

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

---

**IZTAPALAPA**

**“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AROMAS POR EL  
HONGO FILAMENTOSO *Ceratocystis fimbriata* EN MEDIO  
LÍQUIDO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

***FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA FIGUEROA***

**Director de Tesis: Dr. Sergio Revah  
Asesor de Tesis: Dr. Pierre Christen**

*MÉXICO, D.F.*

*2004*

## INDICE

1.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2.	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1	Aromas. Definiciones	5
2.1.1	Compuestos del aroma	5
2.1.2	Mercado de los aromas	9
2.2	Producción de aromas	12
2.2.1	Cultivos de tejidos vegetales	14
2.2.2	Métodos microbiológicos	14
2.2.2.1	Fermentación	15
2.2.2.2	Biotransformación	16
2.2.2.3	Métodos enzimáticos para producir aromas	18
2.2.2.4	Métodos de ingeniería genética	19
2.3	Crecimiento microbiano	20
2.3.1	Factores de crecimiento. Tiamina	20
2.3.2	Efecto de parámetros ambientales	22
2.4	Respuestas de los microorganismos al estrés ambiental	23
2.4.1	Estrés por deficiencia en la disponibilidad del agua	26
2.5	Cultivos en medios sumergidos y en medios sólidos	29
2.6	Metabolismo de hongos	31
2.6.1	Oxidación de nutrientes	31
2.6.1.1	Catabolismo de la glucosa	32
2.6.1.2	Fermentación microbiana	32
2.6.1.3	Biosíntesis de compuestos del aroma	35
2.6.1.3.1	Terpenos, lactosas y carbonílicos	35
2.6.1.3.2	Ácidos carboxílicos y alcoholes	37
2.6.1.3.3	Biosíntesis de ésteres	39
2.6.1.3.4	Biosíntesis de alcoholes superiores	39
2.7	Los hongos como productores de compuestos volátiles	41
2.7.1	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	43
2.8	Métodos de extracción, purificación e identificación de aromas	46
2.8.1	Separación de aromas por destilación	47
2.8.1.1	Destilación por arrastre de vapor	47
2.8.1.2	Destilación molecular	48
2.8.1.3	Destilación por arrastre de vapor y extracción simultánea (DES)	49
2.8.2	Métodos de extracción de aromas por disolventes	49
2.8.3	Separación e identificación de aromas por cromatografía de gases	50
2.8.3.1	Análisis del espacio de cabeza de los biorreactores (“headspace”)	51
2.8.3.1.1	Inyección directa	51
2.8.3.1.2	Purga y Trampa	51
2.8.3.2	Extracción en fase sólida	52
2.8.3.3	Cromatografía con CO <sub>2</sub> supercrítico	53
2.8.3.4	Pervaporación	53
2.8.3.5	Espectroscopía de masas	54
3.	<b>OBJETIVOS</b>	56

4.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	57
4.1	Conservación de la cepa	57
4.2	Preparación del inóculo	57
4.3	Preparación del medio líquido estándar (MS)	58
4.4	Estudio 1	59
4.4.1	Condiciones de fermentación	59
4.4.2	Análisis sensorial	59
4.4.3	Medición del pH.	60
4.4.4	Determinación de la biomasa	60
4.4.5	Determinación de glucosa	60
4.4.6	Extracción de los compuestos volátiles	60
4.4.7	Identificación de los compuestos extraídos	62
4.4.8	Cuantificación de volátiles del extracto	63
4.4.9	Análisis del espacio de cabeza	64
4.5	Estudio 2	64
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	66
5.1	Estudio 1. Cultivos en medio estándar y en medio estándar adicionado con leucina	66
5.1.1	Crecimiento de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en medio estándar y en medio estándar adicionado con leucina	66
5.1.2	Evaluación sensorial de los aromas y de los volátiles totales	68
5.1.3	Identificación de los volátiles extraídos del caldo de cultivo	70
5.1.3.1	Alcoholes	70
5.1.3.2	Ésteres	72
5.1.3.3	Aldehídos y cetonas	73
5.1.3.4	Hidrocarburos y compuestos aromáticos	74
5.1.4	Cuantificación de los volátiles extraídos	76
5.1.5	Cuantificación de los volátiles del espacio de cabeza	78
5.1.6	Conclusiones de la parte 1	81
5.2	Estudio 2. Efectos de la actividad de agua, leucina y tiamina en la producción de compuestos del aroma por <i>Ceratocystis fimbriata</i>	83
5.2.1	Efecto de la actividad de agua en el tamaño celular	83
5.2.2	Resultados en biomasa y en producción de volátiles	84
5.2.3	Discusión de resultados	96
5.2.4	Conclusiones de la parte 2	100
5.3	Reproducibilidad de resultados	102
5.3.1	Inóculo	104
5.3.2	Conclusiones de la parte 3	108
6.	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	109
7.	<b>ANEXOS</b>	110
8.	<b>REFERENCIAS</b>	115
9.	<b>ARTÍCULOS</b>	

<b>Índice de figuras</b>	<b>página</b>
Figura 2.1 Valor de los aromas en el mercado mundial en el 2001	10
Figura 2.2 Industrias de fermentaciones	12
Figura 2.3 Estructura de la tiamina	21
Figura 2.4 Fermentación, el piruvato como intermediario	34
Figura 2.5 Ruta biosintética para el diacetilo	37
Figura 2.6 Ruta metabólica de Ehrlich	40
Figura 2.7 Peritecios	46
	62
Figura 4.1 Equipo de destilación por arrastre de vapor y extracción	
Figura 5.1 Evolución de la fermentación con <i>Ceratocystis fimbriata</i>	67
Figura 5.2 Evolución del aroma, volátiles totales y el espacio de cabeza en medio estándar y en medio estándar adicionado de leucina	69
Figura 5.3 Micelios y esporas de <i>Ceratocystis fimbriata</i> al microscopio	84
Figura 5.4 Interacción actividad acuosa × tiempo sobre biomasa, volátiles totales y etanol	88
Figura 5.5 Interacciones inóculo × tiempo e inóculo versus actividad acuosa	90
Figura 5.6 Interacción inóculo × medio	91
Figura 5.7 Interacción inóculo × tiempo	92
Figura 5.8 Interacción inóculo × actividad de agua	93
Figura 5.9 Interacción medio × tiempo	94
Figura 5.10 Interacción tiempo × actividad acuosa	95

Figura 5.11 Interacción medio versus actividad de agua	97
Figura 5.12 Sectorización de <i>Ceratocystis fimbriata</i> en PDA	107

<b>Índice de cuadros</b>	<b>página</b>
Cuadro 2.1 Compuestos del aroma de diferentes frutos, clasificados por grupo funcional	6
Cuadro 2.2 Compuestos del aroma y sus valores de umbral de detección	7
Cuadro 2.3 Descripción del aroma de algunos ésteres	8
Cuadro 2.4 Valor anual de las importaciones y exportaciones del comercio total de vainilla, acetato de etilo y acetato de butilo	13
Cuadro 2.5 Comparación de diferentes parámetros de los procesos de biotransformación entre células microbianas y de plantas	14
Cuadro 2.6 Algunos ejemplos de producción de aromas en los alimentos fermentados tradicionales	15
Cuadro 2.7 Compuestos del aroma y del sabor producidos por microorganismos	18
Cuadro 2.9 Producción de aromas por <i>Ceratocystis moniliformis</i> en diferentes fuentes de nitrógeno	42
Cuadro 2.10. Distribución de metabolitos volátiles en algunas especies de <i>Ceratocystis</i>	44
Cuadro 2.11 Recuperación de componentes de un sistema modelo por destilación de arrastre de vapor y extracción simultánea (DES).	49

Cuadro 4.1 Composición del medio estándar	58
Cuadro 5.1 Compuestos volátiles producidos por <i>Ceratocystis fimbriata</i>	71
Cuadro 5.2 Efecto del incremento de las especies químicas por adición de leucina	77
Cuadro 5.3 Comparación de los volátiles detectados por análisis del espacio de cabeza en medio estándar y en medio estándar adicionado de leucina	80
Cuadro 5.4 Efecto de la actividad acuosa en el tamaño celular	83
Cuadro 5.5 Diámetro del micelio en diferentes valores de actividad acuosa	83
Cuadro 5.6 Valores promedio de pH, biomasa, volátiles totales y etanol	86
Cuadro 5.7 Comparación de biomasa, volátiles totales y etanol en los dos experimentos	102
Cuadro 5.8 Comparación de etanol en los dos experimentos	102
Cuadro 5.9 Características de los matraces utilizados	103
Cuadro 5.10 Medios de cultivo y sus resultados	105

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los alimentos se distinguen entre otras cosas por sus aromas que son resultado de la presencia de compuestos volátiles que pueden ser percibidos por los receptores de las fosas nasales. La industria de los aromas captura o imita gracias a la química, los olores que tienen los alimentos; aproximadamente el 80% de estas sustancias se obtienen por síntesis química, el 1.5 % procede de la biotecnología, y el resto de extracción de productos naturales.

Los estudios de mercado indican que los consumidores prefieren los alimentos que puedan llevar la etiqueta "natural". La percepción de natural como "mejor", ha dado lugar a una demanda creciente de sustancias del aroma que puedan considerarse naturales como es el caso de los aromas que se extraen de especies vegetales o de los que se producen por métodos biológicos como las fermentaciones y las transformaciones enzimáticas (Tyrrell, 1990; Krings y Berger, 1998).

Los métodos de extracción de aromas a partir de especies vegetales generalmente son caros debido a la poca cantidad en que se encuentran en las plantas, a los procesos de extracción y purificación, que disminuyen el rendimiento y aumentan operaciones para lograr una mayor pureza; a la dependencia que existe entre la planta y el clima y al riesgo de que estas especies contraigan alguna enfermedad (Schindler, 1982, Berger, 1995). Además la mayor parte de los aromas se obtienen de países en vías de desarrollo donde los factores políticos y socioeconómicos dan incertidumbre al hecho de poder contar con un abastecimiento regular.

Los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) juegan un papel muy importante en la producción de compuestos aromáticos en una gran variedad de productos alimenticios como: yogurt, pan, queso, vino, cerveza, etc. Durante siglos, el hombre ha

sacado provecho de ellos para mejorar la calidad (textura, sabor, tiempo de conservación) de sus alimentos (Beuchat, 1983). Varios autores han reportado una gran diversidad de aromas que se pueden producir por diferentes especies de hongos como: el característico aroma de hongo, producido por *Aspergillus oryzae* (Kaminsky y col., 1974); el aroma frutal por *Penicillium decumbens* (Halim y cols. 1975); el aroma de coco ( $\gamma$ -decalactona) por *Trichoderma viride* (Sastry y col., 1985; De Araujo y cols. 2002) y el aroma de queso azul (2-heptanona) por *Penicillium roqueforti* entre otros (Revah y Lebeault, 1989; Larroche y col., 1994).

Aunque los hongos filamentosos no producen tantas sustancias aromáticas como las plantas superiores (Bernd y Berger, 1994) es importante estudiar los aromas que biosintetizan los microorganismos, porque se puede lograr un control en la producción del aroma de una forma más accesible que con las plantas, si se emplean fermentadores y a los desechos agroindustriales como sustratos. Además se conoce comparativamente mucho más sobre los compuestos volátiles de las plantas que sobre los compuestos volátiles que producen los hongos (Hadar y Dosoretz, 1991).

Los métodos modernos de manipulación genética y el control de las condiciones de cultivo aunados a la preferencia de los consumidores por lo natural, hacen de la biogeneración de aromas un área de importancia en investigación (Berger, 1995; Welsh y col., 1989; Kurtzman, 1983).

La mayor parte de los microorganismos productores de aromas son hongos (Maga, 1976) y los hongos del género *Ceratocystis* son un buen ejemplo (Lanza y col., 1976; Lanza y Palmer 1977; Sprecher y Hanssen, 1983; Janssens y col., 1992).

Dentro de este género, *C. fimbriata* destaca por la rapidez de su desarrollo, la facilidad con que produce esporas (Christen y col., 1992) y la amplia gama de aromas

frutales, de alta intensidad que produce, principalmente ésteres como: acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isoamilo y butirato de etilo entre otros, como se ha corroborado en trabajos recientes, con fermentaciones en medio sólido y en medio líquido (Christen y col., 1994, Christen, 1995; Sánchez y col., 2002).

Se ha visto que el cambio de las condiciones ambientales puede afectar la producción de los metabolitos de los microorganismos, una de estas condiciones ambientales es la disponibilidad de agua. Una baja disponibilidad de agua, produce el estrés acuoso, al cual los microorganismos deben responder de alguna manera para asegurar su supervivencia. En el caso de *Trichoderma viride*, se encontró un incremento de hasta el 300% de 2-heptanona que es un compuesto volátil que tiene un aroma de queso a una actividad de agua de 0.98 (Gervais y col, 1988b); para la  $\gamma$ -decalactona que produce la levadura *Sporidiolobus salmonicolor*, se encontró un incremento en su producción a una actividad acuosa de 0.99 (Gervais y Batut, 1989).

La finalidad de este trabajo es conocer los compuestos del aroma que produce *Ceratocystis fimbriata* y evaluar cómo la presencia de un intermediario de aromas (leucina), un factor de crecimiento como la tiamina y el estrés acuoso (en el medio de cultivo líquido) afectan su presencia y concentración.

En la primera etapa de este trabajo, se identificaron, empleando el sistema gases-masas, los compuestos volátiles producidos por *C. fimbriata* en el medio estándar líquido (ME) el cual fue diseñado como un método para la producción de aromas (Christen y Raimbault, 1991). También se estudiaron las diferencias en la composición y concentración de los compuestos producidos en el medio estándar (ME) y en el medio estándar adicionado de leucina (MEL) utilizando el cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama.

En una etapa siguiente mediante estudios del espacio de cabeza de los frascos de cultivo, se estudiaron las diferencias en la producción de aromas cuando se empleó el inóculo crecido sin tiamina (T-) y el inóculo crecido con tiamina (T+), empleando el medio estándar (ME), el medio adicionado de leucina (MEL) y el medio adicionado de tiamina (MET) para los cultivos. Además, se estudió el efecto de la actividad del agua en estos tres medios (ME, MEL y MET) usando el inóculo (T+) y el inóculo (T-), sobre la producción de biomasa y sobre la producción de los compuestos aromáticos.

## **2. Revisión bibliográfica**

### ***2.1 Aromas. Definiciones.***

El sabor es uno de los atributos sensoriales más apreciados en los alimentos. Junto con el sabor, existen un conjunto de cualidades como el color, la forma, la textura y la seguridad, las cuales determinan la calidad del alimento (Chang y col., 1977).

Al sabor se le ha definido como una memoria y una experiencia, esta definición tiene su explicación en dos fenómenos, ya que el sabor comprende la sensación total experimentada por el consumidor: que empieza cuando percibe el aroma antes de colocar el alimento en la boca, participa también el olor que es el que se percibe en la parte retronasal de la cavidad bucal y la sensación del gusto en la boca. Cuando los compuestos volátiles que están en la cavidad oral pasan a la nariz por difusión o por efecto de bombeo al tragar, su carácter puede ser diferente al del aroma debido al efecto de la dilución con saliva, efectos mecánicos con la lengua o de calentamiento. Los aromas se detectan por células receptoras del epitelio olfativo de la cavidad nasal, mientras que los mensajeros químicos no volátiles y solubles en agua, del sentido del sabor interaccionan con los receptores de la lengua e imparten cuatro impresiones básicas: dulce, salado, amargo y ácido (Dijksterhuis y Pigot 2001).

#### ***2.1.1 Compuestos del aroma***

La sensación del aroma, proviene de mezclas muy complejas de moléculas orgánicas pequeñas y volátiles de naturaleza química diversa, que están presentes en concentraciones muy bajas en el alimento (Tyrrell, 1990). Los grupos funcionales orgánicos más importantes que están presentes entre los compuestos del aroma, son: ésteres, lactonas, terpenos, alcoholes, cetonas y aldehídos (Cuadro 2.1). A modo de ejemplo, actualmente se sabe que 350 componentes forman el

aroma de fresa, 56 el del aceite de oliva (Morales y col., 1994) y 175 el del tequila (Benn y Peppard, 1996).

Cuadro 2.1 Compuestos del aroma de diferentes frutos, clasificados por grupo funcional.

Compuesto	Naranja Shaw, 1979	Toronja Wilson y Shaw, 1980	Limón Shaw, 1979	Mandarina Shaw, 1979	Mango Engel y Tressl, 1983
Hidrocarburos	0	0	1	2	6
Terpenos	3	23	19	26	16
Aldehídos y cetonas	7	4	14	18	15
Ésteres	5	1	7	14	36
Alcoholes	11	1	7	18	19
Lactonas	0	0	0	0	8
Ácidos carboxílicos	0	0	0	7	0
Total	26	29	48	85	100

La presencia de una cierta sustancia en un alimento no significa que participa de su aroma o de su sabor, esto solamente sucede si está en concentraciones más altas a su valor de umbral del aroma (concentración mínima a la que se detecta su aroma) el cual además se modifica por la presencia de otras sustancias (Erickson, 1976). Es posible hacer varias generalizaciones con respecto al sabor, una sustancia que tiene sabor debe estar en solución acuosa y bañar la lengua. La solubilidad en agua es el primer requisito para que una sustancia tenga sabor, mientras que las sustancias solubles en lípidos son las que actúan como estímulo en el olfato. Muchas sustancias del sabor son hidrófilas, no volátiles. Los umbrales de detección de las moléculas lipofílicas como los alcoholes tienden a ser más bajos que los de sus contrapartes hidrofóbicas como los ésteres (Cuadro 2.2).

Los terpenos son responsables de los aromas de los aceites esenciales de muchos frutos, biosintéticamente provienen del ácido mevalónico (Turner y Aldridge, 1983). Las lactonas son ésteres cíclicos principalmente  $\gamma$  y  $\delta$ , se encuentran presentes en muchos alimentos, ejemplos de ello son las lactonas con aroma de coco y la de durazno que se pueden formar a partir de cetoácidos después de la reducción del grupo carbonilo a alcohol y finalmente una esterificación interna.

Cuadro 2.2 Compuestos del aroma y sus valores de umbral de detección del aroma.

Compuesto	Aroma	Umbral de detección del aroma <sup>a</sup>	
		mg/m <sup>3</sup> Aire	ppm/H <sub>2</sub> O
Acetaldehído	En altas diluciones reminiscente al café o vino	.066 <sup>b</sup>	.000688
Acido acético	vinagre	0.025-76	24.3
Acetato de amilo	frutal	0.04	0.08
Butanol	Dulce, frutal	.158-1000	2.5
Acido butírico	desagradable	0.0001	
Etanol	alcohólico	4000 <sup>b</sup>	100
Acetato de etilo	frutal	3.6-1.12	5.0
2-metilbutirato de etilo	frutal	4.6	.0001
Etil vainillina	Dulce, cremoso, vainilla	.000007	.1
Alcohol isobutílico	Diluido suave, dulce, plátano	1-500	7.0
Acido isobutírico	Frutal, dulce		8.1

<sup>a</sup> La mínima cantidad detectada por un sujeto, que no quiere identificar sino solamente detectar la existencia de un estímulo.

<sup>b</sup> el valor esta en ppm en aire.

(lactonización) (Welsh y col., 1989). Los ésteres de cadena lineal y ramificada contribuyen al aroma de casi todas las frutas y de muchos otros alimentos. En el cuadro 2.3 se dan algunos ejemplos.

Cuadro 2.3 Descripción del aroma de algunos ésteres.

Acetato de isobutilo	Plátano, frutal
Acetato de isoamilo	Plátano, frutal
Acetato de 5-hexenilo	Dulce, amargo, frutal
Butirato de 5-hexenilo	Frutal, piña
5-hexenoato de Z-3-hexenilo	Verde, manzana, frutal
5-hexenoato de etilo	Dulce, frutal, fruta tropical
Antranilato de dimetilo	Mandarina

Las cetonas como saborizantes son reconocidas primordialmente por su contribución al aroma de los quesos, particularmente de los quesos madurados por hongos. Estos compuestos junto con los ácidos grasos libres y los alcoholes secundarios, dan a los quesos madurados por *Penicillium* su aroma característico (Kinsella y Hwang, 1976).

