en el medio modificado comenzó aproximadamente a los siete días de fermentación y se hizo máxima a los 12.5 días, donde se alcanzó una concentración del orden de los 24 mgAJ/g de materia seca (MS) para posteriormente disminuir hasta 0, debido posiblemente a que es consumido por el hongo ya que el medio está limitado en nutrientes y posiblemente se encuentre en fase de lisis celular. También es notable que la producción máxima de AJ por FMS se alcanzó más rápidamente que la obtenida por cultivo líquido (ver epígrafe 6.2.1).

La sacarosa es invertida por el hongo a sus monómeros correspondientes, y son rápidamente consumidos hasta los 5 días para el medio modificado y a los siete días para el medio Miersch, a partir de estos tiempos los azúcares se encontraron agotados. Para los dos medios la fructosa es consumida más rápidamente que la glucosa, a diferencia de lo observado en el cultivo líquido donde ocurre un comportamiento inverso.

Se puede observar que la humedad inicial del soporte en las dos variantes en estudio se incrementa ligeramente al tercer día de fermentación de 75 % hasta 77.6 % para el medio modificado y 76.4 % para el medio Miersch, lo cual es debido a la actividad metabólica del microorganismo, a partir del quinto día la humedad se mantuvo constante en ambas variantes y en alrededor del 75 % para el medio modificado con un ligero incremento en el día 12, y en 74 % para el medio Miersch

En cuanto al pH del medio puede notarse que ésta variable se incrementó rápidamente en las en los dos medios ensayados de 5.5 hasta llegar a estar por encima de 9, para la variante con el medio modificado se alcanzó más rápidamente este valor y seguidamente se mantuvo constante. El pH del medio modificado disminuye ligeramente a partir del día diez de fermentación y se restablece al día trece. Esta disminución del pH puede asociarse a la acumulación de AJ en el medio, pues coincide en el tiempo con la máxima producción del metabolito. El pH para ambas variantes alcanzó niveles mayores comparados con los obtenidos en el cultivo líquido, en los cuales en ningún caso rebaso el pH de 9.

la literatura para el cultivo en medio líquido. La producción de AJ ocurrió al los 12.5 días de la fermentación con un título de 24 mg/gMS y a pH alcalino.

La producción de AJ por FMS mostró rasgos característicos que la diferencian del cultivo líquido en cuanto a que se consume primero la fructosa que la glucosa, el pH final alcanzó un valor por encima de 9 y que en condiciones semejantes de medio de cultivo y ambientales la producción máxima del metabolito ocurrió más rápidamente mediante la FMS.

#### **6.4.2 Efecto del tipo de fuente de nitrógeno**

Los estudios del efecto del pH sobre la VRC y la densidad de crecimiento de *B. theobromae* cepa 1 pudieron confirmar que el pH del medio no tiene una influencia significativa en el crecimiento de este hongo. Pero no se conoce exactamente la influencia del pH en la producción del AJ, y como la cinética de producción de AJ del experimento anterior se desarrolló a pH por encima de 9, se decidió evaluar otra fuente alternativa de nitrógeno, que posibilitará reducir el pH del medio. En este caso se seleccionó como fuente alternativa de nitrógeno al sulfato de amonio y como control el nitrato de sodio, manteniendo la misma concentración de nitrógeno en el medio. En la figura 6.16 se presentan las variaciones del pH, las cinéticas de consumo de los azúcares y producción del AJ para *B. theobromae* cepa 1, manteniendo las demás condiciones experimentales constantes. El pH para el medio que contiene sulfato de amonio comenzó a disminuir rápidamente a partir del primer día de fermentación hasta un valor aproximado de 3, manteniéndose este pH durante todo el tiempo que se desarrolló el experimento. Este comportamiento posiblemente se deba al hecho de que a partir de las primeras horas y producto del consumo del nitrógeno, se genera una hidrólisis ácida de la sal, a partir de los iones sulfatos, produciéndose un medio ácido. Por otro lado, en el medio que contiene el control de nitrato de sodio, se comportó de forma muy similar al experimento anterior.

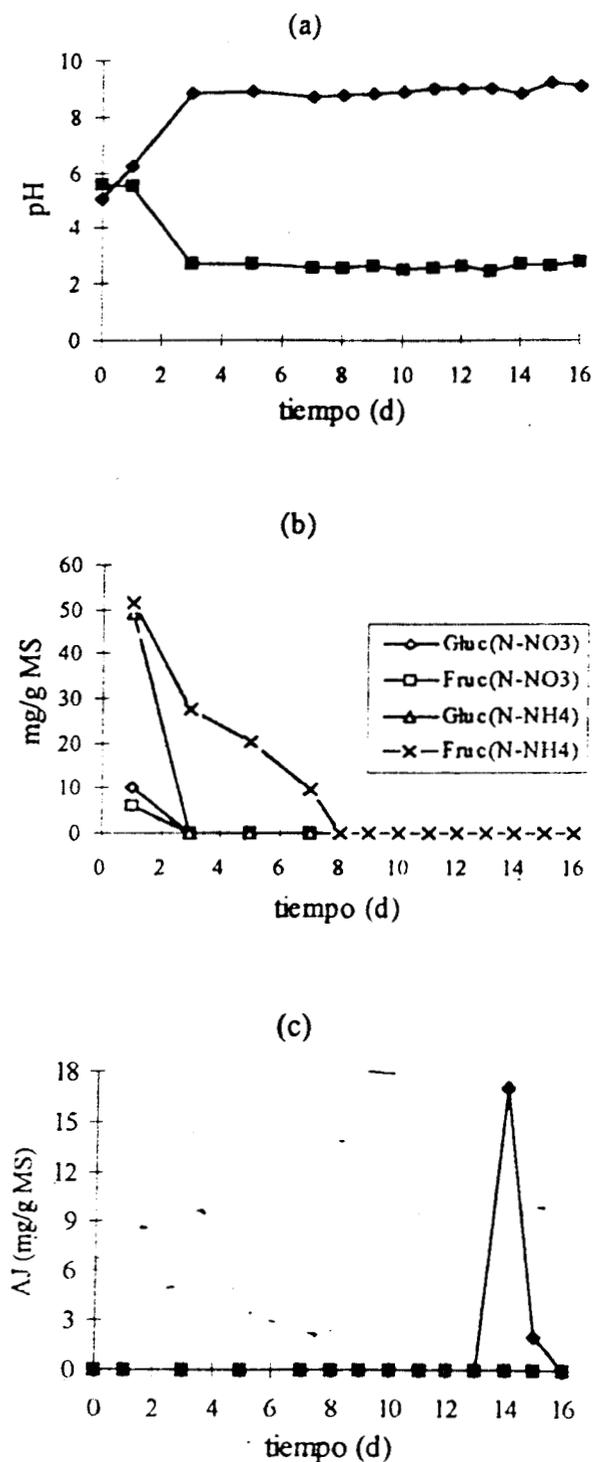


Figura 6.17. Comportamiento del pH (a), cinéticas del consumo de azúcares (b) y producción de AJ (c) con *B. theobromae* cepa 1 por FMS empleando sulfato de amonio (♦) y nitrato de sodio (■) como fuentes de nitrógeno.

Respecto al consumo de los azúcares, puede observarse el efecto adverso del pH en el caso del medio que contiene sulfato de amonio, pues los azúcares se agotan al día ocho, mientras que en el medio control se agotan aproximadamente al tercer día de fermentación. También se pudo apreciar que el medio con el sulfato se consume primero la glucosa que la fructosa.

Podemos asumir que el crecimiento del hongo, en condiciones de acidez se inhibió al ocurrir un retardo en el consumo de los azúcares.