Uno de los más importantes aromas de las dicetonas es el diacetilo (2,3-butanodiona), el cual tiene un sabor a mantequilla, semejante a nuez aunque es un compuesto del aroma de alto valor, en pequeñas cantidades en jugos de frutas, vinos o cerveza producen mal sabor.

Muchos aldehídos, alifáticos, aromáticos y terpenoides, exhiben cualidades organolépticas distintas de alto valor en la industria de los alimentos. Generalmente los aldehídos de C<sub>2</sub> a C<sub>7</sub> alifáticos son volátiles y se caracterizan por olores desagradables e irritantes, mientras que los aldehídos grasos (C<sub>8</sub>-C<sub>13</sub>) son menos penetrantes más florales y atractivos cuando aumenta su peso molecular.

Los alcoholes juegan un papel modesto e indirecto en los aromas. En el vino, en bebidas destiladas, los alcoholes superiores, son cuantitativamente el grupo mayor de los compuestos volátiles y su presencia es esencial para la calidad total del aroma. Los alcoholes también tienen

roles indirectos como precursores para la preparación de otros aromas. Por ejemplo, los alcoholes se pueden oxidar a aldehídos o usarse para la producción de ésteres. Después del etanol muchos alcoholes superiores son los principales metabolitos de la fermentación por levaduras. En la cerveza, se han identificado 45 alcoholes y el que predomina es el etanol.

Los ácidos grasos de cadena corta se caracterizan por su olor desagradable, fuertemente pungente e irritante en concentraciones altas. Conforme aumenta el peso molecular, este olor se va reemplazando por un aroma a mantequilla, con algunas notas de queso. Los ácidos grasos con más de 14 carbonos, son sólidos cerosos con olor ligero a sebo. El bajo impacto del aroma de los ácidos grasos, ha disminuido su valor como saborizantes, aunque contribuyen a la formación de aromas complejos y acentúan ciertas características del aroma. Por ejemplo los ácidos grasos de C<sub>3</sub> a C<sub>6</sub> acentúan las notas frutales mientras que los C<sub>4</sub> y de C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aumentan el sabor a queso. Generalmente los ácidos ramificados como el isovalérico, tienen umbrales de sabor más bajos que los ácidos de cadena recta. La presencia de un hidroxilo tiende a suprimir el olor, mientras que los ácidos aromáticos son ligeramente balsámicos con ligeras notas de especias y florales.

### ***2.1.2 Mercado de los aromas.***

La industria de los aromas y las fragancias es una parte importante del mercado mundial. En 1979, este mercado se estimó en 4 billones de dólares y para el 2001 esta cifra había llegado a los 11 billones de dólares. La compañía líder en el mercado es Internacional Flavor & Fragrances (IFF), cuyas ventas en 1998 eran menores a las de la empresa Givaudan, de alrededor de 1500 millones de dólares, actualmente IFF tiene ventas de 1900 millones de dólares, mientras que Givaudan ha permanecido igual. Siguen en importancia por el valor de sus ventas de 1000 millones de dólares, Firmenich, Quest International, Takasago, Harman and Reimer (H&R). Diez empresas son las que tienen el 80% de las ventas del mercado mundial en esta área. El porcentaje

de ventas de Internacional Flavor & Fragrances durante el año 2001, fue de la siguiente manera: las ventas de los saborizantes y las fragancias fue del 33% cada uno, mientras que los aromas y los aceites esenciales fueron aproximadamente del 17% cada uno (Figura 2.1a). Norteamérica es el lugar con mayores ventas, seguido muy de cerca por Europa Occidental (Figura 2.1b) (Leffingwell y col, 2002). Freedonia, una firma de investigación de mercado estadounidense, anuncia que la demanda de sabores y fragancias crecerá alrededor de 5.4% por año, hasta alcanzar \$18.40 billones de dólares para el 2004 (Royal Society of Chemistry 2000- 2002).

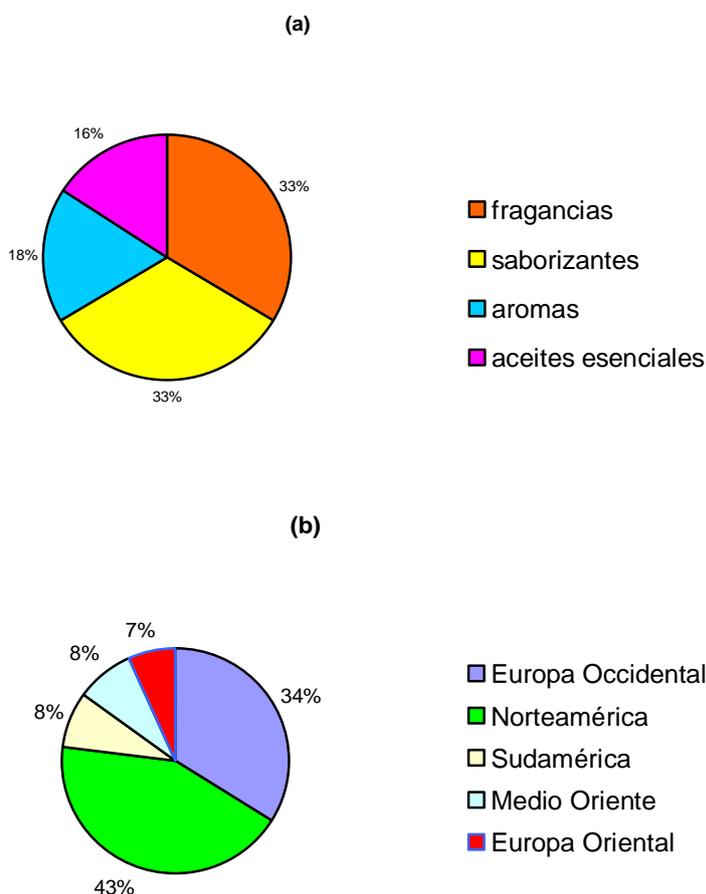


Figura 2.1 Valor del mercado mundial en el 2001, por tipo de producto y por continente dado en porcentajes.

Se conocen alrededor de 6400 compuestos volátiles naturales y alrededor de 10000 compuestos fragantes y a pesar de ello, en la industria de los aromas y de las fragancias sólo se utilizan unos cuantos centenares. Solamente 400 compuestos químicos se fabrican en una escala mayor de 1 tonelada por año. También miles de toneladas por año de saborizantes no volátiles, como edulcorantes, acidulantes y saborizantes, se producen a través de la biotecnología, mientras que la bioproducción de sabores volátiles es una línea que surgió recientemente (Hagedorn y Kaphamer 1994).

La mayor parte de los compuestos del aroma se obtienen por reacciones químicas, sin embargo la tendencia a lo natural y las características de los procesos de obtención, hacen que la diferencia en el precio de un compuesto natural y su contraparte sintética sea considerable.

Por ejemplo, la vainillina que es el compuesto del aroma con mayor demanda en el mundo se cotiza a 12 dólares/kg, cuando se obtiene químicamente y su contraparte natural, que se extrae de la vaina de la vainilla (*Vanilla planifolia*), alcanza un precio de 4000 dólares/kg (Rakotoarisoa y Shapouri, 2001). En 1995 solamente un 0.2% de la vainilla del mercado mundial (20 t/año) se extrajo de la planta. En 1992, la industria de las fermentaciones de los Estados Unidos, tuvo un valor de ventas de 896,000 dólares, en la Figura 2.2 pueden verse los valores porcentuales de los diferentes rubros.

En el 2002 México exportó acetato de etilo (Cuadro 2.4) obtenido del petróleo con un valor de 18,960,000 dólares y lo importó por un valor menor (1,213,000 dólares), esto fue debido a que el producto de importación es de mayor pureza, lo que ocurre también con el acetato de n-butilo. En esta información, no se detalla el origen (natural o sintético) de estos compuestos, ni el uso al que se les destina; debe tomarse en cuenta que el uso más importante de estos ésteres del

ácido acético, es el de disolventes que se usan en muy diversas empresas que no pertenecen a la industria alimentaria.

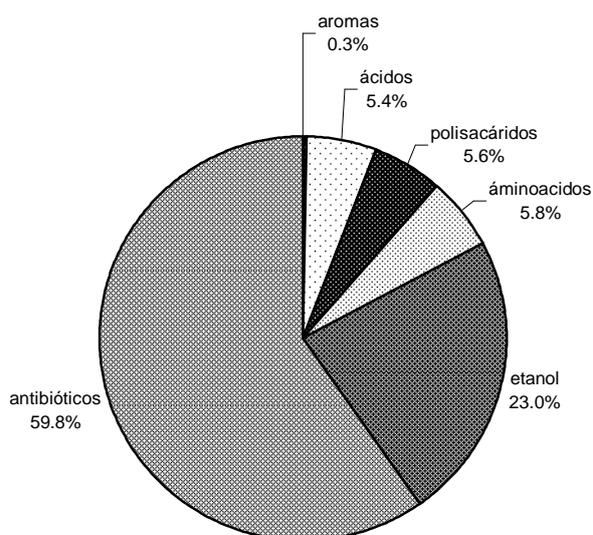


Figura 2.2 Industrias de fermentaciones, Estados Unidos, 1992.

Debido a la demanda creciente, el mercado de productos con saborizantes (comida preparada, bebidas) y el de los productos con fragancias (cosméticos, detergentes) se requieren nuevas estrategias para la obtención de los compuestos del aroma (Cheetham, 1996).

### ***2.2 Producción de aromas.***

Los aromas pueden obtenerse por síntesis química y por la vía natural. Los métodos sintéticos son más económicos debido a que es posible obtener mayor cantidad del producto deseado a un menor precio como se señala en la sección 2.1.2 para el caso la vainilla. Sin

embargo presenta algunas desventajas como son el rechazo por parte del público y en el caso de los compuestos quirales la dificultad para separar las mezclas racémicas (Brenna y col. 2003) Breuer y col., 2004). La principal vía natural de obtención de aromas es la extracción de productos vegetales, los que a su vez presentan desventajas, como la escasa concentración de aromas en las diferentes especies, los períodos largos de tiempo para llegar a la etapa de

Cuadro 2.4 Valor anual de las importaciones y exportaciones del comercio total de vainilla, acetato de etilo y acetato de butilo en miles de dólares americanos (Secretaría de Economía de México, 2003).

Año	Vainilla		Acetato de etilo		Acetato de n-butilo	
	exportación	importación	exportación	importación	exportación	importación
1990	609	34	484	22	411	152
1991	637	7	690.3	178	171	831
1992	491	5	1878	133	147	1557
1993	463	6	5956	491	247	771
1994	535	3	9588	239	267	684
1995	650	35	27346	414	513	828
1996	410	13	36621	352	2664	826
1997	557	43	49506	202	1470	675
1998	341	33	43998	214	797	414
1999	701	35	34292	291	698	523
2000	623	10	24918	1004	652	7985
2001	1559	50	24741	2575	425	8193
2002	2562	50	18960	1213	310	6203

producción, el clima y las enfermedades; además de los problemas políticos y socioeconómicos de los lugares en donde crecen las especies vegetales. Es por todo esto que los procesos biotecnológicos han cobrado mayor importancia en los últimos años. La biotecnología, involucra disciplinas científicas básicas como las ciencias de la vida, la química y la ingeniería para proporcionar productos comerciales. Si se define a la biotecnología más ampliamente, el término incluye cualquier técnica que use organismos vivos (o partes de organismos) para hacer o

modificar productos, para mejorar plantas o animales, o desarrollar microorganismos o enzimas vegetales o microbianas, para usos específicos (Winterhalter y Schreier, 1993).

La biotecnología comprende la síntesis *de novo*, las biotransformaciones y la ingeniería genética. El desarrollo de métodos biotecnológicos para la producción de compuestos del aroma puede ser muy difícil porque los aromas naturales, están compuestos de cientos de sustancias (Schreier, 1992).

### **2.2.1 Cultivos de tejidos vegetales para la producción de aromas.**

La mayor parte de los cultivos de tejidos vegetales no han producido un rendimiento adecuado de las sustancias del aroma, pero en algunos casos el rendimiento ha sido mayor que en la planta. En general la biotecnología que utiliza células vegetales continúa siendo un reto. En cuanto a los costos, es más favorable el uso de los microorganismos (Cuadro 2.5) (Schwab, 2000).

Cuadro 2.5 Comparación de diferentes parámetros de los procesos de biotransformación entre células microbianas y de plantas (Adaptado de Winterhalter y Schreier, 1993).

Parámetro	Cultivo con microorganismos	Cultivo con células vegetales
Rompimiento por cisallamiento	Insensible	Sensible
Tiempo de duplicación	Horas	Días
Tiempo de cultivo	Días	Semanas
Productos	Extracelular	Intracelular
Costos promedio	\$6 / m <sup>3</sup>	\$50.00 / m <sup>3</sup>

## 2.2.2 Métodos microbiológicos para la producción de aromas.

### 2.2.2.1 Fermentación

La fermentación se ha usado empíricamente desde hace muchos años en todo el mundo con los procesos de producción de bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza, también la fermentación microbiana se emplea para la producción de alimentos como el pan, el queso y otros alimentos tradicionales (Cuadro 2.6). En todos estos casos, la producción del aroma se realiza *in situ*. En la fermentación se usan fuentes de carbono y nitrógeno baratas y el producto se genera como resultado del metabolismo complejo del microorganismo; la fermentación es un proceso de biosíntesis.

Cuadro 2.6. Algunos ejemplos de producción de aromas en los alimentos fermentados tradicionales

(Adaptado de Christen, 1995)

Alimento (origen)	Substrato	Microorganismo (s)	Utilización
Ketjap (Indonesia)	soya	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sazonador
Pozol (México)	Maíz	Levaduras y bacterias	Alimento base
Miso (Japón, China)	Arroz, soya	<i>A. Níger, lactobacilos</i>	Sazonador
Sufu (China)	Soya	<i>Mucor sp</i>	Queso de soya
Tempeh (Indonesia)	Soya	<i>Rhizopus sp.</i>	Sustituto de carne
Torani (India)	Arroz	<i>Candida, Saccharomyces</i>	Sazonador
Kimchi (Corea)	Legumbres	Bacterias lácticas	Condimento
Koji	Arroz	<i>Aspergillus oryzae</i>	Alimento
Sake	Arroz	<i>Aspergillus oryzae</i>	Bebida
Beiju	Masa de yuca	<i>Neurospora crassa</i>	Alimento

### ***2.2.2.2 Biotransformación***

En la biotransformación es necesario un sustrato adecuado para realizar modificaciones específicas o interconversiones de estructuras químicas por células enteras o por enzimas. Las células que se emplean en el proceso de biotransformación pueden estar en crecimiento o pueden ser células que ya no crecen. Estas interconversiones se pueden llevar a cabo empleando agua como medio de reacción o disolventes orgánicos, estos últimos, son los llamados medios no convencionales (Klibanov, 1986; Halling, 1994; Agrawal, 2001).

La estricta separación entre crecimiento microbiano y biotransformación con células que ya no crecen (células en reposo), ofrece muchas ventajas, como por ejemplo: 1) Cada paso puede optimizarse individualmente y se excluye una influencia negativa del sustrato o el producto cuando la célula está en crecimiento. 2) La edad de la célula y la densidad que da la conversión óptima, se puede determinar fácilmente. 3) Cuando se usan disolventes, el paso de biotransformación no es susceptible de contaminación, porque el medio de transformación es diferente. 4) El aislamiento del producto es mucho más fácil porque el medio de transformación es menos complejo (Banerjee, 1993).

Los microorganismos se pueden usar para producir biotransformaciones de precursores a aromas naturales. El microorganismo seleccionado se crece bajo condiciones que favorecen a la enzima o ruta enzimática, entonces las células se cosechan y se resuspenden a una densidad celular alta, en un medio que limita su crecimiento posterior. La biotransformación del compuesto añadido, se puede realizar a eficiencias que van hasta el 100%. Los problemas de una reacción lenta, se superan con frecuencia por una alta concentración celular. El empleo de células enteras en las biotransformaciones ofrece una alternativa a los procesos químicos o enzimáticos convencionales. Sin embargo, es necesario superar algunas desventajas del uso de células enteras, como las reacciones que frecuentemente involucran el uso de sustratos a bajas concentraciones

(frecuentemente milimolar) y los rendimientos de la reacción y la producción de compuestos es con frecuencia baja (Welsh y cols. 1989; Molinari y cols. 1995).

Un ejemplo de la utilidad de las biotransformaciones es el siguiente: el bajo rendimiento de los terpenos producidos microbiológicamente, junto con la abundancia de terpenos en las plantas, hacen que el desarrollo de procesos de fermentación para producción de terpenos del aroma sea innecesaria. El valor real de los microorganismos para la producción de muchos compuestos es la biotransformación de compuestos naturales baratos a otros de valor más elevado (Panke y cols. 2004), como es el caso de la biotransformación llevada a cabo por *Pseudomonas putida* de mentona a L-mentol (Kieslich y col., 1986). Muchas bacterias y hongos son capaces de usar terpenos como única fuente de carbono y energía. La degradación de terpenos la hace *Pseudomonas*, porque este microorganismo posee la flexibilidad genética de sintetizar una gran variedad de oxigenasas y enzimas relacionadas, necesarias para llevar a cabo la activación y ruptura de la cadena lateral del terpeno y de las uniones del anillo de carbonos (Welsh y col., 1989).

Humprey y col. (1990) patentaron un proceso de bioconversión de aceite de coco en metil cetonas por *Aspergillus Níger*. Gatfield y col. (1993) transformaron al ácido ricinoleico en  $\gamma$ -decalactona con una cepa de *Candida*.

Otro ejemplo de biotransformaciones para la producción de compuestos de mayor valor es la conversión de fenilalanina a 2-feniletanol con hongos en crecimiento del género *Aspergillus*. El 2-feniletanol tiene aroma de rosas y se usa en las industrias de los alimentos y de los cosméticos (Lomascolo y cols. 2001).

La inmovilización celular es un método muy útil para realizar reducciones con levaduras de  $\beta$ -cetoéster a los correspondientes alcoholes, estas reducciones son enantioselectivas y

estereoespecíficas. Las matrices de inmovilización usadas con más frecuencia son de alginato, poliuretano o carragenina (Nakamura y col., 1985).

Actualmente los procesos microbianos han llegado a ser una tecnología efectiva y controlada para la producción de compuestos relacionados con el sabor (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Compuestos del aroma y del sabor producidos por microorganismos (Adaptada Konar, 2000).

Sabor	Microorganismo	Molécula
Base de chocolate	<i>Saccharomyces sp.</i>	Isovaleraldehído
Bases para bebidas	<i>Sacharomyces sp.</i>	Ésteres etílicos
Ésteres frutales	<i>Geotrichum sp.</i>	Butirato de 2-metiletilo
Ácidos	<i>Lactobacilos</i>	Ácido succínico
Aldehídos	<i>Candida sp.</i>	Acetaldehído
Alcoholes	<i>Clostridium sp.</i>	Butanol, etanol
Nucleótidos	<i>Bacillus sp.</i>	Inosina
Nucleósidos	<i>Bacillus sp.</i>	5-Inosina monofosfato
Pirazinas	<i>Pseudomonas sp.</i>	3-isobutil-2-metoxipirazina
Terpenos	<i>Streptomyces sp.</i>	Cadinol

### 2.2.2.3 Métodos enzimáticos para producir aromas.

Los métodos biotecnológicos a partir de microorganismos, además de ser biosintéticos o de biotransformación, pueden hacer uso de las enzimas (Bigelis, 1992; Burkhead y col., 1994). Una de las principales razones para usar enzimas, es la preparación de compuestos puros enantioméricamente. Los métodos enzimáticos se caracterizan por su suavidad, por lo que son útiles cuando los sustratos o los productos de reacción son lábiles químicamente. Muchos productos comerciales se han desarrollado con tecnología enzimática, como la producción de amino ácidos, derivados de ácidos nucleicos, y azúcares. La L-alanina se prepara exclusivamente

con enzimas como la aspartato-(R)-descarboxilasa, el ácido L-aspartico con la aspartasa, un jarabe alto en fructosa con la glucosa isomerasa. Un panorama del uso actual de las enzimas, muestra que la mayor parte de las aplicaciones cae en reacciones estereolíticas y algunas en reacciones de deshidrogenación, aunque las deshidrogenaciones se llevan a cabo mejor con microorganismos completos (Winterhalter y Schreier, 1993).

#### ***2.2.2.4 Métodos de ingeniería genética para la producción de aromas.***

La ingeniería genética juega un papel importante para la producción de aromas. Este proceso es mucho más complicado para plantas que para microorganismos, por ejemplo, mientras que por la eliminación de solamente un gen en un microorganismo, se puede obtener el efecto deseado, en plantas varios genes casi idénticos, pueden codificar para proteínas similares.

Se ha usado a la ingeniería genética en jitomates y petunias para incrementar la producción de linalol el cual es un repelente de insectos (Capell y Christon, 2004). Algunas enzimas que se han obtenido a partir de microorganismos usando la ingeniería metabólica son las proteasas, amilasas y lipasas (Winterhalter y Schreier, 1993).

Las técnicas de manipulación genética que se usan son la mutación no específica, la replicación genética aumentada y la clonación de material genético en líneas celulares más estables que crezcan más rápido. Las mutaciones introducidas por manipulaciones genéticas pueden inducir cambios en rutas que producen acumulación de los metabolitos deseados. Similarmente una mutación puede disminuir la susceptibilidad de un microorganismo a la inhibición por producto o a la represión catabólica dando como resultado un incremento en la formación de producto. La mutagénesis no específica se puede usar para amplificar genes, que pueden aumentar la salida de enzimas específicas para aumentar la formación de producto. El material genético responsable de codificar rutas específicas, se puede remover de un organismo

donador, transferido vía un vector apropiado e insertarlo en un organismo huésped (De Vos y Hugenholtz, 2004).

### ***2.3 Crecimiento microbiano***

Los microorganismos para su crecimiento requieren de una fuente de materia y de una fuente de energía. En la mayoría de las fermentaciones industriales la fuente de carbono y la fuente de energía son la misma, por ejemplo glucosa, pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas por la composición interna del microorganismo, así como otros requeridos para la producción de metabolitos especiales.

Un medio de cultivo se encuentra definido como la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, la cual incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias.

#### ***2.3.1 Factores de crecimiento. Tiamina***

Las vitaminas o factores de crecimiento son compuestos orgánicos que funcionan como coenzimas y son eficientes en cantidades pequeñas. Muchos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar estos componentes, pero algunos microorganismos no pueden hacerlo y es necesario proporcionarles estas sustancias. La tiamina es un regulador de crecimiento, que en el caso de algunos microorganismos como *C. fimbriata*, el microorganismo no puede producir, éste es un hongo auxótrofo en tiamina y requiere de ella para la formación del peritecio que es el sitio en donde se producen las esporas sexuales (Robins y Ma, 1942; Barnett y Lilly, 1947).

Las enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina catalizan varias reacciones como la fenilpiruvato descarboxilasa que interviene en la ruta de Ehrlich en levaduras; la acetolactato sintasa que esta presente en la biosíntesis del 2,3-butanodiol en *Klebsiella pneumoniae*; la transcetolasa en la ruta de las pentosas-fosfatos en bacterias y levaduras y la acetohidroxiácido sintasa que participa en la biosíntesis de aminoácidos ramificados en el metabolismo de los hongos (Pohl y col. 2004).

El pirofosfato de tiamina (TPP) es la forma coenzimática de la vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), su estructura está formada por un anillo pirimídico y otro tiazólico. El TPP es importante en la ruptura de los enlaces adyacentes al carbono carbonílico como en la descarboxilación de  $\alpha$ -cetoácidos y en reordenamientos en los que existe transferencia de un grupo aldehído activado desde un átomo de carbono a otro. El anillo de tiazolio es la parte funcional del pirofosfato de tiamina (Figura 2.3), el protón C-2 del anillo es relativamente ácido y su pérdida produce un nucleófilo que es la especie activa en las reacciones de TPP. Este carbanión se adiciona fácilmente a grupos carbonilo, lo que facilita las reacciones como la descarboxilación catalizada por la piruvato descarboxilasa (Lehninger, 1994).

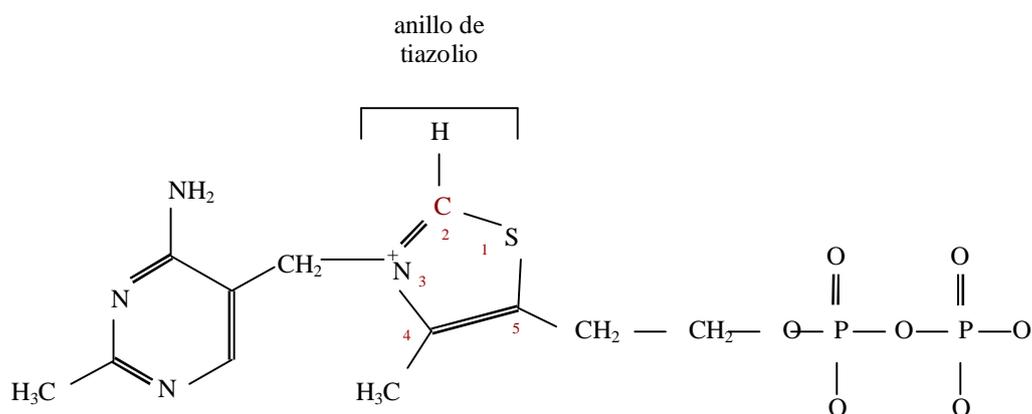


Figura 2.3 El pirofosfato de tiamina (TPP).

### ***2.3.2 Efecto de parámetros ambientales sobre la biomasa y la producción de aromas***

El pH es un parámetro particularmente importante que afecta el crecimiento microbiano y tiene influencia en las rutas metabólicas y en los productos generados por los microorganismos.

Hay muchos factores que ocasionan cambios de pH en un bioproceso, como: la formación de productos ácidos, la entrada de nutrientes, los productos de reacción enzimática de óxido reducción, los cambios en la capacidad amortiguadora del medio y una agitación deficiente. El cambio de pH durante la fermentación, puede afectar la membrana celular, la morfología de la célula, la solubilidad de las sales y del oxígeno, el estado de ionización de los sustratos, la osmolaridad de la solución, la toma de varios nutrientes y los productos del metabolismo (Wang y McNeil, 1996). Las enzimas intracelulares están protegidas de los cambios de pH ambientales, pero todas las enzimas extracelulares son sensibles al pH del medio. Los mecanismos de transporte de los sustratos al interior de la célula, también dependen del valor del pH. Los hongos son muy tolerantes a bajos valores de pH (acidófilos) pero la mayoría tienen su óptimo entre 5.6 y 6.8 unidades de pH, para el crecimiento.

En los organismos aeróbicos el oxígeno juega un papel vital en muchos aspectos del metabolismo celular. Por ejemplo, el oxígeno actúa como un aceptor de electrones terminal para las reacciones de oxidación que proporcionan energía para las actividades celulares. Los microorganismos facultativos son capaces de realizar respiración o fermentación, dependiendo de la accesibilidad del oxígeno en el medio de cultivo.

El oxígeno se incorpora en las moléculas orgánicas a través de la actividad catalítica de la oxigenasa. Puede actuar como un regulador de enzimas. Muchos sistemas enzimáticos se inducen o reprimen por el oxígeno, por lo que los cambios en oxígeno disuelto, con frecuencia, influyen en la tasa de respiración, síntesis y actividades de enzimas y en la formación de productos

metabólicos (Wang y McNeil, 1996). Las quinolonas son antibióticos usados para tratar la infección bacteriana, probablemente su funcionamiento es por estrés oxidativo, ya que induce la formación de radicales libres oxígeno (Nelson y col., 1997).

Por otra parte, se ha visto que la presencia del dióxido de carbono en los medios de cultivo produce deformaciones de la célula (Mc Intire y Mc Neil, 1998). Los niveles moderados o bajos de CO<sub>2</sub> producen alteraciones en la reología y ocasionan problemas de mezclado y transferencia de masa (McNeil y Harvey, 1993).

Todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento, así como temperaturas mínimas y máximas a las cuales pueden sobrevivir. La óptima es por supuesto la más favorable para el crecimiento y varía de acuerdo con el tipo de microorganismo, las temperaturas críticas son aquellas que permiten el crecimiento y la multiplicación dentro de ciertas condiciones específicas, correspondiendo a la más alta y a la más baja respectivamente de las temperaturas que los microorganismos pueden resistir. Para los hongos estas temperaturas están entre 20 y 30 °C.

#### ***2.4 Respuestas de los microorganismos al estrés ambiental.***

Las células de los microorganismos son capaces de tolerar y reaccionar a un amplio rango de cambios ambientales. Entre las variables ambientales que afectan a los microorganismos, están: el pH, la composición del medio, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y de agua, el potencial redox, la aireación y la agitación del medio. Un cambio en alguna de estas variables, puede producir alteraciones en las velocidades de reacción enzimáticas. Los cambios de temperatura pueden afectar las velocidades de reacción de las enzimas, y los cambios osmóticos pueden influir en los movimientos de los solutos a través de las membranas. Todos estos cambios, producen en la célula un estado de estrés.

El estrés es la pérdida del estado fisiológico estable de un organismo vivo, es un factor que se produce cuando hay limitación o exceso en el valor de alguna variable del medio de cultivo y produce ajustes al metabolismo y a los procesos celulares necesarios para proteger a la célula en contra del efecto negativo del cambio ambiental y para reparar cualquier daño molecular (Levit, 1980). Las alteraciones de las condiciones físicas o químicas que tengan un efecto negativo en el crecimiento celular requieren de respuestas rápidas y drásticas para asegurar la supervivencia del microorganismo. La célula adquiere resistencia, tolerancia y mecanismos de prevención a daños produciendo proteínas y enzimas específicas a diferentes niveles o una actividad diferente a la que tenía antes de la exposición al estrés, ya que su metabolismo está regulado en forma poco rigurosa, lo cual permite la acumulación de metabolitos. Por ello es posible influenciar la cantidad y la calidad de los compuestos volátiles producidos con la alteración de los factores ambientales y nutricionales (Welsh y col., 1989). También muchos microorganismos sufren cambios morfológicos en respuesta a los cambios ambientales. Los hongos muestran una gran variedad de adaptaciones morfológicas incluyendo la formación de los cuerpos fructificantes, en respuesta a un estímulo apropiado (Wang y McNeil, 1996). A los mecanismos moleculares inducidos por condiciones adversas, se les denomina respuestas al estrés; el estrés es una de las herramientas de la naturaleza, no es algo que deba combatirse (Hohmann, 1997). El estrés puede ser un factor que si se aplica en exceso mata, aunque hay microorganismos que a pesar del estrés crecen, sobreviven y se propagan. En los microorganismos, se ha encontrado que tiene efecto en la producción de metabolitos valiosos para el hombre, como en la producción de antibióticos por hongos, como es el caso de la  $\beta$ -lactama (Martin y Demain, 1990); y en la producción de compuestos del aroma como la  $\gamma$ -decalactona por la levadura *Sporidiobolus salmonicolor* (Gervais y Batut, 1989).

Las bacterias del suelo, como *Bacillus subtilis* tienen que sobrevivir y adaptarse a una gran variedad de condiciones ambientales adversas, incluyendo un amplio rango de temperaturas y ha adoptado un sistema complejo para responder rápidamente a estos cambios ambientales. Esta adaptación involucra la inducción de proteínas de estrés y la producción de proteínas ácidas pequeñas, las cuales han demostrado que protegen al DNA de la espora contra un número de agentes adversos incluyendo el calor.

Las bacterias responden a una disminución abrupta de la temperatura con la inducción de proteínas específicas clasificadas como proteínas de shock frío. Estas proteínas protegen las estructuras celulares tales como el DNA, la membrana o ribosomas, contra la disfunción inducida por la baja temperatura y mantiene la eficiencia del metabolismo en un nivel óptimo. La exposición de *B. subtilis* al frío resulta en la inducción de 53 proteínas, 24 de ellas comunes a todas las temperaturas (Movahedi y Waites, 2002).

Se ha visto que las bacterias al inicio de la privación producen proteínas de estrés y expresan genes que capacitan a las células para entrar en un estado de adaptación que les permite sobrevivir a la exposición de muchos estreses físicos. Algunas bacterias como *Vibrio (Listonella) Anguillarum* y *Enterococcus faecalis*, responden a la limitación de nutrientes activando mecanismos de respuesta como la diferenciación formando estructuras resistentes al estrés, como endosporas o mixosporas. Otras bacterias se aíslan del estrés por limitación o privación de nutrientes, por medio de células vegetativas con activación metabólica baja, vía la activación de un estado viable pero no cultivable (Nelson y col., 1997).

### ***2.4.1 Estrés por deficiencia en la disponibilidad del agua.***

Cuando los microorganismos no tienen acceso a la cantidad de agua que necesitan, se les dificulta la supervivencia y sufren estrés osmótico. En alimentos se utiliza el efecto de la baja disponibilidad de agua, para controlar el desarrollo de microorganismos (Brul y Coote, 1999).

La disponibilidad de agua por el microorganismo en el medio se mide con la actividad de agua ( $a_w$ ). La  $a_w$  es una medida que indica el agua “libre” en el medio; “libre”, se refiere a las partículas de agua en un producto que no están unidas física o químicamente y que las pueden usar los microorganismos para su metabolismo. La  $a_w$  es un parámetro que mide la accesibilidad del agua en el medio es fundamental para la transferencia de masa de agua y solutos a través de la membrana (Gervais y Sarrete, 1990),

La actividad de agua ( $a_w$ ) se mide como una tasa de la presión del vapor de agua sobre cualquier muestra a la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Los productos sin agua libre tendrán una  $a_w$  de 0, mientras que el agua pura tiene una  $a_w$  de 1 y su valor decrece con la adición de solutos. Las mediciones de energía están influenciadas por potenciales que afectan la unión de las moléculas de agua; esto incluye potenciales de matriz, energías químicas de unión, potenciales osmóticos, potenciales de gravedad y potenciales de presión. Alterando cualquiera de estos potenciales, la  $a_w$  de un producto puede también alterarse.

Un parámetro relacionado con la  $a_w$  es la presión osmótica, la cual se define como la fuerza por unidad de superficie necesaria para detener el flujo neto de moléculas de agua desde una zona con elevada actividad de agua a otra en la que esta actividad es baja. A medida que la  $a_w$  disminuye y aumenta la presión osmótica, es necesario que la  $a_w$  del citoplasma sea aún más baja o que su presión osmótica sea aún más elevada. La célula consigue equilibrarse mediante la

producción de concentraciones crecientes de solutos compatibles, que no deben obstaculizar la función del citoplasma.

El agua dentro de la célula realiza dos funciones primordiales: 1) es un disolvente y contribuye a proveer nutrientes y eliminar desechos o metabolitos disueltos. 2) en un aspecto estructural contribuye a la estabilización de la estructura de la membrana plasmática preservando de esta manera su permeabilidad. En el medio intracelular contribuye a mantener el volumen celular, especialmente cuando la célula se coloca en un medio hipertónico, particularmente en la desecación o en condiciones de congelamiento, es decir que el agua determina el turgor, forma y tamaño de la célula; determina también la estructura de las proteínas y de los ácidos nucleicos. De estas diferentes funciones, se puede entender porque el agua es esencial para el metabolismo de los microorganismos (Gervais y col., 1996).

Las reacciones que tienen lugar en el citoplasma transcurren en un medio acuoso, el citoplasma está rodeado por una membrana generalmente permeable a las moléculas de agua, las cuales pueden pasar libremente del citoplasma al medio y del medio al citoplasma. Este flujo dinámico de moléculas de agua en ambos sentidos normalmente se haya en estado estacionario de modo que todo organismo vivo sólo estará agobiado si existe un flujo neto hacia el exterior del citoplasma, que conduce a la plasmólisis o si existe un flujo neto hacia el interior de la célula que conduce a la rotura de la membrana. En bacterias y hongos se impide la rotura por la existencia de una pared celular (Homann, 1997).

*Escherichia coli* es capaz de crecer en ambientes que van desde soluciones acuosas muy diluídas de nutrientes esenciales a medios que contienen concentraciones molares de sales de no electrolitos. Se ha visto que en respuesta al estrés, *E. coli* expresa un amplio conjunto de genes específicos. El crecimiento en ambientes con tan amplio rango de osmolaridad (al menos 100 veces), posee retos fisiológicos para las células; entre las primeras respuestas de adaptación al

ambiente hiperosmótico hay un gran aumento en la cantidad de iones potasio citosólico. Después de la acumulación de iones potasio ocurren mecanismos secundarios de adaptación incluyendo la acumulación de glutamato, la síntesis de trehalosa y la salida de putrescina. *E. coli* toma un número de osmoprotectores (como betaína y prolina) cuando están accesibles externamente. Estos solutos son capaces de incrementar la presión osmótica, sin interferir en las funciones vitales de las proteínas celulares (Weber y Jung, 2002).

Desde un punto de vista biotecnológico, el control de la  $a_w$  puede usarse para modificar la producción metabólica o excreción de sustancias de un microorganismo (Gervais y col., 1992). Existen numerosos experimentos en algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos en donde se estudia la influencia de la actividad del agua del medio en la producción de metabolitos (Marechal y Gervais, 1994; Gervais y col., 1988). Es posible realizar este tipo de estudios empleando depresores de la actividad del agua, como: glicerol y otros polioles, los cuales no influyen por su naturaleza en la fisiología de microorganismo (Gervais y Batut, 1989).

En estudios con *Trichoderma viride* se han logrado aumentos en la producción de aroma de hasta un 300%, aunado a un incremento en la biomasa, al ocasionar una disminución de la  $a_w$ ; este hecho puede deberse a la acumulación del aroma durante el período de estrés y estar relacionado con la osmoregulación del hongo; cuando la presión osmótica ambiental aumenta las células tienen que equilibrar su medio interno con el exterior con una salida pasiva de agua: Dos caminos son posibles para evitar esta pérdida de agua: 1) la entrada de solutos pequeños como glicerol a través de la membrana o 2) la síntesis de moléculas en el medio interno. Esto significa que la síntesis de aromas puede estar ligada a este proceso de osmoregulación (Gervais y col., 1988).

En estudios con *Sporidiobolus salmonicolor* se logró un 80% más de la producción de compuestos del aroma de bajo peso molecular y se encontró que estos compuestos intervienen

eficientemente en las propiedades termodinámicas del agua en la célula acelerando la osmoregulación (Marechal y Gervais, 1994).

Como puede verse, las estrategias empleadas por los diferentes microorganismos para ayudarse a sobrevivir y crecer a una actividad acuosa reducida es diferente, pero todos siguen una aproximación común: inicialmente hay un consumo energético con el fin de lograr la acumulación intracelular de un soluto o solutos para balancear la  $a_w$  dentro de la célula contra la  $a_w$  externa, para prevenir así el movimiento del agua fuera de la célula. Estos solutos pueden acumularse a muy altas concentraciones, pero al mismo tiempo no deben inhibir las funciones normales de las células, como la síntesis de proteínas o síntesis de DNA, por ello, son conocidos como solutos compatibles (Bloomberg y Adler, 1993; Hocking, 1993).

Se ha encontrado que el valor óptimo de  $a_w$  debe ser mayor para el crecimiento que para la esporulación y se propone que las rutas metabólicas de la célula son diferentes según el valor de  $a_w$  (Inch y Trinci, 1987; Gervais y Molin, 1988). El nivel mínimo observado para el desarrollo de microorganismos es  $a_w = 0.65$  para levaduras xerotolerantes (Gervais y col. 1992).