La producción del AJ fue afectada también por el efecto del pH, según se aprecia en la figura 7.15.D, donde no hay producción para el medio que contiene sulfato de amonio. Para el medio control se produjo una concentración del orden de los 18 mg/gMS de AJ al día 14 de fermentación, pasados dos días más la producción del metabolito fue nula.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la producción de AJ por fermentación en medio líquido con *B. theobromae* 2434, cuando se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de este metabolito (epígrafe 6.2.7)

## CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento permiten concluir que la producción de AJ se ve afectada severamente por el pH y el tipo de fuente de nitrógeno utilizada para la fermentación. La producción de AJ se favoreció a pH por encima de 9, y en presencia de sales nitrogenadas que aporten una hidrólisis alcalina al medio.

El pH generado en el medio con sulfato de amonio también afectó la velocidad con que se consume los azúcares, por lo que se puede asumir que también se afectó el crecimiento de *B. theobromae* cepa 1.

### 6.4.3 Efecto de la relación C/N

Como se vio en el epígrafe 6.2.1 la rC/N influye apreciablemente en la producción de AJ con *B. theobromae* en medio líquido, ya que de la rC/N ensayadas, con la de 17, se obtuvo la mayor producción de AJ. Por esta razón decidimos estudiar el efecto de esta variable en la producción de este metabolito por FMS.

Este experimento se desarrolló utilizando rC/N de 17, 35 y 70, manteniendo la concentración de carbono inicial constante y variando la concentración de nitrógeno del nitrato de sodio, de forma similar al experimento del efecto de la rC/N en la producción de AJ en medio líquido, y todas las demás condiciones de la FMS constantes.

En la figura 6.17 se presentan las cinéticas de producción de AJ, el consumo de azúcares y el comportamiento del pH para las diferentes rC/N ensayadas.

Respecto a la producción de AJ puede observarse que se producen 18.4 mg de AJ/gMS en la variante con rC/N 17 a los 14 días de fermentación, disminuyendo esta concentración hasta el día 16, donde la producción fue nula. En las demás variantes no se detectó la presencia de este metabolito.

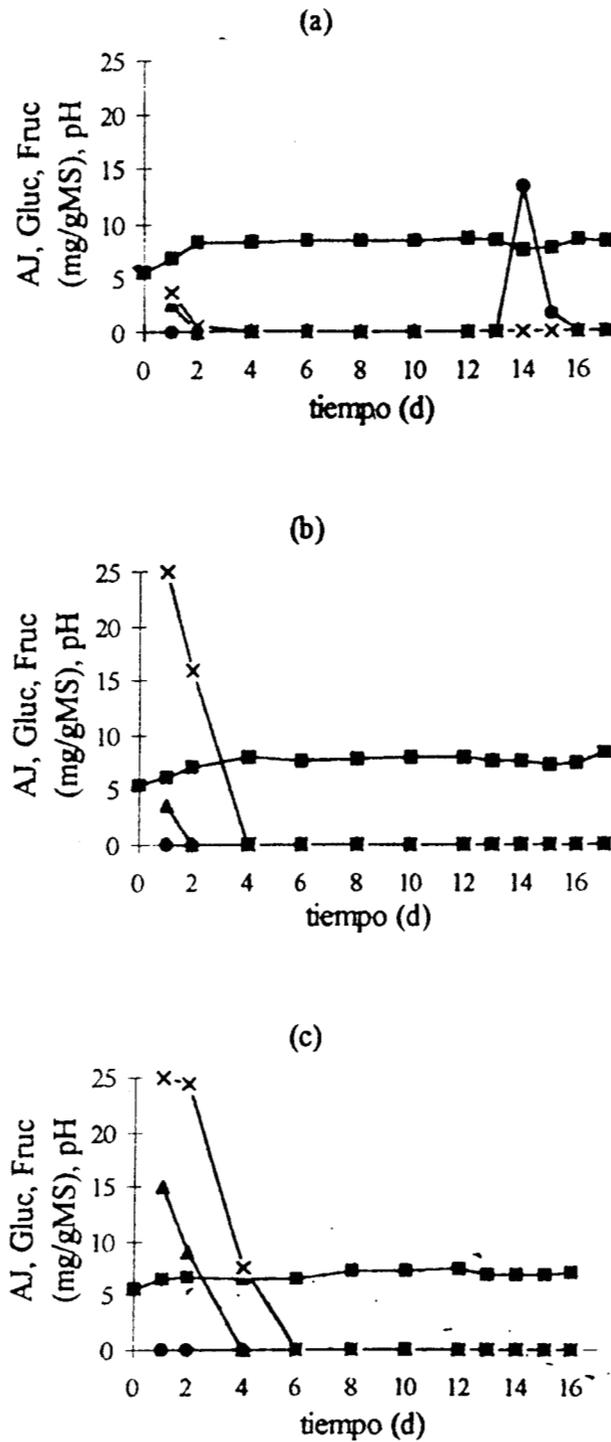


Figura 6.18. Cinéticas de la producción de AJ (●), consumo de glucosa (Gluc) (▲), fructosa (Fruc) (x), y comportamiento del pH (■) con *B. theobromae* cepa 1 con diferentes rC/N (a: 17, b:35; c:70).

Puede verse como la limitación en nitrógeno en el medio, provocó un comportamiento diferente en cuanto a la velocidad con que son consumidos los azúcares, así por ejemplo, los azúcares de la rC/N 17 se agotan al segundo día de fermentación, mientras que para la rC/N 35, esto ocurre al cuarto día, por último para la rC/N 70 los azúcares se agotan al 6 día de fermentación. Es evidente a que a medida que aumenta la rC/N la velocidad con que se consumen los azúcares se hace menor.

Respecto al pH puede observarse también un comportamiento diferente para las variantes en estudio, pues el valor de esta variable se incrementa hasta valores aproximados de 7 para la rC/N 70, a 8 para la rC/N 35 y para la rC/N 17 llegan a estar por encima de 9, disminuyendo ligeramente su valor entre el día 14 y 16 de fermentación, posiblemente asociado a la acumulación de AJ en el medio.

En la figura 6.18 se presentan las curvas de velocidad de producción de bióxido de carbono (mg/h.gMSI) en función del tiempo para las rC/N ensayadas.

Puede observarse en todas las variantes una primera etapa donde la velocidad de producción del bióxido de carbono es cero, ésta etapa se asocia a la fase lag o de adaptación del microorganismo al nuevo medio. Esta fase ocurre aproximadamente por un día para las rC/N 17 y 70, mientras que para la rC/N 35 dura 1.5 días.

La velocidad de producción de bióxido de carbono se incrementa rápidamente y exponencialmente hasta que se hace máxima al segundo día para la rC/N 17 con un valor de aproximado de 2.9 mg/h.g MSI y al tercer día para la rC/N 35 y 70 con valores de 2.3 y 1.3 mg/h.g MSI. Esta segunda fase se asocia al crecimiento rápido del hongo. Posteriormente la velocidad disminuye en todas las variantes: para la rC/N 17 ocurre hasta el cuarto día de fermentación, a partir del cual la velocidad se mantiene prácticamente constante hasta el día 17. Esta etapa se asocia a la fase estacionaria del crecimiento, que es donde se produce la acumulación del AJ pasado este tiempo la velocidad llega a cero coincidiendo con la fase de lisis celular. Para las demás variantes la velocidad disminuye y llega a cero a los 10 y 13 días para la rC/N 35 y 70, respectivamente, cabe destacar que no se apreció el desarrollo de la fase estacionaria como en el caso anterior, lo cual podría explicar que no produjera el metabolito en estas variantes.