Cuando se exponen los hongos a potenciales de agua menores por la presencia de sal, la mayoría de ellos sintetizan polioles como el glicerol para ajustarse a las condiciones hiperosmóticas (Davis y Ristow 1995). Varios estudios muestran claramente que el glicerol sirve como un soluto compatible asociado con el crecimiento en los hongos, y que su probable función es la regulación del turgor cuando hay estrés por solutos (Bloomberg y Adler 1993).

### ***2.5 Cultivos en medios sumergidos y en medios sólidos.***

En la naturaleza, la mayoría de los hongos crecen en superficies sólidas. Tales superficies proporcionan una base nutricional satisfactoria y ventajas competitivas sobre la mayoría de las

bacterias que requieren un ambiente con mayor humedad. Sin embargo en la mayoría de los productos de hongos que se preparan a gran escala, se emplean medios de cultivo sumergidos por que proporcionan una uniformidad espacial en las condiciones de cultivo, los nutrientes son accesibles con facilidad por difusión. Tal uniformidad es importante en el diseño de procesos a gran escala y permiten al operador la oportunidad de ejercer un control sobre el ambiente y consecuentemente controlar la fisiología celular. La finalidad de la aireación y de la agitación, en los cultivos líquidos, son: además de proporcionar mezclado de los contenidos, mantener un ambiente homogéneo y suficiente transferencia de masa y calor; aumentar la transferencia de oxígeno (el cual tiene una baja solubilidad en agua) al medio líquido y a la célula para incrementar la toma de nutrientes y sacar los productos metabólicos de la células al medio; y mejorar la remoción de CO<sub>2</sub> del organismo al medio y ayudar al dióxido de carbono a escapar del medio (Forage y col.,1985; Boker y col., 2001).

En el cultivo sumergido muchas cepas de hongos filamentosos pueden crecer como bolitas o en la forma filamentosa y se puede distinguir la morfología a dos niveles: la morfología microscópica y la macroscópica. En la primera se caracterizan los elementos de la hifa (la longitud total y el número de puntas) y la morfología macroscópica describe si los elementos hifales se aglomeran en bolitas o se separan unos de otros. La concentración microbiana también puede influir en el manejo del cultivo, dado que cambia la reología de los medios de cultivo (Goudar y col., 1999).

Se han producido aromas por fermentación en estado sólido (Pandey, 1992; De Araujo y col., 2002). El control de los cultivos en estado sólido es difícil comparado con los cultivos sumergidos, las razones son las siguientes: 1) Es muy difícil estimar el crecimiento del micelio en medio sólido, debido a la penetración del micelio en el soporte. 2) el crecimiento se diferencia en algunos estados y altera las propiedades fisiológicas 3) es necesaria una cantidad de inóculo

mayor en un medio sólido que en un medio líquido 5) las condiciones ambientales tales como la nutrición afectan la fisiología 6) es muy difícil el control de las variables ambientales como el pH, la actividad del agua ( $a_w$ ), el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono y la humedad (Ito y col., 1990) 7) hay dificultad de eliminar el calor, generado por el metabolismo orgánico y por consiguiente 8) existe pérdida de humedad en fermentaciones de larga duración.

Sin embargo, la fermentación en estado sólido tiene algunas ventajas como la reducción del espacio ocupado por el fermentador sin sacrificar el rendimiento del producto debido a que dentro del equipo no es necesario ocupar grandes volúmenes de agua (Raghavarao y cols. 2003).

## **2.6 Metabolismo de hongos**

### **2.6.1 Oxidación de nutrientes.**

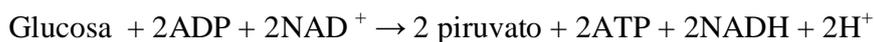
La oxidación de los nutrientes consiste en la captación de electrones de un compuesto reducido por parte de un agente oxidante que llamaremos aceptor final de electrones. Este aceptor final puede ser inorgánico: oxígeno (con  $\Delta G^{0\prime} = -237$  kJ); o  $\text{NO}_3^-$  con  $\Delta G^{0\prime} = -163$  kJ; o compuestos orgánicos tales como el fumarato con  $\Delta G^{0\prime} = -86$  kJ. Cuanto más negativo sea el valor de  $\Delta G^{0\prime}$ , mayor cantidad de energía se podrá obtener de la oxidación y más eficiente será el proceso. Puede verse que la oxidación en la que el aceptor final de electrones es el  $\text{O}_2$  es la que más rendimiento de producción de energía permite. Esta energía se obtiene de la oxidación de compuestos orgánicos reducidos. Los nutrientes proporcionan esos compuestos reducidos y, en el curso de la oxidación, se libera energía (que se acumula en forma de moléculas almacenadoras de energía, especialmente el ATP) y se producen elementos estructurales que servirán para la construcción de nuevas células (crecimiento y diferenciación). Al proceso por el que se obtiene energía y elementos estructurales básicos a partir de nutrientes se le denomina catabolismo y al

que utiliza la energía obtenida en el catabolismo para sintetizar nuevos componentes celulares se le denomina anabolismo. Es importante tener en cuenta que aunque se estudien de forma separada el anabolismo y el catabolismo, ambos tipos de procesos ocurren simultáneamente de forma que conforme se van produciendo elementos estructurales y energía en el catabolismo, esos elementos se usan para formar nuevos componentes celulares en procesos anabólicos.

### ***2.6.1.1 Catabolismo de la glucosa (glucólisis)***

La glucólisis es el principio de las rutas metabólicas, tanto respiratorias como fermentativas. A partir de los carbohidratos se obtiene la llave intermedia que es el piruvato y el balance energético es de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa.

La ruta de Embden-Meyerhof (EM). Es la más común en todo tipo de organismos incluyendo hongos filamentosos, levaduras y muchos tipos de bacterias. Esta ruta puede funcionar tanto en condiciones aerobias como en anaerobias y se lleva a cabo por una serie de 10 enzimas citoplásmicas. El resultado de la ruta EM es el siguiente:



Como resultado de esta ruta se obtiene una pequeña cantidad de energía (dos moles de ATP por mol de glucosa), por procesos de fosforilación a nivel de sustrato; se obtienen dos moles de NAD reducido (NADH+ H+) y se ha logrado una oxidación parcial del carbono de la glucosa para producir como metabolito final dos moles de piruvato por mol de glucosa catabolizada.

### ***2.6.1.2 Fermentación microbiana.***

En la fermentación las células pueden obtener energía sin llevar a cabo un proceso de fosforilación oxidativa, es decir que en la fermentación se obtiene mediante un proceso químico

de fosforilación a nivel de sustrato sin que se produzca una variación neta del poder reductor de la célula. Los procesos de fermentación se encuentran en todo tipo de organismos y probablemente represente una de las formas más antiguas de conservación de la energía.

En los procesos de fermentación la energía química también deriva de la oxidación de compuestos reducidos. En cualquier proceso de oxidación se produce una transferencia de electrones desde el compuesto reducido que se oxida hasta el compuesto oxidado que se reduce, y en esa transferencia de electrones se produce la liberación de energía. En los procesos oxidativos el aceptor final de los electrones de la oxidación es el oxígeno. Sin embargo, en los procesos fermentativos, la transferencia de electrones se produce hasta llegar a un aceptor final que es un compuesto orgánico oxidado. Por consiguiente, en un proceso de fermentación (Figura 2.4) tanto el donador de electrones como el aceptor son compuestos orgánicos, mientras que en un proceso de respiración el donador de los electrones es orgánico y el aceptor inorgánico.

La respiración es mucho más efectiva energéticamente que la fermentación porque en la primera, la oxidación del compuesto orgánico es más completa que en ésta y, como resultado se liberan 688 kcal/mol ( $G^\circ$ ) en la respiración y solamente 58 kcal/mol en la fermentación. Las rutas fermentativas son anaerobias porque no requieren oxígeno como aceptor final de los electrones. Cuando se produce la entrada en el ciclo de Krebs del piruvato se va a generar una gran cantidad de  $NADH+H^+$  que se reoxida principalmente mediante la fosforilación oxidativa. Cuando una célula carece de cadena respiratoria, el  $NADH+H^+$  no puede reoxidarse a  $NAD^+$  y, por consiguiente, no se puede regenerar el agente aceptor de hidrógeno necesario para las primeras fases de la glucólisis. Los procesos fermentativos reducen el piruvato regenerando el  $NAD^+$  necesario para los procesos metabólicos iniciales del catabolismo de la glucosa. Diferentes tipos de microorganismos reducen el piruvato de maneras diversas dando lugar a distintos procesos de

fermentación que se conocen por sus productos finales. En estos procesos puede producirse algún rendimiento energético; pero su principal función es la reoxidación del  $\text{NADH} + \text{H}^+$  a  $\text{NAD}$  necesario para poder iniciar los primeros pasos del catabolismo.

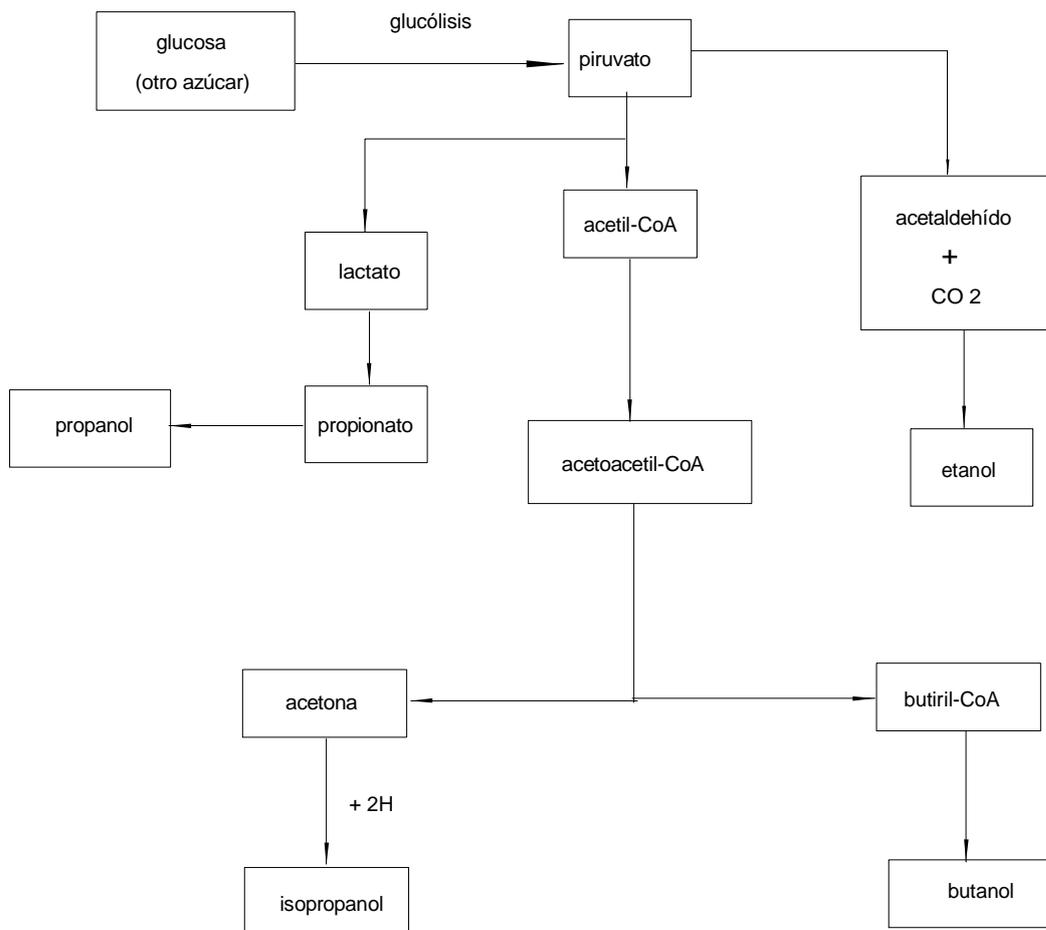
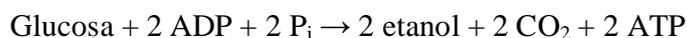


Figura 2.4 Fermentación, empleo del piruvato para la obtención de varios compuestos como: acetaldehído, etanol, propanol, acetona, isopropanol y butanol.

La ecuación general de la fermentación alcohólica es:



### ***2.6.1.3 Biosíntesis de compuestos del aroma***

Los microorganismos históricamente han jugado un papel muy importante en el desarrollo de compuestos del aroma y del sabor, dentro de muchos alimentos. Se ha estudiado la complejidad de los procesos que se han realizado durante miles de años para producir aromas delicados asociados con bebidas como la cerveza, el vino, alimentos sólidos como los quesos y el pan. El sabor y el aroma en los alimentos fermentados son el resultado de interacciones bioquímicas complejas, enzimáticas y no enzimáticas de azúcares, aminoácidos, lípidos y otras sustancias cuya reacción química es dirigida por parámetros como (temperatura, pH, tiempo) que se usan para procesar los alimentos (Hagedorn y Kaphamer, 1994).

#### ***2.6.1.3.1 Biosíntesis de terpenos, lactonas y compuestos carbonílicos.***

Los hongos producen diferentes sesquiterpenos y diterpenos, pero muy pocos monoterpenos, que son los compuestos del aroma. Varios sesquiterpenos son micotoxinas. Los ascomicetos y los basidiomicetos biosintetizan terpenos aromáticos como metabolitos secundarios. Los terpenoides con el grupo funcional aldehído (geranial, neral) son más valiosos como saborizantes, pero los microorganismos, forman con mayor abundancia los alcoholes terpénicos (geraniol, nerol, linalol, citronelol, terpineol) (Lanza y Palmer, 1977; Turner y Aldridge 1983; Davis y Croteau, 2000).

Muchos microorganismos son capaces de biosintetizar lactonas, pero desafortunadamente los rendimientos son bajos. La excepción es la producción microbiana *in situ* de lactonas en productos lácteos (Serrano Carreón y col., 1992). En el caso de los basidiomicetos, no parece probable una ciclización enzimática (lactonización), porque todos los basidiomicetos que generan lactonas tienen una disminución de pH entre 2 y 3, lo cual puede ser suficiente para químicamente catalizar la ciclización de ácidos 4- o 5-hidroxicarboxílicos (Abraham y Berger, 1994). La importancia del 4-decanólido es su impacto en los sabores de frutas como las fresas, duraznos, chabacanos y en productos de fermentación y lácteos (Krings y Berger, 1998).

Uno de los aromas más importantes de las dicetonas es el diacetilo (2,3-butanodiona), el cual tiene un sabor a mantequilla, semejante a nuez aunque es un compuesto del aroma de alto valor, pequeñas cantidades de él en jugos de frutas, vinos o cerveza producen mal sabor. La formación de diacetilo en la industria de lácteos es debida principalmente a las fermentaciones que llevan a cabo los estreptococos lácticos. El diacetilo se puede considerar como un subproducto de la síntesis de la valina (Figura 2.5).

Usualmente los aldehídos son sintetizados por microorganismos como intermediarios en la formación de alcoholes a través de la descarboxilación de cetoácidos. La mayor parte de los aldehídos son luego reducidos a alcoholes por la acción de alcohol deshidrogenasa.

Un compuesto importante en los aromas es el acetaldehído. Juega un papel primordial en los sabores de yogures y frutas como la naranja (Gatfield 1988). La formación microbiana de acetaldehído ha recibido mucha atención debido a su papel central en el metabolismo y su importancia como compuesto del aroma. Los microorganismos que lo producen contienen enzimas que catalizan su formación a partir de carbohidratos, proteínas o ácidos nucleicos.

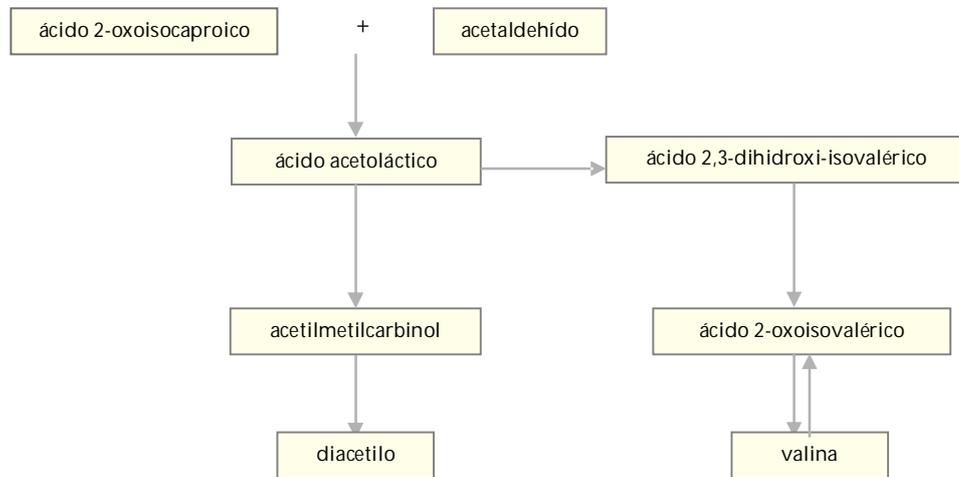


Figura 2.5. Ruta biosintética para el diacetilo.

#### 2.6.1.3.2 Biosíntesis de ácidos carboxílicos y alcoholes.

Los ácidos usados como saborizantes pueden producirse microbiológicamente, los más comunes son: acético, propiónico, butírico isobutírico, valérico, isovalérico y láctico, y se presentan mezclados, particularmente en fermentaciones anaeróbicas.

La biogénesis microbiana de los ácidos orgánicos puede suceder por cuatro rutas diferentes: el ácido láctico y la serie alifática de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub> aparecen primero como los productos finales de las fermentaciones; las síntesis clásicas de ácidos grasos se producen por una reacción dependiente de oxígeno; se cree que los isoácidos se derivan de la biosíntesis de aminoácidos vía la desaminación de aminoácidos; otros ácidos grasos libres se forman por la acción microbiana de las lipasas cuando degradan glicéridos a sus ácidos carboxílicos constituyentes y glicerol.

El desarrollo de procesos microbianos para la producción de ácidos, se ha limitado para acético, propiónico y butírico. El ácido acético puede producirse sintéticamente pero la mayor parte del ácido acético consumido por el hombre se produce por fermentación por varias especies del género *Acetobacter*, el cual es un proceso industrial muy bien establecido. El ácido butírico se usa para dar notas de mantequilla a los aromas y puede usarse en la producción de los ésteres etílico, butílico, isobutílico y amílico (Cenedella, 1986).

Mediante el uso de microorganismos, es posible reducir la acetona a isopropanol y el ácido propiónico a propanol. El hexanol se biosintetiza por los microorganismos a partir del ácido linoleico (Fromza y col., 1996). Los alcoholes C<sub>8</sub> saturados e insaturados, son importantes como aromas de hongos. La habilidad de producir estos alcanoles parece estar muy difundida entre los hongos. Estos alcoholes parece que se forman de las metilcetonas correspondientes por la acción reductiva de una o más deshidrogenasas.

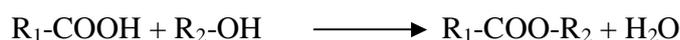
Dos alcoholes económicamente importantes que se identifican frecuentemente como metabolitos de hongos, son el alcohol bencílico y el alcohol fenético. Estos compuestos se encuentran en forma rutinaria en fermentaciones producidas por levaduras (Webb y Muller 1972) y se han observado como metabolitos de hongos como *T. roseum*, *Phellinus ignarius*, *P. laevigatus* y *P. tremulae*. El alcohol fenético también se ha detectado en el medio de crecimiento de *P. decumbes* y de *Ascoidea hylecoeti*, mientras que los alcoholes metilbencílico y dimetilbencílico se han identificado como metabolitos de *Mycoacia uda*. La importancia de estos alcoholes como precursores para la biosíntesis de aromas naturales debe promover el interés de aumentar su producción por medios fisiológicos y genéticos.

### 2.6.1.3.3 Biosíntesis de ésteres.

Los ésteres pueden producirse por hongos, levaduras y bacterias, pero las cantidades y tipos de ésteres varían de acuerdo con la especie microbiana. Se han encontrado con menor frecuencia ésteres aromáticos que ésteres alifáticos como metabolitos microbianos: por ejemplo los hongos del género *Phellinus* producen benzoato de metilo y de etilo así como el salicilato de metilo. Los ésteres de cadena lineal y ramificada contribuyen al aroma de casi todas las frutas y de muchos otros alimentos.