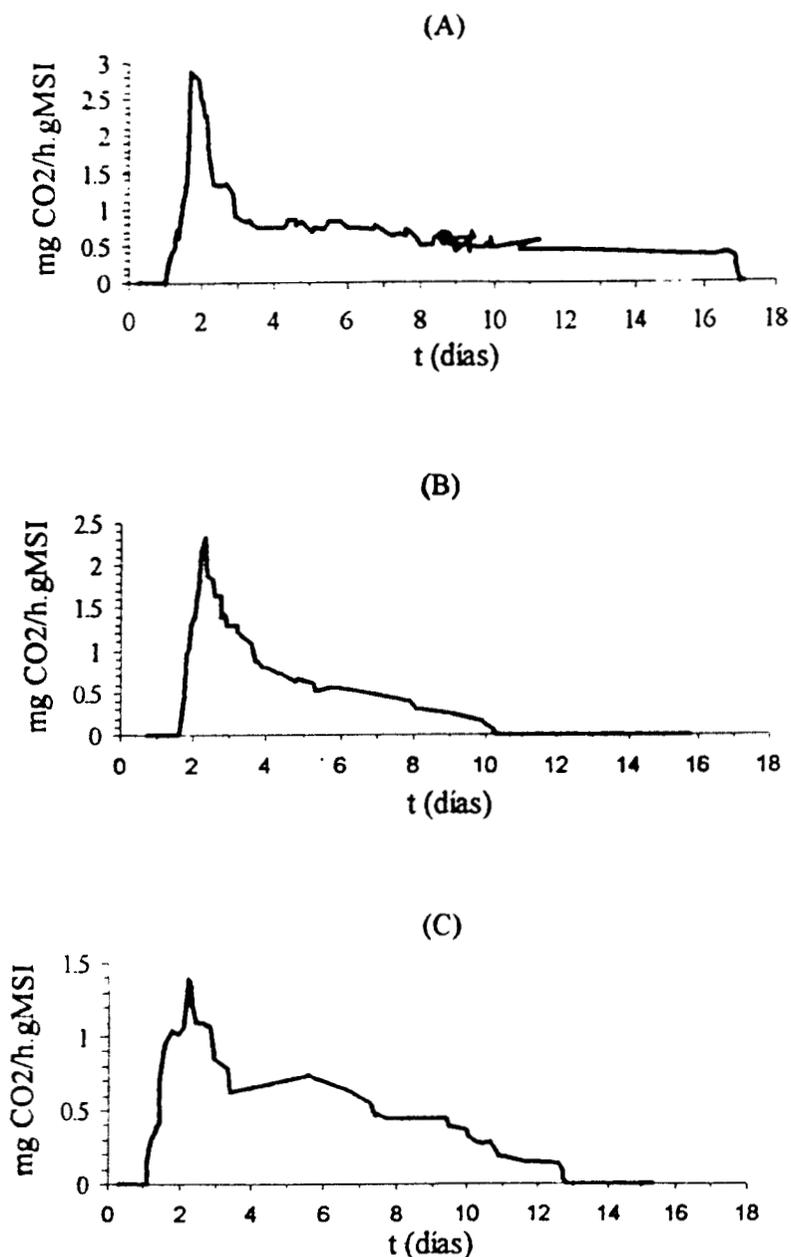


Figura 6.19. Efecto de la rC/N en la producción de bióxido de carbono para las rC/N ensayadas con *B. theobromae* cepa 1 y por FMS.

## CONCLUSIONES

La rC/N también tiene una influencia marcada en la producción de AJ por FMS con *B. theobromae* cepa 1, pues el metabolito sólo se produjo en la variante con rC/N 17, en las demás no se detectó la presencia del mismo.

## *Resultados y discusión*

La limitación en nitrógeno en el medio de cultivo provocó una disminución en la velocidad con que se consumen los azúcares en el medio.

Las curvas de velocidad de producción de bióxido de carbono en función del tiempo mostraron que la duración de la fase estacionaria de la variante con una rC/N 17 fue mayor que la alcanzada para las variantes con rC/N 35 y 70, lo cual podría explicar porque no se produce el AJ en la variante en las variantes con rC/N 35 y 70.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ Las cepas que presentaron mayor capacidad para producir AJ por cultivo líquido en cuanto a los rendimientos  $Yx/s$ ,  $Yp/s$  y la productividad fueron: la 2434 y la 1.
- La  $rC/N$  influyó marcadamente en la producción de AJ en tanto se favoreció a la  $rC/N$  17 en cuanto a la producción específica y la productividad. Mientras que a la  $rC/N$  se favoreció la producción de glicerol y la acumulación de ácido cítrico.
- ◆ Se mejoró la productividad del AJ al emplear la inoculación con micelio de *B. theobromae* cepa 1, respecto a la inoculación con esporas en 1.7 veces, pues se redujo considerablemente el tiempo en que se alcanza la fase estacionaria, que es donde se acumula el metabolito.
- La adición de extracto de levadura al medio de cultivo en la producción de AJ con *B. theobromae* cepa 1, también provocó un aumento de la productividad en 1.3 veces respecto del medio control sin extracto de levadura, posiblemente por el aporte de vitaminas y cofactores que favorecen el metabolismo para la producción del metabolito.
- ◆ La mejor temperatura para la producción de AJ de las cepas 1 y 2434 fue de 30° C.
- ◆ La agitación a las velocidades ensayadas de 50, 100 y 150 rpm provocaron un efecto negativo en la síntesis del AJ con *B. theobromae* 2434 ya que se redujo apreciablemente la producción.
- Los mejores sustratos respecto del control (sacarosa) para la producción de AJ con *B. theobromae* cepa 2434 fueron la glucosa y fructosa. Mientras que para la fuente de nitrógeno ninguna de las ensayadas demostró ser superior al control de nitrato de sodio.

● La cepa 1 presentó una esporulación máxima entre las 45 y 48 horas con un título de  $2.25 \times 10^7$  esp/ml, mientras que para la cepa 2434 la esporulación fue escasa, pues se alcanzó un título de  $6.50 \times 10^5$  esp/ml a las cien horas de fermentación en medio EMA y a  $32^\circ \text{C}$ .

● La VRC se vio afectada por la composición del medio de cultivo, mientras que la temperatura no afectó de manera significativa esta variable. Para la densidad de crecimiento, el medio compuesto por EMA y a una temperatura a  $32^\circ \text{C}$  se obtuvo la mayor densidad de crecimiento. El pH inicial del medio no influye significativamente en la VRC y la densidad de crecimiento.

● Se demostró que es necesario el uso de medios más concentrados para obtener el AJ por FMS que el reportado en la literatura para la producción de este metabolito por cultivo líquido. Se alcanzó una producción máxima de 20 mgAJ/gMS con el medio más concentrado, mientras con el medio reportado por la literatura la producción fue nula.

● La producción de AJ por FMS también es afectada por el pH del medio generado por la hidrólisis de las sales utilizadas. Al emplear sulfato de amonio la síntesis de AJ no ocurrió pues se alcanzó un pH de 3, mientras que para el control se alcanzó una producción máxima de 18 mg AJ/gMS, el pH se mantuvo por encima de 9 durante el desarrollo de la fermentación.

◆ La rC/N también influyó marcadamente en la producción de AJ por FMS pues la síntesis de este metabolito ocurrió a la rC/N 17 hasta una concentración de 18.4 mgAJ/gMS, mientras que para las rC/N 35 y 70 no se detectó la presencia de este metabolito.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M.; Shibaoka, H.; Yamane, H.; Takabashi, N. (1990) Cell Cycle Dependent Disruption of Microtubules by Methyl Jasmonate in Tobacco BY-2-cell. *Protoplasma* 156:1-8.
- Alain, A. (1994) Biological Agriculture and Sustainable Development. *Medecin Veterinaire du Quebe. Spec Issue*:51-52.
- Aldridge, D.; Gatts, S.; Giles, D.; Turner, W.B. (1971) Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J. Chem. Soc., Sec C*:1623-1627.
- Anderson, J.M. (1988) Jasmonic Acid-dependent Increase in the Level of Specific Polypeptides in Soybean Suspension Culture and Seedlings. *J. Plant of Growth Regul.* 7:203-211.
- Anderson, J.M.; Spilatro, S.R.; Klauer, S.F.; Francechi, V.R. (1989) Jasmonic Acid-dependent Increase in the Level of Vegetative Storage Proteins in Soybean. *Plant Sci.* 62:45-52.
- Appenroth, K.J.; Dathe, W.; Hertel, W.; W. Augsten, H. (1991) Photophysiology of Turion Germination in *Spirodela polyrhiza* (L). Schleiden. VII. Action of Jasmonic Acid. *J. Plant Physiol.* 138:345-349.
- Barendse, G.W.M.; Croes, A.F.; Van den Ende, G.; Bosveld, M.; Creemers, T. (1985) Role of Hormones on Flower Bud Formation in the Thin Layer Explants of Tobacco. *Biol. Plant.* 27:408-412.
- Barrios, J.; Tomasini, A.; Viniegra-González, G.; López, J. (1988) Penicillin Production by Solid State Fermentation. *Biotechnol. Letters* 10:793-798.
- Barrios, J.; Castillo, T.; Domínguez, M.; Durán, O.; Flores, V.; Miranda, L.; Méndez, S.; Pérez, C.; Mejía, A. (1993) Producción de penicilina por fermentación sólida: estudios básicos y desarrollo de proceso. VII Jornada de Biotecnología, Resúmenes *in extenso*, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.
- Barrios, J.; Tomasini, A.; Mejía, A. (1995) Factores que controlan el metabolismo secundario en fermentación en estado sólido. VII Jornada de Biotecnología, Resúmenes *in extenso*. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.
- Barstow, L.M.; Dale, B.E.; Tengerdy, R.P. (1988) Evaporative Moisture and Temperature Control in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Techniques* 2:233-236.
- Berestetzky, V.; Dathe, W.; Daletskaya, T.; Musatenko, L.; Sembdner, G. (1991) Jasmonic Acid in Seed Dormancy of *Acer tataricum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187:13-19.
- Borrows A.; Jeffrey, E.G.; Kessel R.N.; Lloyd, E.C.; Lloyd, F.B.; Nixon, I.S. (1961) The Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in Stored Culture. *Can. J. of Microbiol.* 1:227-276.

- Broadbent, D. (1968) GB Patent 1286266 C07C61/36. Imperial Chemical Industries. Great Britain. Jasmonic Acid.
- Bu'lock, J.D. (1961) Intermediary Metabolism and Antibiotic Synthesis. *Advances Appl. Microbiol.* 3:293-342.
- Bu'lock, J.D. (1965) The Biosynthesis of Natural Products. An Introduction to Secondary Metabolism. McGraw-Hill Publishing Company Limited, Great Britain, 40-41 p.
- Bu'lock, J.D. (1974) Secondary Metabolism in Fungi and Its Relationship to Growth and Development. In: The Filamentous Fungi. Industrial Mycology. Eds Smith, J.E., Berry, D.R. Edward Arnold, London.
- Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980) Solid State Fermentation Systems. *Proc. Biochem.* 15:2-7.
- Cobas, D. (1985) La acumulación de la sacarosa en la caña de azúcar: papel de las invertasas solubles y efecto fisiológicos de algunos reguladores del crecimiento. Tesis de doctorado, Instituto de Investigaciones de la Caña, Ciudad de la Habana, Cuba, p. 110.
- Cohen, Y.; Gisi, U.; Niderman, T. (1993) Local and Systemic Protection against *Phytophthora infestans* Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl Ester. *Phytopathology* 83:1054-1062.
- Crabalona, L. (1967) Presence of Levorotatory Methyl Jasmonate, Methyl Cis-2(2-pentenyl)-3-oxocyclopentenyl Acetate in the Essential Oil of *Tunisian Rosemary*. *C. R. Acad. Sci. Paris. Sec. C.* 264:2074-2076.
- Cross, B.E.; Webster, G.R. (1970) New Metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part XV N-Jasmonoyl and N-dihydrojasmonoyl-isoleucine. *J. Chem. Soc. Sec. C*:1839.
- Dathe, W.; Ronsch, W.; Preiss, A.; Schade, W.; Sembdner, G.; Schreiber, K. (1981) Endogenous Plant Hormone of the Broad Bean, *Vicia faba L.* (-)-Jasmonic Acid, a Plant Growth Inhibitor in Pericarp. *Planta* 153:530-535.
- Dathe, W.; Miersch, O.; Sembdner, G.; Kochmann, W.; Kunchel, F.; Reinhardt, P. (1990) Patentschrift DD 276025 A1, Akademie der Wissenschaften, Deutsche Demokratische Republik Mittel zur Ertragssteigerung bei Erdbeeren.
- Davies, P.J. (1987) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Functions in: Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publishers
- Demain, A.L. (1972) Cellular and Environmental Factors Affecting the Synthesis of Metabolites. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* 22:345-362.

Demole, E.; Lederer, E.; Mercier, D. (1962) Isolement et Determination de la Structure du Jasmonate de Methyl, Constituant Odorant Caractéristique de L'essence de Jasmin. *Helv. Chim. Acta* 45:675-685.

Durain, A.; Chereau, D. (1988) A New Pilot Reactor for Solid-state Fermentation: Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp. *Biotechnol. Bioeng.* 31:476-486.

Ekundaya, O.A.; Oso B.A. (1991) Amylolytic Activities of Culture Filtrates of *Rhizopus oryzae* and *Botryodiplodia theobromae*. *J Food Sci Technol.* 28:110-111.

Erwin, J.; Hulanicka, D.; Holz, G.G. (1964) Comparative Aspects of Unsaturated Fatty Acid Synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 12:191-207

Falkestein, E.; Groth, B.; Mithofer, A.; Weiler, E.M. (1991) Methyljasmonate and Linolenic Acid are Potent Inducer of Tendril Coiling. *Plant* 185:316-322.

Farmer, E.E., Ryan, C.A. (1990) Interplant Communication: Airborne Methyljasmonate Induces Synthesis of Proteinase Inhibitors in Plant Leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7713-7716.

Gabr, M.R.; Saleh, O.I.; Nour, A.H.; Shehata, Z.A. (1990) *Botryodiplodia* Fruit Rot of Pear Fruits, Some Physiological and Pathological Studies. *Annls. Agric. Sci.* 35:427-443

Ganguly, J. (1960) Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. III Biosynthesis of Fatty Acids from MalonylCoA. *Biochimica et Biophysica Acta* 40:110-118.

Gervais, P.; Bazelin, C. (1986) Development of a Solid Substrate Fermenter Allowing the Control of the Substrate Water Activity. *Biotechnol. Letter* 8:191-196.

Gogola N. (1991) Regulations of Micorrhizal Infection by Hormonal Factored Produced by Hosts and Fungi. *Experientia* 47:331-340.

González, P.C.; Delgado, G.; Antigua, M.; Rodríguez, J.; Larralde, P.; Viniestra, G.; Pozo, L.; Pérez, M.C. (1994) Some Aspects of *Gibberella fujikuroi* Culture Concerning Gibberellic Acid Production. *Advances in Bioprocess Engineering*. Kluwer Academic Publisher, E. Galindo and O. T. Ramirez p 425-430.

Goodridge, A.G. (1973) Regulation of Fatty Acid Synthesis in Isolated Hepatocytes. Evidence for a Physiological Role for Long-chain Fatty Acyl Coenzima A and citrate. *The Journal of Biological Chemistry* 248:4318-4326.

Goos, R.D.; Cox, E.A.; Stotzky, G. (1961) *Botryodiplodia theobromae* and Its Association with Musa Species. *Mycologia* 53:262-277.

Granger, L.M.; Perlot, P.; Goma, G.; Pareilleux, A. (1993) Effect of Various Nutrient Limitations on Fatty Acid Production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:784-789.