Se han descubierto cuatro tipos de reacciones productoras de ésteres:

a) **Síntesis**, que es la esterificación directa de un ácido con un alcohol, la cual se lleva a cabo en bacterias y en hongos filamentosos

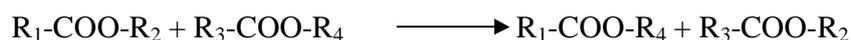


b) La **alcohólisis** de compuestos de acetyl CoA, como en el caso de *S. cerevisiae*



c) **Acidólisis**  $R_1\text{-COO-R}_2 + R_3\text{-COOH} \longrightarrow R_3\text{-COO-R}_2 + R_1\text{-COOH}$

d) **Transesterificación** Debe notarse que la transesterificación es algunas veces considerada como el resultado de dos reacciones sucesivas, hidrólisis y síntesis.



Interesterificación es un término general empleado para alcohólisis, acidólisis y transesterificación (Boutur y col. 1995).

### 2.6.1.3.4 Biosíntesis de alcoholes superiores

Los alcoholes superiores necesarios para la obtención de ésteres como propanol, isobutanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico y alcohol fenílico, se forman por catabolismo a través de la reducción de  $\alpha$ -cetoácidos los cuales pueden ser derivados por biosíntesis o por

degradación de aminoácidos (Ruta de Ehrlich). También se pueden formar por rutas anabólicas a partir de piruvato y acetilCoA; el penúltimo estado en la biosíntesis de todos los aminoácidos es la producción del  $\alpha$ -cetoácido apropiado, el cual sufre transaminación para formar el respectivo aminoácido.

Cuando se añaden los aminoácidos a una fermentación por levaduras, éstos sufren transaminación, seguido de descarboxilación del cetoácido resultante al correspondiente aldehído. El aldehído entonces es reducido por alcohol deshidrogenasa a un alcohol superior que tiene un carbono menos que el aminoácido, esta es la ruta de Ehrlich (Figura 2.6). La excepción es el propanol el cual no puede formarse por la ruptura de treonina exógena. Los  $\alpha$ -cetoácidos formados por esta ruta pueden sufrir ya sea transaminación a aminoácidos o descarboxilación y reducción para formar alcoholes superiores. Los  $\alpha$ -cetoácidos ocupan una posición pivotal en esta ramificación de la ruta.

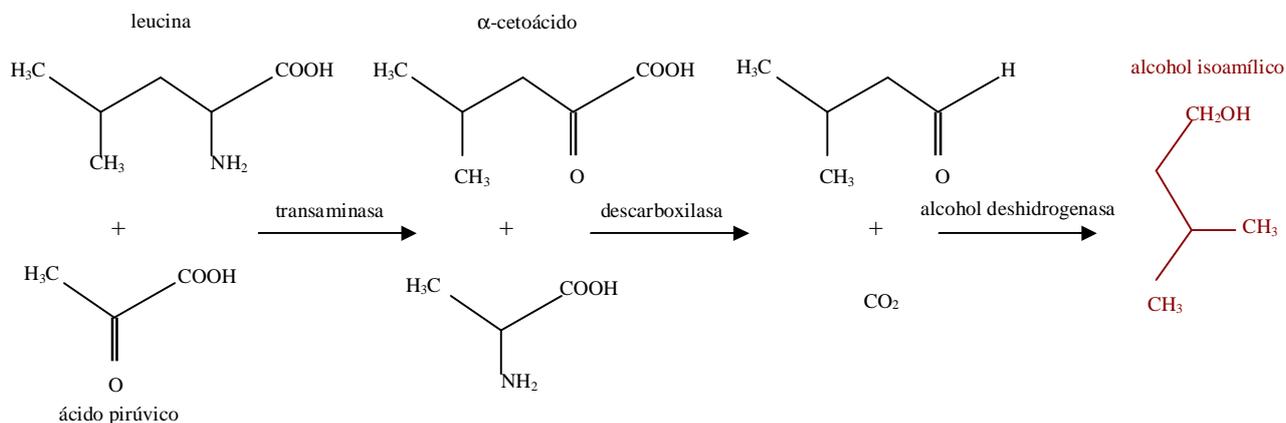


Figura 2.6. Ruta metabólica de Ehrlich para la producción de alcohol isoamílico.

### ***2.7 Los hongos como productores de compuestos volátiles.***

La mayor parte de los microorganismos productores de aromas son hongos (Maga, 1976); varios autores han reportado a los hongos como productores de aromas: para el aroma de vainilla y el de mandarina *Pycnopus cinnabarinus* (Falconnier y col., 1994), el de de coco *Trichoderma viride* (Gervais y Sarrete, 1990), el de durazno *Trichoderma harzianum* (Serrano-Carreón, y col., 1992), *Penicillium decumbes* aroma de rosa, pino y aromas frutales, *Aspergillus oryzae* para el aroma característico de hongo (Kaminski y col., 1974), y *Penicillium roqueforti* para el aroma de queso azul (Revah y Lebeault 1989; Larroche y col., 1994).

El género *Ceratocystis* es un buen ejemplo de los hongos productores de aromas. Existen varios estudios en los que se ha probado que el género *Ceratocystis*, produce una gran variedad de aromas (Lanza y col., 1976; Lanza y Palmer, 1977; Sprecher y Hanssen, 1983; Janssens, y col., 1992). *Ceratocystis fimbriata*, es un hongo filamentoso deficiente en tiamina (Robbins y Ma, 1942; Webster y Butler, 1967a) destaca por la rapidez de su desarrollo, la facilidad con que produce esporas (Christen y col., 1992) y la amplia gama de aromas frutales, de alta intensidad que produce. Los compuestos responsables del aroma son principalmente ésteres, como: acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isoamilo y butirato de etilo entre otros, como se ha corroborado en trabajos recientes, con fermentaciones en medio sólido (Christen y col., 1994, Christen, 1995) y en fermentaciones en medio líquido (Sánchez y col., 2002).

En 1922 se escribió el primer reporte sobre la producción de aromas por microorganismos (Omelianski, 1922). Más adelante, en la clasificación del género *Ceratocystis*, se mencionaba que los diferentes tipos de aromas producidos por las diferentes especies, podían servir como marcadores taxonómicos (Hunt, 1956) y se usaron de 1922 a 1965. Posteriormente, se describió a

*Ceratocystis moniliformis* como una fuente potencial de concentrados de sabor (Lanza y col., 1976), dado que al cambiar las fuentes de carbono y nitrógeno se obtuvieron diferentes aromas frutales (Cuadro 2.9). Se ha reportado que los terpenos que produce *Ceratocystis moniliformis* se forman a través del ácido mevalónico como sucede en varios tejidos vegetales (Lanza y Palmer 1977).

Cuadro 2.9 Producción de aromas por *C. moniliformis* en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de carbono	Aroma	Fuente de nitrógeno	Aroma
Dextrosa	Plátano	Urea	Plátano
Galactosa	Cítricos	Leucina	Plátano maduro
Glicerol	Pera enlatada	Glicina	Piña
Almidón de maíz	Melón y plátano	Metionina	Manzana

Adaptado de: Lanza y col., 1976.

En el aroma producido por hongos, se ha encontrado que algunos de los compuestos están presentes en trazas, mientras que otros en mayor cantidad en una relación de 1:1000 (Sprecher y Hanssen, 1983). Es evidente que tales diferencias en la acumulación de metabolitos volátiles da a los cultivos de *Ceratocystis* muy diferentes fragancias. El rendimiento y la composición de los metabolitos difieren enormemente dentro de una especie, estos resultados indican que generalmente la selección de las cepas apropiadas de algunas especies ofrecen la oportunidad de obtener rendimientos más altos de ciertos compuestos del aroma y por variación de las condiciones del cultivo, la producción de metabolitos volátiles se puede aumentar más de 1000 veces (Hansen y Sprecher, 1981). Se han evaluado métodos continuos que involucran el proceso de pervaporación, para aislar los compuestos del aroma en *C. moniliformis*, esto ha producido un mayor incremento en biomasa y en compuestos del aroma que en las fermentaciones por lote (Bluemke y Schrader, 2001).

En el Cuadro 2.10, se da información sobre la distribución de metabolitos volátiles en algunas especies de *Ceratocystis*. Se atribuye a los compuestos del aroma, la función de atraer a insectos que sirven para propagar sus esporas y se han comparado hongos del género *Ceratocystis* con otros hongos no dependientes de insectos en la producción de sus compuestos volátiles, se ha visto que el aroma de *C. fagacearum* es mucho más fuerte tanto en número de componentes como en rapidez de producción. El análisis de estos componentes, reveló que todos ellos son constituyentes de aromas frutales, los cuales probaron ser atractivos de insectos estos resultados sugieren que a través de la mimetización de los aromas de alimentos el olor de *C. fagacearum* es un atractivo para los insectos vectores (Hengchen y Pheland, 1992).

### **2.7.1 El hongo filamentoso *Ceratocystis fimbriata*.**

*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst fue descrito por primera vez por Halsted en 1890 (Andrus y col., 1933), es un hongo filamentoso, ascomiceto, perteneciente a la subdivisión *Ascomycotina*, de la familia *Ophiostomataceae* (adaptados para la dispersión por insectos), de la clase *Pyrenomycetes* (hongos periteciales). Es un patógeno de plantas, mejor conocido como la causa de la podredumbre de la papa, se han encontrado diversos aislados de *C. fimbriata* en diferentes localizaciones geográficas sobre una gran variedad de huéspedes, incluyendo al café, caucho, crotalaria, roble, álamo y varias especies de frutas con hueso. En muchos casos se vaciló en clasificarlo como *C. fimbriata* porque sus aislados no fueron patógenos a las papas o porque la morfología o dimensiones de las estructuras reproductivas no coincidieron con las características reportadas para el hongo *C. fimbriata*. Como *Ceratocystis fimbriata* está distribuido por todo el mundo en diferentes hospederos, puede esperarse una gran diversidad genética dentro de los aislados (Webster y Butler, 1967). Este hongo es económicamente importante, por que produce diferentes enfermedades, según la especie vegetal a la que ataca (Spatafora y Blackwell, 1994).

**Cuadro 2.10. Distribución de metabolitos volátiles en algunas especies de *Ceratocystis*.**

Especie	Terpenos	Esteres	Alcoholes	Sesquiterpenos	Cetonas	Referencias
<i>C. moniliformis</i>	Geraniol, citronelol, nerol, linalol, neral, geranial	Acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, lactonas	Etanol, isobutanol, alcohol isoamílico			Lanza y Palmer, 1976 Sprecher y Hanssen, 1983.
<i>C. virescens</i>	Linalol, terpineol, acetato de citronelilo, alfaterpineol, acetato de nerilo, citronelol, acetato de geranilo, nerol, geraniol	Acetato de 6-metil-5-hepten-2-ol	6-metil-5-hepten-2-ol	si existen	6-metil-5-penten-2-ona	Collins, 1978 Sprecher y Hanssen, 1983
<i>C. variolorpora</i>	Linalol, acetato de citronelilo, alfaterpineol, neral, geranial, citronelol, acetato de geranilo, nerol, geraniol, famesol, nerolidol	Acetatos			Aldehidos	Collins y Morgan, 1961 Schlinder y Bruns, 1980 Collins, 1978 Huball y Collins, 1978
<i>C. coerulea</i>	Citronelol acetato, citronelal, metilpentildehidrofarnesol,	Acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, acetato de fenil etilo	Etanol, isobutanol, 6-metil-5-hepten-2-ol, alcohol isoamílico		6-metil-5-hepten-2-ona	Collins y Morgan, 1961 Sprecher y Hanssen, 1983
<i>C. fimbriata</i>	Citronelol, linalol, geraniol	Acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo	Etanol, isobutanol		Alcaloides	Hanssen y Sprecher, 1981b
<i>C. fagacearum</i>		9 esterres	5 alcoholes		Aldehido y cetona	Lin, 1992
<i>C. piceae</i>		Delta lactonas, ésteres	si existen	6-protoilludeno		Yada y col. 1993, Hansen y col., 1986, Hiroshi e Hiroji, 1993.

*C. fimbriata* se reproduce de forma asexual o vegetativa y sexual, presenta esporas asexuales como: artrosporas, que son resultado de la fragmentación del micelio; clamidosporas que son las células que desarrollan una pared gruesa antes de separarse y endoconidias cilíndricas que se forman en la parte superior o lateral del micelio (hifas aéreas) y no están encerradas en un saco. Las esporas sexuales son las ascosporas, las cuales salen de los tubos germinativos de los peritecios después de 24 horas sobre agar de extracto de malta; las ascosporas hialinas, con o sin la vaina gelatinosa tienen formas variables, curvadas, lunadas o de forma de sombrero. El micelio o hifa es septado (Claus, 1989). El género se caracteriza por su peritecio de color oscuro con largos cuellos negros y ocho esporas sexuales. *C. fimbriata* es un hongo auxótrofo en tiamina y requiere esta vitamina para el desarrollo de su peritecio (Figura 2.7) (Robbins y Ma, 1942; Webster y Butler, 1967b).

*C. fimbriata* produce aromas frutales de alta intensidad como se demuestra por los trabajos realizados, diversos estudios han conducido a: la optimización de la producción de esporas (Christen y Raimbault, 1991), al igual que al estudio de las condiciones de fermentación en medio sólido empleando sustratos y soportes diferentes como salvado de trigo, bagazo de caña y soportes sintéticos con solución nutritiva (Christen y col., 1992; Christen y col., 1994; Christen y col., 1997). Algunos desperdicios agroindustriales como amaranto, frijol soya y casava se han evaluado para la producción de aromas por *C. fimbriata* en medio sólido (Bramorski y col., 1998). Se ha visto el efecto de la adición de nueve aminoácidos al medio de cultivo sobre la producción del aroma y la biomasa en medio sólido, entre los resultados se encontró que la leucina y la valina son los aminoácidos que más incrementan el aroma de plátano durante la fermentación (Meza y col., 1998). A través del análisis del espacio de cabeza de cultivos en medio sólido con *C. fimbriata*, se

han identificado algunos componentes del aroma como etanol, acetato de etilo, alcohol isoamílico y acetato de isoamilo, empleando la cromatografía de gases con detección de ionización de flama (Hansen y col., 1986; Christen, 1995, Meza y col., 1998).

En medio líquido se han realizado estudios en medio sintético variando las fuentes de carbono y nitrógeno, para evaluar la biomasa y la calidad del aroma por análisis sensorial (Christen y col., 1994).

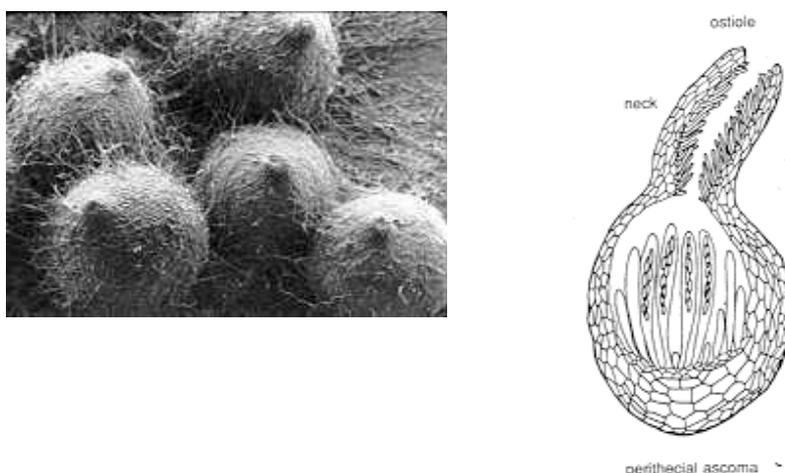


Figura 2.7. Peritecio, en su interior se producen las ascosporas.

### ***2.8 Métodos de extracción, purificación e identificación de los compuestos del aroma.***

El primer objetivo en la investigación de aromas es lograr el aislamiento de los compuestos específicos responsables del aroma a partir de alimentos frescos y procesados o de los medios de fermentación. Los métodos de aislamiento que prevalecen son destilación, extracción y adsorción. Como los aromas de una muestra son una mezcla muy compleja de compuestos volátiles, el rango de concentración en el que pueden estar estos compuestos

es generalmente muy amplio; la polaridad, la volatilidad y el tamaño molecular, son factores que deben tomarse en cuenta por que de ellos depende la efectividad de cualquier método. No todos los componentes del aroma, se pueden determinar usando el mismo método por que en muchos casos, los métodos carecen de sensibilidad hacia un determinado compuesto y/o a aquellos volátiles presentes en trazas. Es importante hacer una correcta selección de la técnica de aislamiento que se va a usar, o en ocasiones usar combinaciones de estas técnicas, de manera de poder detectar a los compuestos importantes del aroma (Teranishi, 1981; Winterhalter y Schreier, 1993).

### ***2.8.1 Separación de aromas por destilación.***

Los métodos de destilación aprovechan la volatilidad de los compuestos del aroma y la no volatilidad de la mayor parte de los otros componentes de los alimentos o medios de fermentación. La destilación es un término muy amplio que abarca varias técnicas como la destilación por arrastre de vapor, la destilación fraccionada, y la destilación molecular entre otras.

#### ***2.8.1.1 Destilación por arrastre de vapor.***

El arrastre por vapor de agua a presión atmosférica, es uno de los procedimientos de extracción más antiguos que existen, es un método que llevaron los árabes a Occidente en el siglo IX. Esta operación se lleva a cabo en un alambique. Las materias primas que hay que destilar pueden necesitar una “preparación física” como secado, centrifugado, picado, ajuste de pH, remojo con fermentación. El objetivo es arrastrar por medio del vapor de agua los constituyentes volátiles de los productos brutos. El vapor, cargado con la esencia

de la materia prima destilada, se condensa en el serpentín del alambique antes de recuperarse en un esenciero (vaso de decantación para los aceites esenciales). La separación agua-esencia se realiza de forma automática por diferencia de densidad. El aroma debe separarse después de la solución acuosa con un disolvente orgánico como pentano, diclorometano o éter dietílico. El disolvente orgánico, se seca con la adición de un agente desecante como el sulfato de sodio o el de magnesio, se filtra y se concentra para el análisis instrumental.

#### ***2.8.1.2 Destilación molecular***

Se utiliza para aquellos compuestos químicos que se descomponen, se polimerizan, reaccionan o se destruyen por la destilación a baja presión convencional (destilación a vacío), la destilación molecular, es una destilación al alto vacío (de 1 a  $80 \times 10^{-3}$  Torr) en un rango de peso molecular de 150-4000. Se usa para compuestos del aroma, vitaminas, ácidos grasos y reactivos altamente sensibles al calentamiento prolongado a temperaturas arriba de 250 °C. Es un método mecánico con el que se crea una película uniforme de movimiento rápido, la cual es el material de alimentación para el centro de un disco giratorio. Por fuerza centrífuga el material se esparce en una película a través del disco caliente, el cual tiene una gran superficie de condensación. El compuesto más ligero se evapora y condensa en una fracción de segundo. El residuo más pesado que no se evapora cae en un disco concéntrico y se descarga. Las únicas variables son la tasa de flujo (que gobierna el espesor de la película) y la temperatura del evaporador. Se ha logrado una buena recuperación de los hidrocarburos  $C_9$  a  $C_{19}$  del aceite de maíz mediante esta técnica (Nawar, 1969) y de los aldehídos de la mantequilla (Bading y De Jong, 1983).

### 2.8.1.3 Destilación por arrastre de vapor y extracción simultáneas (DES).

Probablemente el método más usado para extracción de volátiles en la investigación es el que combina la destilación por arrastre de vapor con la extracción por disolventes simultánea, se ha utilizado en el estudio de la cerveza y frutas. En su diseño es un sistema compacto en el cual se pueden emplear pequeñas cantidades de diferentes disolventes extractores (Sánchez y col., 1991).

En el cuadro 2.11 se da un ejemplo de los porcentajes de recuperación de algunos compuestos del aroma aislados por DES en un estudio con un sistema modelo de compuestos encontrados en frutas, usando pentano y éter etílico (Schultz y col., 1977).

Cuadro 2.11. Recuperación de componentes de un sistema modelo por DES en pentano y éter

Compuesto	Pentano	Éter etílico
Acetato de etilo	59	89
Hexanoato de etilo	102	99
3-hidroxietanoato de etilo	44	49
Etanol	0	58
Hexanol	102	100
linalol	99	97

Nota: DES se llevó a cabo a 1 atm de presión. Todos los valores están dados como % de recuperación (por ciento de la cantidad original).

Adaptado de (Schultz y col., 1977)

### 2.8.2 Métodos de extracción por disolventes.

En esta extracción se utiliza un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición, se usa generalmente para obtener los volátiles de un destilado obtenido por

arrastre de vapor, aunque su desventaja es el gran volumen de disolvente que es necesario eliminar después. Consiste en tratar la mezcla arrastrada por vapor de agua en un embudo de separación, utilizando un disolvente volátil como hexano, pentano, éter etílico o etanol; el cual cargado con los compuestos del aroma, pasa a un concentrador donde es destilado (Teranishi, 1981, Benn y Peppard, 1996).

### ***2.8.3 Separación e identificación por cromatografía de gases.***

En los años 60's cuando el análisis instrumental moderno se iniciaba, la sensibilidad de los equipos era mucho menor y se conocían alrededor de 500 compuestos relacionados con el sabor en los alimentos, más adelante con el advenimiento de la tecnología computacional, fue posible utilizar instrumentos más sofisticados con los cuales se pudieron utilizar muestras muy pequeñas, además de que fue posible detectar sustancias en concentraciones muy bajas del orden de ppm, por lo que hacia los años 90 se conocían 6000 compuestos del aroma y actualmente se conocen más de 10000 compuestos del aroma (Teranishi y Kint, 1993).

La cromatografía de gases se realiza en dos etapas: la primera es la separación de los componentes de una mezcla en la columna y la segunda es cuando cada uno de los compuestos ya separados pasan al detector, para ser identificados ya sea por el tiempo de retención de cada uno de los compuestos y su comparación con el de un estándar o por el espectro que se obtenga el cual nos da información sobre la estructura química de las sustancias que pasan por él.

Esta técnica se ha usado para evaluar el aroma de los mostos de uva (Mamede, 2005), para caracterizar a los compuestos del aroma de queso (Parker, 2004), y una gran variedad de aromas y malos olores de los alimentos (Wilson, 2000).

### ***2.8.3.1 Análisis del espacio de cabeza (“headspace”).***

La mezcla de compuestos que se encuentran en el equilibrio en el espacio libre de un frasco en donde se ha colocado una cierta cantidad de la muestra en estudio, se analiza por cromatografía de gases.

#### ***2.8.3.1.1 Inyección directa***

Con el análisis de los compuestos en el espacio de cabeza o espacio libre (“headspace”) se pretende detectar a los componentes más volátiles del aroma del material, ya sean frutos, hojas, flores o fermentaciones (Charalambous, 1983).

La técnica del espacio de cabeza se usa para estudiar aromas y se puede determinar la calidad del sabor, controlar procesos y estudiar relaciones entre variedades y estaciones, madurez, adulteraciones y la calidad de los frutos. Este método es simple, solamente se toman 2 ml del espacio de cabeza con una jeringa para gases y se inyecta en el cromatógrafo de gases. Es un método rápido, reproducible y los compuestos que se analizan son solamente los que percibe la nariz.

Los principales problemas con el análisis de espacio de cabeza de inyección directa, es la poca cantidad de muestra para el análisis instrumental, ya que solamente se detectan los compuestos más volátiles presentes en la muestra; además la concentración de los volátiles en el espacio de cabeza, no nos dan una medida real de los volátiles que hay en el alimento (Charalambous, 1978).

#### ***2.8.3.1.2 Purga y Trampa.***

Es una técnica cromatográfica de análisis del espacio de cabeza para concentrar compuestos orgánicos volátiles. Se utiliza un aparato para purgar la muestra del alimento,

comúnmente es un matraz simple con la muestra al que se le burbujea un gas inerte y el gas con el aroma fluye hacia una trampa. Los métodos más comunes de aislar y concentrar los volátiles de este gas del espacio de cabeza purgado incluyen el uso de trampas criogénicas y las trampas con adsorbentes.

Las trampas criogénicas involucran el uso de una serie de trampas frías en donde se condensan los volátiles y su principal desventaja es que el agua también se condensa. Los volátiles se obtienen de las trampas criogénicas empleando disolventes orgánicos (Chang y col., 1977).

Frecuentemente los compuestos volátiles se atrapan con adsorbentes que no adsorben agua, únicamente a los volátiles del aroma. El carbón activado fue uno de los primeros adsorbentes usados para atrapar aromas de los vapores del espacio de cabeza, debido a que adsorbe con fuerza solamente a los compuestos no polares. Otros adsorbentes son el Chromosorb 105, Porapak Q y el Tenax GC, este último es el más empleado, puesto que permite una buena recuperación de los compuestos volátiles y exhibe una buena estabilidad térmica, aunque tiene una menor capacidad de adsorción como lo demuestran algunos estudios realizados con los aromas de cacahuete (Bett y col. 1994) y de trufas (Díaz y col., 2002). Los compuestos del espacio de cabeza se liberan de la trampa por medio de extracción con disolventes o en dispositivos en la columna (Charalambous, 1978).

### ***2.8.3.2 Extracción en fase sólida.***

Es un método previo a la cromatografía de gases, que se usa ampliamente en la determinación de compuestos volátiles presentes en alimentos como el aceite de oliva (Morales y col., 1994), en medicamentos, en fermentaciones y tienen la gran ventaja de concentrar la muestra, de manera que es posible con este método detectar compuestos que

están a bajas concentraciones que algunas veces contribuyen significativamente al aroma. Ciertas sustancias sólidas como alúmina, carbón activado, sílica gel, mallas moleculares y polímeros porosos como Tenax (difenilfenilenoóxido), tienen la habilidad de unirse selectivamente a compuestos volátiles de una solución. Estos métodos incluyen desorción térmica y son herramientas poderosas para la concentración eficiente de numerosos volátiles del sabor y la fragancia. El límite de detección es del orden de las ppt, mucho más bajo que para las técnicas de espacio de cabeza (ppm) y las de purga y trampa (ppb) (Murray, 1977, Dirinck y col., 1977).

#### ***2.8.3.3 Cromatografía con CO<sub>2</sub> supercrítico***

Captado en la atmósfera, el gas carbónico puesto bajo presión se convierte en líquido. Sometido a una presión superior a los 73.8 bares y a una temperatura superior a los 31°C, pasa al estado supercrítico donde posee un buen poder disolvente. La extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico permite tratar la materia prima a baja temperatura y consigue compuestos más puros con un aroma más fiel al olor inicial de la materia prima. Por otra parte, este procedimiento no genera contaminantes. Es adecuado para la separación de compuestos muy polares y poco volátiles, el disolvente puede ser removido de la muestra con mucha facilidad. Se ha empleado con éxito en el análisis de ácidos grasos en alimentos (Señorans e Ibáñez, 2002).

#### ***2.8.3.4 Pervaporación***

La recuperación de los compuestos orgánicos a partir de muestras diluídas en agua, se puede realizar efectivamente con la técnica de membrana denominada pervaporación.

En muchos casos esta técnica puede concentrar a los compuestos del aroma alrededor de 100 veces. Este proceso se define como una técnica en la cual una mezcla líquida alimentada se separa por medio de vaporización parcial a través de un polímero no poroso selectivo en su superficie de manera que algunas sustancias pueden permear.

La mezcla líquida alimentada, se divide entonces en vapor permeado, el cual se puede condensar y colectar en trampas y un líquido retenido. La fuerza necesaria para realizar la transferencia de masa del líquido alimentado al vapor permeado se establece bajando la presión en el lado permeado de la membrana de tal forma que las presiones parciales de los componentes permeantes es más baja en el permeado que en la alimentación.

De manera de enriquecer los compuestos del aroma de las disoluciones acuosas, el proceso de pervaporación opera con membranas organofílicas, las cuales preferentemente permean compuestos orgánicos como los compuestos del aroma del vino moscatel (Karlsson y col., 1995).

#### ***2.8.3.5 Espectroscopía de masas***

La espectroscopía de masas se introdujo en 1960, ha revolucionado la investigación bioquímica y de productos naturales. Lo valioso de esta técnica, es que requiere solamente microgramos de material para proporcionar un peso molecular adecuado y un patrón complejo de fragmentación de la molécula, el cual es especial para cada compuesto y es de gran ayuda para identificarlo. Esta técnica consiste en degradar cantidades traza de un compuesto orgánico y registrar su patrón de fragmentación de acuerdo a su masa.

La muestra en estado de vapor, después de haber sido separada en el cromatógrafo de gases se difunde en el sistema de baja presión del espectrofotómetro donde se ioniza

con electrones de suficiente energía para causar la fragmentación de los enlaces químicos. Los iones positivos resultantes se aceleran en un campo magnético el cual dispersa y permite la medición de la abundancia relativa de los iones de una determinada relación carga-masa. El registro resultante de la abundancia del ión contra la masa constituye el espectro de masas.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Evaluar la capacidad del hongo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* como productor de aromas frutales.

#### Objetivos específicos

1. Conocer y cuantificar los compuestos del aroma que produce *C. fimbriata* en el medio líquido estándar.
2. Determinar el efecto de la leucina (adicionada al medio de fermentación en la fase estacionaria del crecimiento) sobre la producción de compuestos volátiles del aroma por *C. fimbriata* en medio líquido.
3. Determinar el efecto de la actividad de agua en el medio líquido sobre la producción de compuestos del aroma.
4. Determinar el efecto de la leucina (adicionada desde el inicio de la fermentación) sobre la producción de los compuestos aromáticos.
5. Determinar el efecto de la tiamina en el inóculo y en el medio de fermentación sobre la producción de los compuestos del aroma producidos por *C. fimbriata*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### ***4.1 Material biológico y conservación de la cepa.***

En este estudio se utilizó la cepa de *Ceratocystis fimbriata* CBS 374-83, proveniente de Central Bureau Voor Schimmelcultures Baarn, The Netherlands.

La conservación del microorganismo se realizó en tubos inclinados de agar papa-dextrosa (PDA). Los tubos inoculados por punteo, se incubaron a 30°C durante cinco días y se almacenaron a 4°C. Una vez que el hongo filamentoso produjo esporas, los tubos de ensayo con agar inclinado, se cubrieron con aceite mineral (esterilizado 3 veces) y se almacenaron a 4°C. La operación de resiembra se realizó cada 3 meses.

### ***4.2 Preparación del inóculo.***

Para la producción del inóculo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml de medio sólido de agar papa dextrosa (PDA). La incubación fue a 30°C durante cinco días. La cosecha de esporas se realizó en condiciones estériles adicionando al matraz esporulado 70ml de agua, 30 perlas de vidrio, tres gotas de tween 80 y un agitador magnético. La mezcla se agitó durante 3 minutos, la suspensión de esporas así obtenida, se adicionó a otro matraz Erlenmeyer con esporas para repetir la operación y tener un inóculo con mayor concentración.

Para realizar la cuenta de células, se hizo una dilución 1/10 de la suspensión de esporas. Después de un minuto en el vortex, con una pipeta Pasteur se colocó la cantidad necesaria de esporas en la cámara de Neubauer. Se contaron 13 cuadros. El número de esporas en la suspensión está dado por la relación:

$$N = n * (25 * 10^4 / 13) * d / V$$

donde N= número de esporas recuperadas/ ml  
 n= número de esporas contadas en los 13 cuadros  
 d= factor de dilución  
 V= volumen de la solución de esporas

El factor de conversión  $25 \cdot 10^4 / 13$  considera las características geométricas de la cámara de Neubauer.

#### 4.3 Preparación del medio líquido estándar (MS)

Este se utilizó como medio de control en todo el trabajo experimental de esta tesis. La composición para preparar un litro de este medio recomendado por Christen y Raimbault (1991) se presenta en el cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Composición de un litro de medio líquido estándar (ME).

Glucosa	50 g
Sulfato de amonio	4.5 g
Urea	1.9 g
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g
Nitrato de calcio. 4 H <sub>2</sub> O	1.0 g
Sulfato de magnesio. 7 H <sub>2</sub> O	0.75 g

Solución de Oligoelementos (composición por litro)

Nitrato férrico	724 mg
Sulfato de zinc. 7 H <sub>2</sub> O	440 mg
Sulfato de manganeso. 7 H <sub>2</sub> O	203 mg

La glucosa se disolvió en 200 ml de agua destilada. El pH de la solución de glucosa se reguló a 6 con NaOH 0.5 M. La solución de glucosa se esterilizó sin ningún otro componente del medio después de haber ajustado el pH. Las macrosales fosfato de potasio monobásico, nitrato de calcio y sulfato de magnesio se esterilizaron juntas disueltas en agua destilada. La urea y el sulfato de amonio se disolvieron en 200 ml de agua y se esterilizaron aparte.

Los oligoelementos se esterilizaron juntos, de esa solución se tomaron 2 ml para adicionarlos en un litro de medio de cultivo.

La esterilización en todos los casos fue a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos.

#### **4.4 Estudio 1.**

##### **4.4.1 Condiciones de fermentación.**

Se realizaron ensayos por duplicado empleando 18 matraces Erlenmeyer de 250 ml en diferentes momentos. A cada matraz Erlenmeyer se le adicionaron 100ml de medio líquido estándar, se inocularon con  $1 \times 10^8$  esporas; se cubrieron con seis capas de gasa con los hilos entrecruzados con el fin de proteger de la contaminación por otros microorganismos, de permitir la entrada del aire y de facilitar el muestreo de 2 ml de volumen del espacio de cabeza del matraz. Se incubaron a 30°C y 250 rpm durante cinco días. Al inicio de la fase estacionaria (43 h) se añadieron 2.6g/l de leucina (20mM) a 7 matraces seleccionados al azar. Este es el llamado medio adicionado de leucina (MEL).

Cada día un matraz con cultivo en medio estándar (ME) y uno adicionado con leucina (MEL) fueron retirados de la incubadora.

##### **4.4.2 Análisis sensorial**

Los aromas producidos por el hongo durante la fermentación se evaluaron diariamente, con un panel no entrenado de seis miembros. La intensidad del aroma se evaluó con una escala del 0 al 4, donde 0=sin olor, 1=ligero, 2=medio, 3=intenso y 4= muy intenso. Estos análisis se efectuaron cada 24 horas, durante el tiempo que duró la fermentación.

#### ***4.4.3 Medición del pH.***

El pH del medio de cultivo se registró directamente sin dilución previa. Se utilizó un medidor de pH Corning calibrado con soluciones buffer de pH 4 y 7.

#### ***4.4.4 Determinación de la biomasa***

El caldo de fermentación se centrifugó a 5°C, durante 15 minutos con 3000 rpm (2314×g), se decantó el sobrenadante. Con una espátula, se colocó la biomasa en un papel filtro (Whatman No. 2); se llevó a peso constante a 65°C por 12 horas. Se calculó el peso seco en g de biomasa/litro.

El sobrenadante se conservó en congelación para la posterior extracción de los compuestos volátiles.

#### ***4.4.5 Determinación de glucosa***

El sobrenadante obtenido de la centrifugación del caldo de cultivo, se filtró a través de una membrana de 0.22- $\mu\text{m}$  (Millipore tipo GV), para eliminar los sólidos que pudieran taponar la tubería del cromatógrafo de líquidos Waters con detector de índice de refracción. El volumen de inyección fue de 20- $\mu\text{l}$ , la separación de la mezcla inyectada fue en una columna de 300 mm de largo y 7.8 mm de diámetro interno, Aminex (Bio-Rad HPX-87H) a 65°C con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6mM a un flujo de 0.6 ml/min (Mason y col. 1991).

#### ***4.4.6. Extracción de los compuestos volátiles***

Los sobrenadantes mencionados en la determinación de biomasa (ver 4.4.4) se descongelaron y se diluyeron en agua saturada con sal en una relación en volumen 1:1 para disminuir la solubilidad de los compuestos a extraer. El pH se ajustó a 6 para impedir la

hidrólisis de los ésteres y se hizo la extracción durante 2 horas en el equipo de destilación por arrastre de vapor - extracción simultánea con disolventes orgánicos (Sánchez y col. 1991).

Para la extracción se emplearon por separado pentano, hexano y éter como disolventes, para tener extractos con compuestos de diferentes polaridades y poder identificar un mayor número de compuestos volátiles.

El equipo de destilación por arrastre de vapor y extracción simultánea con disolventes se ilustra en la figura 4.1; el equipo cuenta con una chaqueta de enfriamiento y un refrigerante de serpentín en su interior; no aparece en la figura un refrigerante adicional que se coloca en la parte superior, arriba de la cámara C.

El equipo funciona de la siguiente manera: la muestra a extraer se coloca en el matraz A; en el matraz B se coloca el disolvente extractor (menos denso que el agua). Se calienta el matraz ubicado en la rama A y antes de que alcance el punto de ebullición se calienta el matraz de la rama B, con el propósito de que los vapores de ambos matraces lleguen al mismo tiempo a la cámara de extracción C ubicada en la parte superior del equipo. En la cámara C el disolvente realiza la extracción de los compuestos volátiles que son arrastrados por el vapor de agua.

El agua y el disolvente que extrajo los compuestos del aroma condensados, caen hasta el dispositivo inferior (también refrigerado) que está entre los dos matraces, se separan el disolvente y el agua por sus diferencias en densidad. Este dispositivo permite el retorno del disolvente con los aromas al matraz B y el retorno del agua ya sin compuestos del aroma al matraz A. De esta manera, la destilación y la extracción se realizan de manera continua y simultánea.

El tiempo de extracción fue de 2 horas contando a partir de que se juntaron los vapores en la parte superior del equipo C. Transcurrido el tiempo, el disolvente se enfrió, se secó con

sulfato de sodio anhidro, se filtró y se destiló empleando una columna Vigreux, hasta llegar a un volumen de 2 ml. Este extracto se guardó bien tapado en frascos de perfume, sellados con cinta de teflón y se almacenaron a  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, para identificar y cuantificar a los compuestos del aroma.

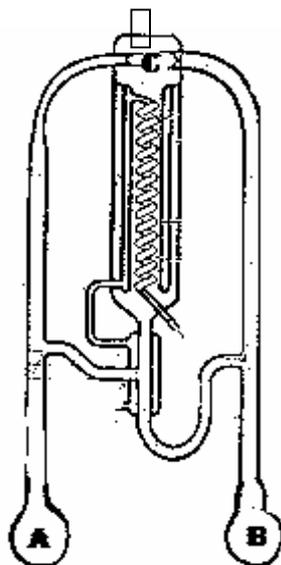


Figura 4.1 Equipo de destilación por arrastre de vapor y extracción con disolventes simultánea.

#### ***4.4.7 Identificación de los compuestos extraídos***

Se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 acoplado a un detector de masas con cuadrupolo (MSD, HP-HP5989 o HP-5972). El análisis espectrométrico de masas fue por ionización de impacto de electrones a 70 eV, el tiempo que el filamento del detector estuvo apagado fue de 1 minuto, las temperaturas del inyector y del detector fueron de  $225^{\circ}\text{C}$ . El programa de temperatura del horno fue  $40^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, una rampa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y una temperatura final de  $200^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. El volumen de inyección fue de  $1\ \mu\text{l}$ .

Se utilizaron dos columnas capilares de alta resolución de sílice fundida. En una primera etapa del trabajo se utilizó una columna de 30 m de fenilmetilsilicón con diámetro interno de 0.32 mm y un tamaño de película de 0.250- $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se empleó el cromatógrafo con una columna de FFAP de 50 m, 0.32mm de diámetro interno, 0.52- $\mu\text{m}$  de tamaño de película. En parte debido a su longitud se obtuvo una mejor resolución con la columna de FFAP (polietilenglicol) que es más polar que la de fenilmetilsilicón, por lo que la mayoría de los compuestos que se identificaron fueron separados con esta fase.