- Grajek, W. (1988) Cooling Aspects of Solid State Cultures of Mesophilic and Thermophilic. *J. Ferment Technol.* **66**:657-679.
- Greenhalgh, R.; Neish, G.A.; Miller, J.D. (1983) Deoxynivalenol, Acetyl Deoxynivalenol, and Zearalenone Formation by Canadian Isolates of *Fusarium graminearum* on Solid Substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:625-629.
- Gross, D.; Parthier B. (1994) Novel Natural Substances Acting in Plant Growth Regulation. *J. Plant Growth Regulation* **13**:93-114.
- Gutiérrez-Rojas, M. (1995) Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México.
- Gutiérrez-Rojas; Aboul, S.; Auria, R.; Rehav, S.; Favela-Torres, E. (1996) Heat Transfer in Citric Acid Production by Solid State Fermentation. *Process Biochemistry* **31**:363-369.
- Hamberg M. (1988) Biosynthesis of 12-Oxo-10,15(Z)-phytodienoic Acid: Identification of an Allene Oxide Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**:143-150.
- Hamberg, M.; Gardner, H.W. (1992) Oxylipin Pathway to Jasmonates: Biochemistry and Biological Significance. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1165**:1-18.
- Herman, G.; Kramell, H.M.; Kramell, R.; Weidhase, R.A.; Sembdner, G. (1987) Biological Activity of Jasmonic Acid Conjugated. In *Conjugated Plant Hormones: Structure, Metabolism and Function*, ed K.Schreiber, H.R. Schtte, G.Sembdner, 315-322 p, Berlin: Deutscher Verlag der Wissenchften.
- Hessline, C.W. (1977a) Solid State Fermentation. Part 1. *Process Biochem.* **July/August**:24-27.
- Hessline, G.W. (1977b) Solid State Fermentation Part 2. *Process Biochem.* **November**: 29-32.
- Hessline, C.W. (1987) Solid State Fermentation. An Overview. *Biodeterioration* **23**:79-89.
- Hewitt, W.B.; Webster, R.K.; Satour, M.M. (1971) Studies on *Diplodia* and *Diplodia*-like Fungi. Effects of pH, Temperature, Light and Vitamins on Certain Taxonomic Characters *Hilgardia* **41** 81-94.
- Horton, R.F. (1991) Methyljasmonate and Transpiration in Barley. *Plant Physiol.* **96**:1376-1378.
- Husain A.; Ahmad, A.; Agrawal, P.K. (1993) (-)-Jasmonic Acid, a Phytotoxic Substance from *Botryodiplodia theobromae*: Characterization by NMR Spectroscopic Methods. *J. of Natural Products.* **56**:2008-2011.
- Jermiñi, M.F.G.; Demain, A.L. (1989) Solid State Fermentation for Cephalosporin Production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. *Experientia* **45**:1061-1065.

- Johns, M.R. (1992) Production of Secondary Metabolites. En Solid Substrate Cultivation. Eds: Doelle H.W., Mitchell, D.A., Rölz, C.E. Elsevier Applied Science, London y New York.
- Kauss, H.; Krause, K.; Teblich, W. (1992) Methyl Jasmonate Conditions Parsley Suspension Cells for Increased Elicitation of Phenylpropanoid Defense Responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**:304-308.
- Kitahara, T.; Miura, K.; Warita, Y.; Takagi, Y.; Mori, K. (1987) Synthesis of (±)-Methyl Epijasminate and (±)-Methyl Cucubarto. *Agric. Biol. Chem.* **51**:1129-1133.
- Kitahara, T.; Warita, Y.; Abe, M.; Seya, M.; Takagi, Y. Mori, K. (1991) Stereoselective Synthesis of Methyl Epijasmonate. *Agric. Biol. Chem.* **55**:1013-1017.
- Klibansky, M.; González, L. (1995) Algunas experiencias en la aplicación de la biotecnología en la producción de biofertilizantes en Cuba. VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Septiembre, Ixtapa, Gro, México.
- Knofel, H.D.; Bruckner, C.; Kramell, R.; Sembdner, G.; Schreiber, K. (1984) A Radioimmunoassay for Jasmonic Acid. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **179**:317-325.
- Knofel, H.D.; Bruckner, C.; Kramell, R.; Sembdner, G.; Schreiber, K. (1990) Radioimmunoassay for the Natural Plant Growth Regulator (-)-Jasmonic Acid. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **186**:387-394.
- Koda, Y.; Kikuta, Y. (1991) Possible Involvement of Jasmonic Acid in Tuberization of Yam Plants. *Plant Cell Physiol.* **32**:629-633.
- Koda, Y. (1992) The Role of Jasmonic Acid and Related Compounds in the Regulation of Plant Development. *Int. Rev. of Cytology* **135**:155-199.
- Koda, Y.; Kikuta, Y.; Kitahara, T.; Nishi, T.; Mori, K. (1992) Comparisons of Various Biological Activities of Stereoisomers of Methyl Jasmonate. *Phytochemistry* **31**:1111-1114.
- Koda, Y.; Takahashi, K.; Kikuta, Y. (1994) Involvement of Jasmonic Acid and Related Compounds in the Tuberization of Jerusalem Artichoke Plants (*Helianthus tuberosus* L.). *Jpn.J. of Crop Sci.* **63**:333-338.
- Krasnobajew, V. (1981) Aroma and Flavoring Substances by Fermentations, their Use and Products Containig Them. Eur. Pat. Appl. 12246. Source. *Chemical Abstracts*, 28895k.
68. Krasnobajew, V.; Helmlinger, D. (1982) Fermentation of Fragrances. Biotransformation of  $\beta$ -ionone by *Lasiodiplodia theobromae*. *Helvetica Chimica Acta* **65**:1590-1601.
- Kumar P.K.R.; Lonsane, B.K. (1987) Gibberellic Acid by Solid State Fermentation: Consistent and Improved Yields. *Biotechnology and Bioengineering* **XXX**:267-271.

Larque-Saavedra, A.; Reyes, R. (1988). EL uso de las hormonas vegetales en la agricultura mexicana. *Ciencia y desarrollo XIV*, 82:49-63.

Legisa, M.; Matthey, M. (1986) Glicerol as Initiator of Citric Acid Accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8:258-259.

Levin, E.; Lennarz, W.; Bloch, K. (1964) Occurrence and Localization of  $\alpha$ -Linolenic Acid Containig Galactolipids in the Photosynthetic Apparatus of *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 84:471-474.

Lin, C.F.; Iizuka, H. (1982) Production of Pigment by a Mutant of *Monascus kaoling* sp nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:671-676.

Lindenfelser, L.A.; Ciegler, A. (1975) Solid-substrate Fermenter for Ochratoxin A Production. *Appl. Microbiol.* 29:323-327.

Lonsane, B.K.; Kumar, P.K. (1992) Fungal Plant Growth Regulators. In: Handbook of Applied Mycology. Volume 4. Fungal Biotechnology. Ed: Arora D.K.; Elander, R.P.; Mukerji, K.G. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 573.

López, R.; Dathe, W.; Miersch O. y Sembdner, G. (1985) Determinación del Acido Jasmónico en Semillas Inmaduras de Soya *Glycine max*. *Ciencias de la Agricultura* 23:123-124.

López, R. (1994) Comunicación personal, INIFAT, La Habana, Cuba.

Lonsane, B.K.; Ghildyal N.P.; Brediatman, S.; Ramakrishna, S.V. (1985) Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Enzyme Microbiol Technol.* 7:285-295.

Luckner, M. (1986) Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. In Biotechnology. Vol. IV. Microbial Products II. Ed. H.J. Rehm y G. Reed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, RFA.

Luk, K.C.; Kobbe, B.; Townseed, J.M. (1977) Production of Cyclopiazonic Acid by *Aspergillus flavus* Link. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:211-212.