Los compuestos se identificaron comparando los espectros obtenidos con los datos espectrales de la biblioteca NIST 75K del detector de masas. Cuando fue posible se analizaron compuestos de referencia.

#### ***4.4.8 Cuantificación de volátiles del extracto obtenido del medio de cultivo***

Al sobrenadante del caldo de cultivo se le adicionaron 1.2  $\mu\text{l}$  de 2-octanol para ser utilizado como estándar interno durante el proceso de destilación-extracción y la cromatografía de gases. Diariamente los extractos de éter y pentano obtenidos del caldo de fermentación se concentraron a 1ml con nitrógeno y 1  $\mu\text{l}$  se inyectó en el cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama.

Una vez obtenidos los cromatogramas se calcularon los factores de área (factor de área = área del estándar / área del estándar interno) y de volumen (factor de volumen = volumen del estándar / volumen del estándar interno).

Se elaboró una gráfica con el factor de volumen en el eje X y el factor de área en el eje Y. El factor de respuesta es la pendiente de esta recta. Para cada una de las curvas obtenidas se

realizó la regresión lineal y se obtuvieron la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (R).

#### ***4.4.9 Análisis del espacio de cabeza (headspace).***

El análisis de los compuestos volátiles en el headspace se llevó a cabo tomando una muestra gaseosa de 2-ml del espacio de cabeza (headspace). El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5890, equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar Carbowax 20M (30m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno). La temperatura del inyector y del detector fue de 225°C. La temperatura del horno se programó con una temperatura inicial de 35°C durante 3 minutos, una rampa de temperatura de 5°C/min hasta llegar a 110°C, durante 2 minutos. El gas acarreador fue helio. La relación de división de flujo de 1:40 y el volumen de inyección de 2 ml.

Para cuantificar los componentes del espacio de cabeza se elaboraron curvas estándar inyectando de 0 a 40 microlitros de tres compuestos de interés en una ampolla de vidrio de 500ml. En cada ocasión se equilibró la temperatura de la ampolla durante 15 minutos a 30 °C el volumen de inyección fue de 2ml con una jeringa para gases. Se elaboraron las curvas estándar graficando área contra concentración en microlitros/l. Los valores de los coeficientes de regresión lineal fueron todos mayores de 0.96 (Anexo 1).

#### ***4.5 Estudio 2***

El cultivo de *C. fimbriata* se realizó en frascos serológicos de 100ml que contenían 20 ml de medio líquido tapados con 6 capas de gasa. Se consideraron tres medios de cultivo: el medio estándar solo (ME), el medio estándar con 20 mM de leucina adicionada desde el inicio de la fermentación (MELi) y el medio estándar con 5mg/l de tiamina (MET).

La actividad de agua se modificó a cinco niveles con la adición de 0, 0.5, 1, 1.5, y 2 ml de etilenglicol por cada 20 ml de ME con el propósito de obtener actividades de agua de 1, 0.992, 0.987, 0.978 y 0.962 respectivamente. Se midió la  $a_w$  al principio y al final de la fermentación con el equipo Decagon Aqua Lab modelo cx-2. (Decagon USA), se utilizó 1g de muestra.

Se usaron dos tipos de inóculo, uno preparado en PDA como en el experimento anterior (T-) y otro preparado en PDA suplementado con 5 mg/l de tiamina (T+).

Para la fermentación la concentración del inóculo ( $1 \cdot 10^8$  esporas/100ml) y las condiciones de incubación fueron las mismas que en el experimento anterior (30°C a 250 rpm durante 5 días).

La biomasa y el pH así como los volátiles en el headspace se determinaron como en el primer experimento (ver 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3).

Los efectos del inóculo, el medio, la actividad acuosa y las interacciones de primer orden sobre la biomasa, el pH y los volátiles fueron estimados por análisis de varianza y la separación de medias por la prueba de t-Student a un nivel de 0.05.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ESTUDIO 1. Cultivos en ME y en MEL.

Se cultivó a *C. fimbriata* en medio estándar (ME) y en medio estándar adicionado de leucina (MEL), para identificar y cuantificar a los compuestos del aroma que se obtienen en las dos condiciones.

#### 5.1.1 Crecimiento de *C. fimbriata* en ME y en MEL.

En la figura 5.1 se comparan la producción de biomasa, el consumo de glucosa y la evolución del pH, para las fermentaciones realizadas en el medio estándar (ME) y en el medio adicionado de leucina (MEL) a las 43 horas de iniciada la fermentación, que es el tiempo en el que inicia la fase estacionaria. La glucosa se terminó a las 60 horas de incubación en los dos medios de cultivo. Los perfiles de biomasa producida en los dos medios es muy parecido hasta llegar a las 72 horas, a partir de ese tiempo se nota un claro aumento del crecimiento en el medio adicionado de leucina. Esto indica que la leucina produjo crecimiento de *C. fimbriata* en el cultivo líquido, como se reporta para crecimiento de este hongo en el medio sólido (Christen y col. 1997). El incremento de biomasa en el medio líquido fue de 28%, después de la adición de la leucina.

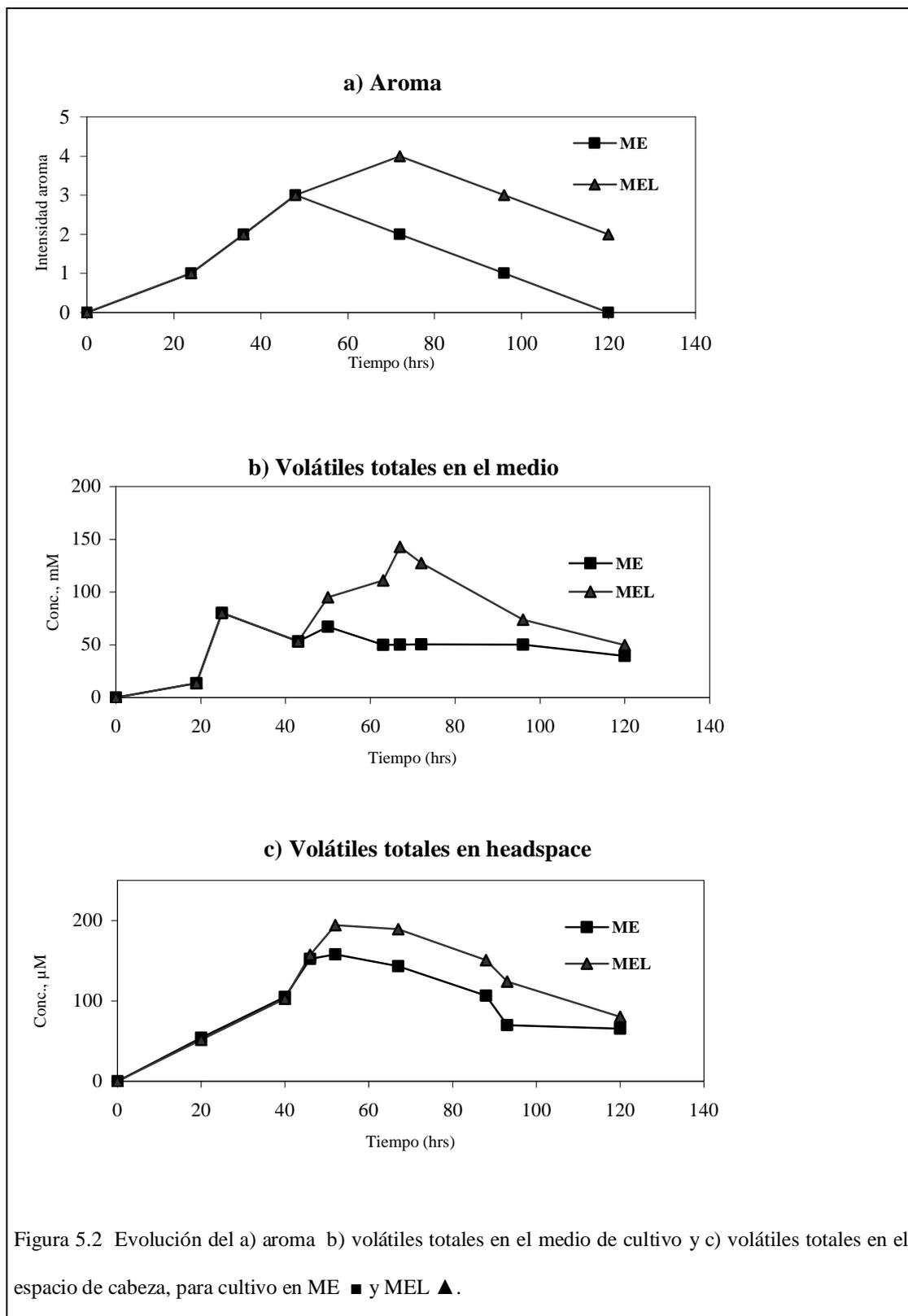
La ligera caída del pH de 6 a 4.6 en las primeras 36 horas de incubación, continuó con un aumento entre 6 y 6.5 unidades de pH después de las 40 horas de fermentación (Figura 5.1). Esta disminución del pH se debió probablemente a la producción de ácidos carboxílicos intermediarios. El incremento posterior de pH, se puede deber a la esterificación de los ácidos (Fabre y col. 1996) o a la lisis del material celular. El pH ligeramente más alto en el MEL se puede atribuir a la desaminación de los aminoácidos (tal vez leucina) que produce amoníaco en el caldo de fermentación (Mauricio y col. 1997).



### ***5.1.2 Evaluación sensorial de los aromas y de los volátiles totales en el medio líquido y en el espacio de cabeza.***

El análisis sensorial de los cultivos de *C. fimbriata* evidenció que el medio líquido ME emitió un aroma frutal muy suave a las 19 horas y 6 horas después (a las 25 horas) se percibió un aroma a plátano. Entre las 48 y las 72 horas, se percibió la máxima intensidad del aroma a plátano. Transcurridas 86 horas, en el MEL la percepción del aroma cambió por un olor a disolvente y en el ME todo el aroma desapareció completamente (Figura 5.2a). La figura 5.2b muestra la evolución con el tiempo de los volátiles totales en el caldo de cultivo y en la figura 5.2c se observan los volátiles totales en el espacio de cabeza.

Se puede observar analizando las figuras 5.1a, 5.1b y 5.2a, que el período de máxima percepción del aroma fue algunas horas después del tiempo de máximo crecimiento cuando el pH era alrededor de 6.5, este pH más alto, puede atribuirse a la esterificación de los ácidos carboxílicos, principalmente del ácido acético. La formación de los ésteres (compuestos con un valor de umbral de percepción del aroma bajo) nos explica la mayor intensidad del aroma a plátano. La evolución de los volátiles totales del medio líquido y del espacio de cabeza correlacionan con la percepción del aroma, es decir a mayor concentración de los compuestos del aroma en el espacio de cabeza y en el caldo de cultivo, mayor es la intensidad del aroma.



### 5.1.3 Identificación de los compuestos volátiles extraídos.

El cuadro 5.1 enlista por grupos funcionales a los volátiles identificados en el caldo de cultivo e indica los métodos y las fuentes de identificación que se usaron con cada uno de ellos y en las últimas dos columnas se anota en que medio se encontraron cada uno de los compuestos.

*C. fimbriata* produjo ésteres de bajo peso molecular, alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, fenoles y ácidos carboxílicos (Cuadro 5.1). Es ésta la primera ocasión en que se reporta que *C. fimbriata* produce hidrocarburos. Algunos autores consideran a todos los compuestos oxigenados encontrados, con la excepción de los ésteres, como metabolitos primarios porque son los productos de un metabolismo celular normal, están distribuidos con abundancia en la naturaleza, son importantes para el crecimiento celular y tienen estructuras químicas simples (Campbell, 1984; Glick, 1994).

#### 5.1.3.1 Alcoholes

Los alcoholes y los ésteres fueron los volátiles más importantes en la percepción del aroma producidos en los dos caldos de cultivo de *C. fimbriata* (Cuadro 5.1). Se identificaron un total de ocho alcoholes, el feniletanol se reporta por primera vez en este hongo y tiene un aroma a rosa. El acetaldehído, fue el aldehído mas abundante encontrado en los cultivos de *C. fimbriata*, juega un papel central en la producción metabólica de etanol, el cual es el alcohol más abundante que produce este hongo. El etanol y el 2-propanol (isopropanol) provienen de la fermentación de la glucosa (Figura 2.4).

Los alcoholes superiores o alcoholes de fusel propanol, 2-metilpropanol, (S)-(-)-2-metilbutanol, 3-metilbutanol y 2-fenilbutanol se originan de los aminoácidos correspondientes, a través de la ruta formulada primero por Ehrlich en 1907, como el alcohol

Cuadro 5.1. Compuestos volátiles producidos por la fermentación con *C. fimbriata*.

Compuesto	Identificación	ME	MEL
<b>Hidrocarburos, parafinas y aromáticos</b>			
Hexano	1,2	a	a
Decano	1		a
Octadecano	1		a
5-octadeceno	1	a	a
Eicosano	1		a
Docosano	1		a
Tolueno	1,2	a	a
Etilbenceno	1,2	a	a
Xileno	1,2	a	a
2-fenilbutano	1,2	a	
1,3-dietilbenceno	1,2	a	
Naftaleno	1,2	a	
<b>Alcoholes</b>			
Etanol	1,2,	a	a
Propanol	1,2		a
2-metilpropanol	1,2	a	a
1-butanol	1,2		a
2,3-butanodiol	1,2		a
3-metilbutanol	1,2	a	a
1-pentanol	1,2		a
2-feniletanol	1,2	a	a
<b>Aldehídos</b>			
Acetaldehído	1,2	a	a
Pentanal	1		a
<b>Cetonas</b>			
2-propanona	1,2		a
3-hidroxi-2-butanona	1,2	a	a
2-hexanona	1		a
2-hidroxi-3-pentanona	1		a
2,3-butanodiona	1		a
<b>Esteres</b>			
acetato de etilo	1,2	a	a
propionato de etilo	1,2	a	a
acetato de n-propilo	1,2		a
acetato de 2-metilpropilo	1,2	a	a
acetato de n-butilo	1,2	a	a
butirato de etilo	1,2	a	a
acetato de 3-metil-1-butilo	1,2	a	a
butirato de butilo	1,2		a
acetato de 2-feniletilo	1		a
<b>Fenoles</b>			
2,6-di-tert-butil-fenol	1,2	a	a
<b>Ácidos carboxílicos</b>			
ácido fórmico	1,2	a	a
ácido acético	1,2	a	a
ácido hexanoico	1,2		a
ácido tetradecanoico	1	a	
ácido pentadecanoico	1	a	
5Z,9Z-octadecadienoico	1	a	

1. Identificación por tiempo de retención en cg y búsqueda en la biblioteca de masas.

2. Identificación con 1 y con análisis de masas del compuesto específico.

isoamílico (3-metilbutanol) que proviene de la leucina (Figura 2.6) y el feniletanol que proviene de la fenilalanina (Maga 1976; Mauricio y col. 1997). Cuando no hay aminoácidos presentes en el medio de cultivo, los alcoholes superiores se pueden obtener por la síntesis *de novo* a partir de la glucosa con sales de amonio. La aerobiosis promueve la síntesis de los alcoholes de fusel (Derrick y Large, 1993) y estos alcoholes son los componentes volátiles más abundantes en las bebidas alcohólicas después del etanol (Ben y Peppard, 1996).

El 2,3-butanodiol identificado solamente en el medio adicionado de leucina (Cuadro 5.1), tiene dos funciones importantes en los microorganismos: primero la regulación del pH intracelular a través de la prevención de la sobreproducción de acetato. Así, el piruvato produce 2,3-butanodiol, cuando alcanza una concentración crítica. Segundo, durante el catabolismo de la glucosa la acetoína reducida a 2,3-butanodiol regenera  $\text{NAD}^+$  a partir del  $\text{NADH}_2$ . Así el butanodiol es una reserva de equivalentes reductivos, y la relación acetoína/butanodiol puede considerarse como el grado de aerobiosis del cultivo (Magee y Kosaric 1987).

#### 5.1.3.2 Ésteres

Los ésteres son metabolitos secundarios de hongos, derivados de la conversión de alcoholes a ácidos carboxílicos que después se esterifican por las enzimas esterasas (Janssens y col.1987). Se identificaron, un éster aromático (acetato de feniletilo) con aroma floral y ocho ésteres alifáticos con aromas frutales, cinco de los cuales fueron acetatos de (etilo, propilo, 2-metilpropilo, n-butilo y 3-metil-1-butilo) (Cuadro 1). El acetato de etilo y el acetato de propilo, en ese orden, fueron los ésteres más abundantes en el caldo de cultivo. Como los ésteres tienen umbrales de detección del aroma más bajos que los alcoholes, sus aromas

frutales se detectan olfativamente a más bajas concentraciones (Janssens y col. 1987; Derrick y Large, 1993). En este trabajo se encontró que la producción de acetato de isoamilo, que es un éster que resulta del metabolismo de los aminoácidos está en relación directa con el crecimiento del micelio tal y como se encontró para *Aspergillus oryzae* (Ito y col. 1990). Esta observación no resultó válida para el acetato de fenetilo producido por *C. fimbriata* en donde la producción fue constante. Todos los ésteres alifáticos encontrados en el caldo de cultivo de *C. fimbriata* también se identificaron entre los compuestos del aroma del mango (Engel y Tressl, 1983) (Cuadro 2.1). Con anterioridad a este trabajo se reportó que el acetato de feniletilo, es producido también por *Ceratocystis coerulea* (Sprecher y Hanssen, 1983) (Cuadro 2.10).

#### 5.1.3.3 Aldehídos y cetonas

Se identificaron cinco cetonas alifáticas C<sub>3</sub> a C<sub>8</sub> incluyendo 3-hidroxi-2-butanona (acetoína). Esta cetona se ha encontrado en los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mycoderma* que crecen en el bagazo de caña. La acetoína, se metaboliza cuando las fuentes de carbono accesibles con facilidad (azúcares) se agotan. La acetoína (3-hidroxi-2-butanona) puede oxidarse rápidamente a 2,3-butanodiona (diacetilo), un compuesto con un valor de umbral de detección del aroma alto, importante en los aromas de algunos alimentos, en particular de los lácteos (Owens y col. 1997).

Solamente se observaron dos aldehídos: acetaldehído y pentanal. Con la excepción del pentanal, no observamos los aldehídos alifáticos correspondientes a los alcoholes superiores tales como el 3-metil-1-butanol. Esto se debe probablemente a la oxidación rápida por varios sistemas enzimáticos de los hongos como se reporta para hongos de la podredumbre blanca.

Un estudio detallado del basidiomiceto, *P. sapidus*, mostró que este microorganismo degrada el 4-metoxibenzaldehído que el mismo produce. Este es un ejemplo de cómo la casi simultánea generación y degradación en un intervalo de pocos días de un compuesto volátil por un hongo, con el cambio resultante del perfil del aroma, puede dificultar la estimación de la producción máxima de un volátil dado (Bernd y Berger, 1994).

#### 5.1.3.4 Hidrocarburos y compuestos aromáticos.

El análisis con el sistema gases-masas de los extractos de pentano, de los medios, ME y MEL de *C. fimbriata* (con aroma de plátano) mostraron un perfil formado principalmente de compuestos no oxigenados. Entre ellos se presentaron 12 hidrocarburos, 6 alifáticos y 6 aromáticos que se muestran en la cuadro 5.1. El origen bioquímico de los alcanos no se ha entendido bien, pero en estudios hechos con corchos infectados por hongos fue posible hacer una correlación entre los corchos infectados con hongos y la actividad microbiana con base a la producción de alcanos. El docosano, se ha encontrado en el chayote y se describe su aroma como a humedad, mohoso (Mc Leod, 1990), en estos estudios no se explica la formación de los alcanos; sin embargo se sabe que los alcanos se oxidan para dar ácidos alcanóicos que se metabolizan por  $\beta$ -oxidación (Webley y col., 1956).