Mason, H.S.; Mullet, J.E. (1990) Expresion of Two Soybean Vegetative Storage Protein Genes During Development and in a Response to Water Deficit, Wounding, and Jasmonic Acid. *Plant Cell* 2:569-79.

Matsumoto, M.; Nago, H. (1994) (R)-2-Octeno- $\delta$ -lactone and Other Volatiles Produced by *Lasiodiplodia theobromae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 7:1262-1266.

Miersch, O.; Sembdner, G.; Schreiber, K.; Richter, K.; Kochmann, W.; Fricke, W. (1984) Patentschrift DD 216734 A1, Akademie der Wissenschaften, Deutsche Demokratische Republik. Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäureanaloga

- Miersch, O.; Meyer, A.; Vorkerfeld, S.; Sembdner, G. (1986) Occurrence of (+)-7-isojasmonic Acid in *Vicia faba* L. and Its Biological Activity. *J. Plant Growth Regul.* **5**:91-100.
- Miersch, O.; Preiss, A.; Sembdner, G.; Shreiber, K. (1987) (+)-7-Isojasmonic Acid and Related Compounds from *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* **26**:1037-1039.
- Miersch, O.; Schmidt, J.; Sembdner, G.; Shreiber, K. (1989) Jasmonic Acid-like Substances from Culture Filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* **28**:1303-1305.
- Miersch, O.; Bruckner, B.; Schmidt, J.; Sembdner, G. (1992) Cyclopentane Fatty Acid from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* **31**:3835-35.
- Miersch, O.; Gunther, T.; Fritsche, W.; Sembdner, G. (1993) Jasmonates from Different Fungal Species. *Natural Product Letter* **2**:293-299.
- Moo-Young, M.; Moreira, A.R.; Tengerty, R.P. (1983) Principles of Solid Substrate Fermentation. En: *The Filamentous Fungi. Fungal Technology*. Eds Smith J. E., Berry D. R., Kristiansen B. London, Edward Arnold Publisher. **4**:117-144.
- Montgomery, D.C. (1991) Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V., México D.F., México, 70-71 p.
- Mudgett, R.E. (1986) Solid-state Fermentations. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, de A.L. Demain & H.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Navaratnam, P.; Arasaratnam, V.; Mahendran, S.; Balasubramaniam, K. (1996) Formulation of Medium and Recycling of Biomass for Glucoamylase Production by *Botryodiplodia theobromae*. *Process Biochemistry* **31**:77-80.
- Nieto, K.F y Frankenberger, W.T. (1990) Microbial Production of Cytokinin. *Soil Biochemistry* **6**:191-248.
- Nwugo, M.I. (1980) Studies of Storage Rot Diseases of Cocoyam (*Colosia esculenta*). M. Sc. Dissertation, University of Ibadan, Nigeria.
- Nwugo, M.I.; Mba, P.C. (1988) Studies on the Post-harvest Rots of African Breadfruit (*Treculia africana*) Seeds in Nigeria. *International Biodeterioration* **24**:17-23.
- Pateman, J.A.; Kinghorn, J.R. (1975) Nitrogen Metabolism. In *The Filamentous Fungi*, Vol. 2 Biosynthesis and Metabolism. Edward Arnold (Publishers) Ltd. London, England, 160-161 p.
- Pathier, B. (1990) Jasmonates: Hormonal Regulators or Stress Factors in Leaf Senescence?. *J. Plant Growth Regul.* **9**:1-7.

- Pathier, B. (1991) Jasmonates, New Regulator of Plant Growth and Development Many Facts and Few Hypothesis on their Actions. *Bot. Acta* 104:446-54.
- Pelayo, A.M.; Mingo A.M. (1991) Jasmonic Acid induces Tuberization of Potato Stolons Cultured *in Vitro*. *Plant Physiol.* 97:1253-1255.
- Pérez, A.G.; Sanz, C.; Richardson, D.G.; Olias, J.M. (1993) Methyl Jasmonate Vapors Promotes  $\beta$ -Carotenes Synthesis and Chlorophyll Degradation in Golden Delicious Apple Peel. (1993). *J. of Growth Regul.* 12:163-167.
- Peterson G.W. (1976) Disease of Russian-Olive Caused by *Botryodiplodia theobromae*. *Planta Disease Reporter* 60:490-494.
- Pirt, S.J. (1975) Principles of Microbes and Cell Cultivation. In Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, London.
- Porat, R.; Borochoy, A.; Halevy, A.H. (1993) Enhancement of Petunia and Dendrobium Flower Senescence by Jasmonic Acid Methyl Ester is Via the Promotion of Ethylene Production. *Plant Growth Regulation* 13:297-301.
- Pyler, E.J. (1972) Baking Science and Technology. Ed. The Bakers Digest. Siebel Publishing Company. Chicago, Ill. Vol I
- Ogundana, S.K.; Naqvi, S.H.; Ekundaya, J.A. (1971) Studies of Soft Rot of Yams in Storage. *Transactions of the British Mycological Society* 56:73-80.
- Raimbault, M. (1980) Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons filamenteux sur Substrat amylicé, These Doct. es Sci., Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 291 p.
- Raimbault, M.; Alzard, D. (1980) Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. *Env. J Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9:199-203.
- Raimbault, R.; Roussos, S.; Barrios-González, J.; Gutierrez, M.; Viniégras, G. (1989) Procédé de culture de microorganismes sur un milieu solide constituée de d' un support solide absorbant, compressible et non fermentable. Patente francesa No. 89 06558.
- Rasmussen, R.K.; Klein, H.P. (1968) Activation of Fatty Acid Synthesis in Cell-free Extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriology* 95:157-61.
- Ravnikar, M.; Gogala, N. (1990) Regulation of Potato Meristem Development by Jasmonic Acid In Vitro. *J. Plant Growth Regul.* 9:233-236.
- Ravnikar, M.; Vilhar, B.; Gogola N. (1992) Stimulatory Effects of Jasmonic Acid on Potato Stem Node and Protoplast Culture. *Plant Growth Regul.* 11:29-33.

- Righelato, R.C. (1974) Growth Kinetics of Mycelial Fungi. In *The Filamentous Fungi*. Volume 1 Industrial Mycology. Ed: J.E. Smith, D.R. Berry. Edward Arnold Publishers Ltd. London, England.
- Robinson, D.S. (1991) *Food Biochemistry and Nutricional Value*. Ed. Longman Group Limited. Zaragoza, España.
- Rose, A.H. (1979) Production and Industrial Importance of Secondary Products of Metabolism. En: *Economic Microbiology. Secondary Products of Metabolism*. Ed. A.H. Rose. Academic Press.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (1992) *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Fourth Edition, California, USA.
- Saniewski, M.; Czapski, J. (1983) The Effect of Methyl Jasmonate of Lycopene and  $\beta$ -carotene Accumulation in Repeping Red Tomatoes. *Experientia* 39:1373-74.
- Saniewski, M.; Czapski, J.; Nowacki, J.; Lange E. (1987a) The Effect of Methyl Jasmonate on Ethylene and 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylic Acid Production Apple Fruits. *Biol. Plant.* 29:199-203.
- Saniewski, M.; Nowacki, J.; Czapski, J. (1987b) The Effect of Methyl Jasmonate on Ethylene Production and Ethylene-forming Enzyme Activity in Tomatoes. *J. Plant Physiol.* 129:175-180.
- Sanz, L.C.; Fernández, J.C.; Gómez, E.; Vioque, B.; Ollas, J.M. (1995) Effect of Methyl Jasmonate on Ethylene Biosyntheses and Stomatal Closure in Olive Leaves. *Phytochemistry* 33:285-289.
- Satler, S.O.; Thimann, K.V. (1981) Le Jasmonate de Méthyle. Nouveau et Poissant Promoteur de la Senecence Desfevilles. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser.*, 293:735-740.
- Saucedo-Castañeda, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M.; Viniestra-González, G. (1990) Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35:802-808.
- Sembdner, G.; Cross, D. (1986) Plant Growth Substances of Plant and Microbial Origin. In *Plant Growth Substances 1985*, Ed. M. Bopp, pp 139-47. Berlin/Heidelberg/N. York/Tokyo. Spring-Verlag.
- Sembdner G.; Pathier, B. (1993) The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44:569-589.
- Shaw, R. (1966) The Polyunsaturated Fatty Acids of Microorganism. *Advances in Lipid Research* 4:107-174.
- Silman, R.W.; Conway, H.F.; Anderson, R.A.; Bagley, E.B. (1979) Production of Aflatoxin in Corn by a Large-Scale Solid Substrate Fermentation Process. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1799-1808.
- Slankis, V. (1974) Soil Factors Influencing Formation of Mycorrhizae. *Annu. Rev. of Phytopatology* 12:437-457.

Smith, J.E. (1974) The Structure and Development of Filamentous Fungi. In The Filamentous Fungi. Volume 1 Industrial Mycology. Ed: J.E. Smith, D.R. Berry. Edward Arnold Publishers Ltd, London, England.

Staswick, P.; Huang, J.; Rhee, Y. (1991) Nitrogen and Methyl Jasmonate Induction of Soybean Vegetative Storage Protein Genes. *Plant Physiol.* **96**:130-136.

Stevens, N.F. (1941) Host Relations in Species of *Diplodia* and Similar Genera. *Mycologia* **33**:69-72.  
117. Tandon, R.N.; Srivastava, M.P. (1963) Influence of Hydrogen-ion Concentrations on the Utilization of Sodium Nitrite by *Diplodia typhina* sacc and *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Current Science* **1**:35-36.

Thomas, G.; Miersch, O.; Fritsche, W.; Sembdner, G. (1989) Patentschrift DD 272869 A<sub>1</sub>, Akademie der Wissenschaften, Deutsche Demokratische Republik. Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure.

Thomas, G.; Miersch, O.; Fritsche, W.; Sembner, G. (1990) Patentschrift DD 279688 A<sub>1</sub>, Akademie er Wissenschaften, Deute Demokratische Republik. Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure.

Tsurumi, S.; Asahi, V. (1985) Identification of Jasmonic Acid in *Mimosa pudica* ans Its Inhibitory Effect on Auxin- and Light- Induced Opening of the Pulvinule. *Physiol. Plant* **64**:207-11.

Trinci, A.P.J. (1969) A Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi. *J. Gen. Microbiol.* **57**:11-24.

Trippi, V.; Thimman, K.V. (1983) The Oxidation of Solutes During Senescence of Oat Leaves. *Physiol. Plant* **58**:21-28.

Trumpy, B.H.; Millis, N.F. (1963) Nutricional Requirements of an *Aspergillus niger* Mutant for Citric Acid Production. *J. Gen. Microbiol.* **30**:381-393.

Uduebo, A.E. (1974) Effect og High Temperature on the Growth, Sporulation and Pigment Production of *Botryodiplodia theobromae*. *Can. J. of Bot.* **52**:2631-2634.

Ueda, J.; Kato J. (1980) Isolation and Identification of Senescence Promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L). *Plant Physiol* **66**: 246-249.

Ueda, J.; Kato, J. (1981) Promotive Effect of Methyl Jasmonate on Oat Leaf Senescence in the Light. *Z. Pflanzen Physiol* **103**:357-59.

Ueda, J.; Kato, J. (1982) Identification of Jasmonic Acid and Abscisic Acid as Senescence Promoting Substance from *Cleyera achnacea* DL. *Agric. Biol. Chem.* **46**:1975-1976.

Ueda, J.; Mizumoto, T.; Kato, J. (1991) Quantitative Changes of ABA and Methyljasmonate Correlated with Vernol Leaf Absicción of *Ficus superba* var japon. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **187**:203-10.

Umezurike, G.M. (1968) Cellulolytic Activities of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Ann Bot.* **33**:451-462.

Verma, O.P.; Singh, R.D. (1969) Epidemiology of Mango Dieback Caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Ind. J. of Agric. Sci.* **40**:813-818.

Vick, B.A.; Zimmerman, D.C.; Weisleder, D. (1979) Thermal Alteration of a Cyclic Fatty Acid Produced by a Flaxseed Extract. *Lipids* **14**:734-740.

Vick, B.A.; Zimmerman, D.C. (1984) Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol.* **75**:458-461.

Vick, B.A.; Zimmerman, D.C. (1986) Characterization of 12-Oxophytodienoic Acid Reductase in Corn. *Plant Physiol.* **80**:202-205.

Vick, B.A.; Zimmerman, D.C. (1987) Pathway of Fatty Acids Hydroperoxide Metabolism in Spinach Leaf Chloroplast. *Plant Physiol.* **85**:1073-1078.

Voet, D.; Voet, J. G. (1990) Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA, p 678-686.

Volke, T (1995) Fisiología de hongos productores de reguladores de crecimiento vegetal. Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México D.F., México.

Wakil, S.J. (1961) Mechanism of Fatty Acid Synthesis. *J. of Lipid Research* **2**:1-24.

Wakil, S.J.; Gibson, D.M. (1960) Studies on the Mechanism of Fatty Acid Synthesis. VIII The Participation of Protein-bound Biotin in the Biosynthesis of Fatty Acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **41**:122-129.

Walker, P.; Woodbine, M. (1976) The Biosynthesis of Fatty Acids. En *The Filamentous Fungi. Biosynthesis and Metabolism*. Eds. J.E. Smith; D.R. Berry. Edward Arnold Publishers Ltd. London, England.

Wardlaw, C.W. (1931) Observations on *Botryodiplodia* Fruit Rot of the Banana. *Tropical Agriculture* **VIII**:227-230,

Weaver, (1972). *Plant Growth Substances in Agriculture*. W.H. Freeman and Company, USA.

Weidhase, R.A.; Lehmann, J.; Kramell, H.; Sembdner, G.; Pathier, B. (1987a) Degradation of Ribulose-1,5-diphosphate Carboxylase and Chlorophyll in Senescence Barley Leaf Segments Triggered by Jasmonic Acid Methyl Ester and Counteraction by Citokinin. *Physiol. Plant* **69**:161-66.

Weidhase, R.A.; Kramell, H.M.; Lehmann, J.; Liebisch, H.W.; Lerbs, W.; Parthier, B. (1987b) Methyl Jasmonate-induced Changes in the Polypeptide Pattern of Senescing Barley Leaf Segments. *Plant Sci.* **51**:171-186.

- Weiler, E.W.; Albrecht, T.; Groth, B.; Zhi-Qiang, X.; Luxem, M.; Harald, L.; Andert, L. (1993). Evidence for the Involvement of Jasmonates and their Octadecanoid Precursors in the Tendril Coiling Response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 32:591-600.
- Webster, R.K.; Hewitt, W.E.; Satour, M.M. (1971) Studies on *Diplodia* and *Diplodia*-like Fungi. Effects of Carbon:Nitrogen Ratio on Growth, Pycnidia and Pycnidiospores Formation. *Hilgardia* 41:95-104.
- Wilén, R.W.; Van Rooijen, G.J.H.; Pearce, D.W.; Pharis R.P.; Holbrook, L.A.; Moloney, M.M. (1991) Effects of Jasmonic Acid on Embryo-species Processes in *Brassica* and *Linum* Oilseeds. *Plant Physiol* 95:399-405.
- Xu, D.; McElroy, D.; Thornburg, R.; Wu, R. (1993) Systemic Induction of a Potato *pin2* Promotor by Wounding, Methyl Jasmonate, and Abscisic Acid in Transgenic Rice Plants. *Plant Molecular Biology* 22:573-588.
- Yaguchi, Y.; Nakamura, S. (1992) Stem-end Rot of Papaya and Its Pathogens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58:30-36.
- Yamagishi, K.; Mitsumori, C.; Takahashi, K.; Fujino, K.; Koda, Y.; Kikuta, Y. (1993) Jasmonic Acid-inducible Gene Expression of a Kunit-Type Proteinase Inhibitor in Potato Tuber Disks. *Plant Molecular Biology* 21: 539-541.
- Yamane, H.; Abe, H.; Susuki, Y.; Shimamura E.; Takahashi, N. (1980) Synthesis of Jasmonic Acid Related Compounds and their Structure-Activity Relationship on the Growth of Rice Seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 44:2856-64.
- Yamane, H.; Takagi, H.; Abe, H.; Yokota, T. y Takahashi, N. (1981a) Identification of Jasmonic Acid in Three Species of Higher Plants and Its Biological Activities. *Plant Cell Physiol* 22:689-697.
- Yamane, H.; Takahashi, N.; Ueda, J.; Kato, J. (1981b) Resolution of (+)-Methyl Jasmonate by High Performance Liquid Chromatography and the Inhibitory Effect of (+)-Enantiomer on the Growth of Rice Seedlings. *Agric. Biol. Chem.* 45:1709-1711.
- Yamane, H.; Abe, H.; Takahashi, N. (1982) Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate in Polen and Anthers of Three *Camellia* Species. *Plant Cell Physiol.* 23:1125-1127.
- Yamazaki, Y.; Fukunag, Y.; Hori, N.; Mikami, Y. (1989)  $\beta$ -ionone Derivatives as Cigarette Flavor Improvers. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 6330445. *Chem. Abstracts* 110:170424y.
- Yulong, C.; Smit, B. (1994) Sustainability in Agriculture: A General Review. *J. of Agriculture Ecosystem and Environment* 49:299-307.
- Zimmerman, D.C.; Feng, P. (1978) Characterization of a Prostaglandin-like Metabolite of Linolenic Acid Produced by a Flaxseed Extract. *Lipids* 13:313-331.

## 9. GLOSARIO

- ◆ **Agricultura sostenible:** arte de cultivar la tierra empleando procedimientos artesanales y la aplicación de biofertilizantes y microorganismos beneficiosos al suelo como son la rotación de los cultivos, el empleo de abonos verdes, estiércol, compostas, vermicomposta, la aplicación de fitohormonas, biopesticidas y inoculantes biológicos tales como el *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Azospirillum sp.*, *Rhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*, hongos micorrizicos, entre otros.
  
- ◆ **Anteras:** parte del estambre de la flor que consiste de uno o dos sacos polinicos y una capa conectiva entre ellos los cuales llevan el polen.
  
- ◆ **Carbono óptico activo:** átomo de carbono que posee cuatro grupos diferentes en la molécula, causando la rotación del plano de la luz polarizada.
  
- ◆ **Callos:** cicatriz de una lesión en el tallo o raíz de ciertas plantas vasculares.
  
- ◆ **Carotenoides:** son pigmentos que acompañan a la clorofila y que absorben luz en parte del espectro en donde la clorofila no lo hace bien.
  
- ◆ **Ciclos biogeoquímicos:** es el movimiento de los elementos químicos, incluidos todos los elementos iniciales del protoplasma de los organismos vivos, que propenden en la biosfera por vías características, del ambiente al organismo y de éstos otra vez al ambiente.
  
- ◆ **Conidióforo:** hifa especializada o prolongación del tallo que soporta a las conidias.
  
- ◆ **Conidias:** son formas de reproducción asexual que tienen su origen en estructuras especializadas como el conidióforo, esterigma, esporangióforo, vesícula, entre otras. Se dividen en microconidias y macroconidias; las primeras son unicelulares y las segundas pluricelulares, polimorfos y de mayor tamaño que las anteriores.
  
- ◆  **$\beta$ -oxidación:** degradación de los ácidos grasos por oxidación hasta rendir acetyl-CoA, por oxidaciones sucesivas en el átomo de carbono  $\beta$ .
  
- ◆ **Brotes:** colectivamente, el tallo y las hojas de una planta.
  
- ◆ **Diastereoisómeros:** un par de estereoisómeros originados por un segundo átomo de carbono asimétrico en cada uno de los isómeros del primer átomo de carbono asimétrico.
  
- ◆ **Estromas:** (del griego stroma: lecho, alfombra, colchón, almohadilla) masa compacta de hifas somáticas, constituida de plecténquima (prosénquima, seudofranénquima o ambos), sobre la cual o dentro de la cual se producen comúnmente hifas fértiles que generan órganos reproductores.

- ◆ Enantiómeros: isómeros cuyas estructuras son entre sí como imágenes especulares no superponibles.
- ◆ Enol: es una estructura con un grupo hidroxilo unido a un doble enlace (donde en: por el átomo de carbono y al ol por el grupo alcohol).
- ◆ Estereoselectividad: es la reacción que se produce predominantemente en uno de los enantiómeros de un posible par, o en un diasteroisómero de una mezcla de ellos.
- ◆ Fitohormona: es un compuesto orgánico, producto del metabolismo de plantas superiores, sintetizado en una parte de una planta y trasladado a otra parte de la misma, donde en pequeñas concentraciones este causa una respuesta fisiológica.
- ◆ Hidroboración-oxidación: es un proceso que se desarrolla primeramente por la reacción de un alqueno con el diborano para adicionarse al doble enlace un átomo de hidrógeno y un átomo de boro y posteriormente la oxidación con peróxido de hidrógeno en medio alcalino para dar lugar a un alcohol, por la introducción de un grupo hidroxilo en la posición donde se encontraba el átomo de boro.
- ◆ Isómeros *cis* y *trans*: en los isómeros *cis* los grupos unidos a un doble enlace de la molécula están del mismo lado, mientras que en los isómeros *trans* los grupos se encuentran opuestos.
- ◆ Meristemo: región embrionaria (en división constante) de células que permiten el crecimiento de las plantas durante toda su vida.
- ◆ Micorriza: asociación simbiótica de un hongo con las raíces de una planta superior.
- ◆ Microtúbulos: son pequeñas hebras o tubos del citoplasma de los eucariotes, siendo su diámetro del orden de los 250 Å y su longitud indeterminada, algunas veces de varias micras.
- ◆ Olorífico: que tiene olor o fragancia.
- ◆ Picnidios: son cuerpos fructíferos asexuales, huecos y pueden estar cubiertos de conidióforos.
- ◆ Polen: la masa de gametofitos masculinos jóvenes (granos de polen) de una planta, con semilla, en el estado que se encuentran al ser liberado de la antera.
- ◆ Pulvinilo: son órganos especiales los cuales contienen células diferentes a las ordinarias que se encuentran en la base de las hojas y los folíolos de leguminosas y otras plantas.
- ◆ Regulador del crecimiento vegetal: son sustancias orgánicas que en pequeñas concentraciones provocan un efecto fisiológico en las plantas, ya sea inhibición o estímulo de alguna función.

◆ Regulador del crecimiento vegetal exógenos: son compuestos sintetizados, o bien producidos por otros organismos diferentes a las plantas.

◆ Rizosfera: región del suelo expuesta a la influencia de las raíces y caracterizada por tener una zona de intensa actividad microbiológica.

◆ Senescencia: es la fase de crecimiento celular que se extiende desde la madurez completa hasta la muerte, y se caracteriza por una acumulación de productos metabólicos y una pérdida en el peso seco, especialmente en las hojas y frutos. Otro evento propio de la senescencia es el amarillamiento de hojas.

◆ Yemas: son cuerpos reproductores vegetativos que se desarrollan por división celular mitótica a partir de una célula superficial.