Se encontraron tolueno y naftaleno, el primero también se ha detectado en mango (Engel y Tressl, 1983), cacahuates (Bett y col., 1994) y en chayote (McLeod, 1990). Aunque la presencia de naftaleno en el caldo de cultivo de *C. fimbriata* puede parecer extraña, se le ha encontrado en los volátiles del alfalfa (Buttery y Kamm, 1980), y se reporta como un compuesto con aroma fragante y alcanforáceo en el chayote (McLeod, 1990). Algunos derivados del naftaleno se han observado en el aroma de okra (Ames y McLeod, 1990).

El etilbenceno fue el compuesto más abundante de esta fracción, el tolueno y el alcohol fenílico fueron de los compuestos aromáticos encontrados con mayor frecuencia. Los compuestos aromáticos como fenol y tolueno se producen en plantas y hongos (*Neurospora crassa*) por la vía del ácido shikímico; el feniletanol es un ejemplo de esta ruta metabólica, es un metabolito de la fenilalanina producido por *C. fimbriata* (Turner y Aldridge, 1983), común en los hongos (Webb y Muller 1972); está presente en los volátiles de la alfalfa (Buttery Kamm, 1980), también lo producen los hongos basidiomicetos en sus habitats naturales. Como la supervivencia de los hongos que destruyen la madera depende de su habilidad de atacar enzimáticamente a las ligninas, en medios sintéticos su situación ecológica frecuentemente refleja una preferencia por los compuestos aromáticos en ambas rutas, la catabólica y la anabólica (Bernd y Berger 1994), razón por la cual se espera encontrar estos compuestos aromáticos en el caldo de cultivo de un hongo filamentoso patógeno de plantas tal como *C. fimbriata*.

El naftaleno y sus derivados se biosintetizan por la ruta de ciclización de los policétidos. La biosíntesis de policétidos, que es de menor importancia para la plantas, está particularmente bien desarrollada en bacterias, hongos y líquenes (Manitto, 1981). Los hongos producen la mayor parte de sus metabolitos secundarios a partir de acetato a través de intermediarios policétidos y terpenos. La melanina, que es el pigmento negro de los hongos, también se produce a través de esta ruta y en estudios sobre su producción, usando varios hongos albinos mutantes se han aislado derivados del naftaleno (Turner y Aldridge, 1983). También se encontró naftaleno, en los caldos de cultivo ME y MEL, y proviene de la ciclización de los pentakétidos.

La cepa de *C. fimbriata* que se usó en esta investigación no produce terpenos en el medio de cultivo líquido. Esto puede relacionarse tal vez con el medio de cultivo que se utilizó o puede ser que nuestra cepa sea "carente de terpenos" (Sprecher y Hanssen, 1983).

En casi todas las muestras, encontramos di-tert-butilfenol, el cual es un antioxidante de uso común y por esta razón se sospecha que es un contaminante de los tapones de los viales de vidrio.

Los metabolitos volátiles que se encontraron en este trabajo como respuesta al aroma, son de bajo peso molecular, pertenecen a los grupos funcionales: aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, ésteres y ácidos todos ellos pertenecen al grupo de metabolitos inclasificables, según Turner, es decir que no los ubica como primarios ni como secundarios (Turner y Aldridge, 1983). Aunque para otros autores (Campbell, 1984; Glick, 1994), estos compuestos son metabolitos primarios ya que según ellos, los metabolitos primarios son productos del metabolismo celular normal, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son importantes para el crecimiento celular, están presentes a lo largo de todo el ciclo de vida y son productos de constitución química simple.

#### ***5.1.4 Cuantificación de los volátiles extraídos.***

El cuadro 5.2 muestra las concentraciones de los compuestos líquidos más abundantes identificados en los caldos de cultivo a las 67 horas de fermentación (tiempo de máxima producción) en ambos medios. La lista contiene los volátiles más abundantes producidos por el hongo: ocho de los nueve ésteres mostrados en el cuadro 5.1, seis de los siete alcoholes, 3-hidroxi-2-butanona, acetaldehído y 2,3-butanodiona.

Cuadro 5.2 Efecto de incremento por adición de leucina en la concentración de las especies químicas en el caldo de cultivo a las 67 h (tiempo de producción máxima de volátiles).

Compuesto	Concentración en el medio de cultivo líquido ( $\mu\text{M}$ )			
	ME	Por ciento	MEL	Por ciento
Etanol	45936	91.7%	136343.6	95.3
Propanol	738	1.473%	3111.3	2.17
1-butanol	95	0.19%	248	0.173%
2-metilpropanol	22	0.44%	66.2	0.046%
3-metilbutanol	35	0.07%	118.4	0.083%
2-feniletanol	2	0.005%	14.5	0.010%
Suma de alcoholes excluyendo al etanol	892.48	1.78%	3558.5	2.487%
Acetato de etilo	2944	5.873%	2418	1.690%
Acetato de propilo	65	0.13%	66.2	0.046%
Acetato de 2-feniletilo	47.83	0.095%	49.5	0.035%
Propionato de etilo	32.59	0.065%	102.3	0.071%
Acetato de butilo	3.14	0.006%	8.21	0.006%
Acetato de 3-metilbutilo	0.67	0.001%	41.2	0.030%
Butirato de etilo	2.44	0.005%	2.16	0.002%
Acetato de 2-metilpropilo	1.09	0.002%	41.2	0.032%
Suma de ésteres	3096.3	6.18%	2728.77	1.88%
Acetaldehído	12	0.024%	291	0.203%
3-hidroxi-2-butanona	134	0.267%	117.43	0.082%
SUMA	50117.6		143074.1	

La mayor parte de la producción de volátiles (99%) es etanol, acetato de etilo, y propanol en los caldos de cultivo de ME y de MEL. Con el MEL se observa un incremento en casi todos los compuestos; en MEL, el etanol y el propanol se produjeron respectivamente 3 o 4 veces más que en el ME.

Cuando se excluye al etanol, las sumas de las concentraciones de los alcoholes restantes son cuatro veces más grandes en MEL que en ME y la concentración de los ésteres es muy similar en ambos medios.

Los resultados obtenidos de las muestras líquidas del caldo de cultivo, muestran poca producción de acetato de etilo, butirato de etilo y acetato de 2-metilpropilo con el medio adicionado de leucina. Sin embargo el acetato de 3-metilbutilo aumentó 61 veces su concentración en MEL, probablemente debido a la leucina, dado que es el aminoácido precursor del 3-metilbutanol a través de la ruta de Ehrlich (Derrick y Large, 1993; Meza y col, 1998).

#### ***5.1.5 Cuantificación de los volátiles del espacio de cabeza.***

La concentración de un compuesto en el espacio de cabeza está gobernada por la rapidez de transferencia de masa del líquido a la fase gaseosa, la cual es una función de su concentración en el medio líquido y de su solubilidad en el agua. Como los compuestos más abundantes fueron alcoholes y ésteres, que son solubles en agua, en el espacio de cabeza se detectaron menos compuestos y sus concentraciones fueron más bajas que en el medio líquido.

Sin embargo, el análisis del espacio de cabeza nos permitió correlacionar a los compuestos con los aromas identificados olfativamente conforme avanzaba la fermentación. El análisis del espacio de cabeza produce resultados más limpios y más cuantitativos, porque no hay disolvente que eluya al mismo tiempo que los primeros picos del cromatograma o

añada picos contaminantes. Además, la inyección directa al cromatógrafo de gases de las muestras del espacio de cabeza es más fácil, rápida, y no contiene errores como los asociados con la recuperación cuantitativa de los analitos que se debe hacer cuando se emplea el procedimiento de varios pasos que es la destilación por arrastre de vapor-extracción simultáneas.

El cuadro 5.3 muestra los nueve compuestos detectados por análisis de espacio de cabeza con sus aromas correspondientes. Esta tabla es similar al cuadro 5.2, porque los valores de concentración de los volátiles son al tiempo de máxima producción para la mayoría de ellos, puesto que las concentraciones máximas que se observaron para la mayor parte de los compuestos fueron entre las 55 y las 80 horas de fermentación. Tres de los seis alcoholes y cinco de los ocho ésteres cuantificados en el medio líquido se observaron también en las muestras del espacio de cabeza.

El acetato de etilo fue casi tan abundante como el etanol en el espacio de cabeza, por que el acetato es aproximadamente 6 veces menos soluble en agua que el etanol, por lo que se volatizó al espacio de cabeza más rápidamente. El etanol y el acetato de etilo representan en conjunto el 89% de los volátiles del espacio de cabeza en el caldo de cultivo del medio adicionado de leucina (MEL) y el 92% en el caldo de cultivo del medio estándar (ME). Otros ésteres importantes fueron propionato de etilo (aroma frutal) y tres productores del aroma de plátano: acetato de 3-metilbutilo, acetato de 2-metilpropilo y acetato de butilo. Además del etanol, solo dos alcoholes (3-metilbutanol y 2-metilpropanol) de los seis detectados en el caldo de cultivo se observaron en el espacio de cabeza.

En el espacio de cabeza se detectaron tres alcoholes a diferencia de los ésteres que fueron cinco, probablemente debido a que los alcoholes son más solubles en agua que los

ésteres y la mayor solubilidad provoca una menor tendencia de las moléculas a escapar del medio acuoso al espacio de cabeza .

La relación MEL/ME para los volátiles extraídos del caldo de cultivo (cuadro 5.2) es 2.85 y para los volátiles del espacio de cabeza (cuadro 5.3) es 1.32, la comparación de estos valores sugiere un incremento de volátiles en el caldo de cultivo y en el espacio de cabeza cuando se utiliza el medio estándar con leucina (MEL).

Cuadro 5.3. Comparación de los volátiles de *C. fimbriata* detectados en el espacio de cabeza de los caldos de cultivo ME y MEL al tiempo de máxima producción (67 h).

Compuesto	Concentración en el espacio de cabeza ( $\mu\text{M}$ )		Aroma (de Arctander, 1982 y Fenaroli, 1975)
	ME	MEL	
Etanol	70.7	90	alcohólico
Acetato de etilo	61.3	78	Frutal
Acetaldehído	3.4	9	reminiscente de café y vino
3-metilbutanol	detectado	4	plátano
Propionato de etilo	1.7	4	frutal
Acetato de butilo	2.2	3	frutal—muchas frutas
Acetato de 2-metilpropilo	1.3	2	fermentado, plátano, frutal diluído
Acetato de 3-metilbutilo	1.2	2	fruta fresca, pera, piña, plátano
2-metilpropanol	no detectado	90	plátano
SUMA	143.3	189.1	

detectado = detectado pero no cuantificado.

ME: medio sintético

MEL: medio sintético + leucina

Con base a los resultados presentados en el cuadro 5.3 se puede observar que la leucina tiene el efecto de aumentar la producción del 2-metilpropanol y otros compuestos como 3-metilbutanol, acetaldehído, propionato de etilo, etanol, acetato de 3-metilbutilo,

acetato de butilo, el acetato de 2-metilpropilo y el acetato de etilo, todo esto concuerda con el incremento del aroma de plátano.

### **5.1.6 Conclusiones**

*Ceratocystis fimbriata* produce un patrón complejo de compuestos volátiles, de los cuales el etanol es el compuesto dominante (92%), el siguiente compuesto más abundante es el acetato de etilo.

Se identificaron en el medio de cultivo ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, alcanos, compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos de bajo peso molecular.

La adición de leucina al medio de fermentación de *C. fimbriata*, permitió aumentar la producción de los volátiles del aroma.

Algunos alcoholes y ésteres, especialmente el 3-metilbutanol, el 2-metilpropanol y los acetatos de 3-metilbutilo y 2-metilpropilo, contribuyen al aroma de plátano.

La intensidad del aroma correlaciona bien con las concentraciones de los volátiles totales en el espacio de cabeza y en el caldo de cultivo.

En el espacio de cabeza el acetato de etilo fue casi tan abundante como el etanol.

El etanol y el acetato de etilo representan el 92% de los volátiles del espacio de cabeza en el caldo de cultivo del medio estándar (ME) y el 89% de los volátiles del espacio de cabeza del caldo de cultivo del medio adicionado de leucina (MEL).

El acetaldehído fue también un compuesto volátil importante en el caldo de cultivo del medio adicionado de leucina (MEL). El análisis del espacio de cabeza mostró claramente que la leucina fue responsable del incremento significativo de etanol, acetaldehído y acetato de etilo.

La leucina favorece los pequeños incrementos en la producción de 3-metilbutanol, propionato de etilo, acetato de 2-metilpropilo y propanol.

También se observaron otros ésteres con aromas frutales como los acetatos de propilo, butilo y feniletilo.

La suplementación con vitaminas, podría ser importante para aumentar la producción de volátiles.

Con las bajas concentraciones de volátiles en el espacio de cabeza, el estudio también reveló la dificultad de acumular grandes cantidades de compuestos del aroma, por su volatilidad y por su solubilidad en el agua.

**5.2 Estudio 2. Efectos de la actividad de agua, leucina y tiamina sobre la producción de biomasa y compuestos del aroma por *Ceratocystis fimbriata*.**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la adición de tiamina en la preparación del inóculo, de la adición de leucina y tiamina al medio líquido de fermentación y de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el medio de fermentación sobre la producción de biomasa y compuestos del aroma se realizaron experimentos factoriales.

**5.2.1 Efecto de la  $a_w$  en el tamaño celular de *C. fimbriata*.**

La disminución de la actividad acuosa ( $a_w$ ) en el medio estándar (ME) produjo una disminución en el tamaño del micelio y de las esporas (Cuadros 5.4 y 5.5; Figura 5.3). Esta disminución de tamaño puede explicarse por una salida de agua y solutos a través de la membrana celular. El flujo hacia afuera muestra una relación directa con el gradiente de presión osmótica entre la célula y el medio externo (Marechal y Gervais, 1994).

Cuadro 5.4 Tamaño de las esporas con diferentes  $a_w$ .

$a_w$	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )
1	13.33 $\pm$ 1.15	8.5 $\pm$ 0.5
.987	9.16 $\pm$ 0.76	6.0 $\pm$ 0.05
.978	7.83 $\pm$ 0.30	5.6 $\pm$ 0.57
.968	6.33 $\pm$ 0.57	5.03 $\pm$ 0.60

Cuadro 5.5 Diámetro del micelio en diferentes valores de  $a_w$ .

$a_w$	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )
1.0	7.28 $\pm$ 1.11
.987	4.83 $\pm$ 0.75
.978	3.83 $\pm$ 0.75
.968	2.0 $\pm$ 0.70

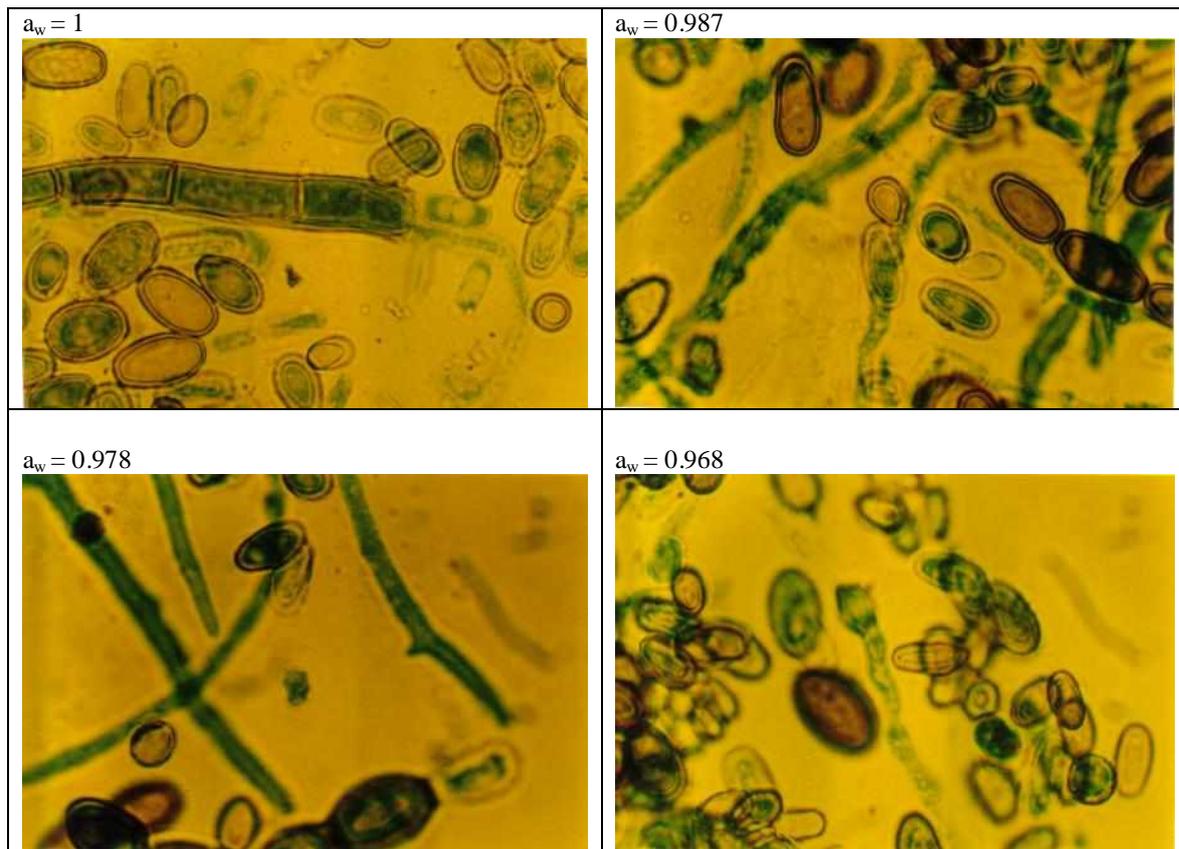


Figura 5.3 Micelios y esporas de *C. fimbriata* en ME con diferentes valores de  $a_w$ . Fotografías con microscopio óptico a 100X, tinción con azul de algodón.

### 5.2.2 Resultados en biomasa y en producción de volátiles

Se identificaron catorce compuestos volátiles en el espacio de cabeza. El etanol constituyó más de la mitad de la producción de volátiles totales. Además del etanol, la producción de volátiles en el espacio de cabeza estuvo formada en orden de importancia por acetato de etilo (22.6%), butirato de etilo (10.8%), isobutanol (7.6%), alcohol amílico (1.6%), acetato de isoamilo (1.5%), acetaldehído (1.2%), propionato de etilo (0.9%), acetato de isobutilo (0.4%), diacetilo (0.6%), alcohol isoamílico (0.3%) y butanol (0.3%).

Se detectaron acetona e isopropanol en niveles bajos con variabilidad alta. Debido a que estos compuestos no fueron afectados por los efectos principales que fueron: tipo de

medio (ME, MEL y MET), nivel de actividad de agua (1, 0.992, 0.986, 0.978 y 0.968), tiempo (1 a 5 días) y tipo de inóculo (T+ y T-) ni por las interacciones resultantes del análisis estadístico ( $P > 0.05$ ), no volverán a ser mencionados.

Aunque el isobutanol y el butanol no fueron afectados por los efectos principales e interacciones en el análisis estadístico, mostraron coeficientes parciales de correlación negativos con la biomasa (-0.24 y -0.25 respectivamente;  $P < 0.05$ ).

La producción de biomasa mostró correlaciones positivas (de 0.23 a 0.40;  $P < 0.05$ ) con etanol, acetato de etilo, butirato de etilo, propionato de etilo y acetato de isobutilo.

En general la producción de compuestos volátiles mostró una tendencia a ser mayor cuando el inóculo se preparó con tiamina (T+) que cuando se utilizó el inóculo sin tiamina (T-). También la producción fue mayor en caldo del medio estándar adicionado con tiamina (MET), en comparación con el del medio estándar solo (ME) y con el del medio estándar con leucina (MEL).

La reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ) por debajo de 0.992 provocó menor producción de volátiles. Sin embargo en varios casos se observaron interacciones de primer orden ( $P < 0.05$ ) que son descritas a continuación.

En el cuadro 5.6 se muestra el efecto de las interacciones inóculo  $\times$  medio, actividad de agua  $\times$  medio y tiempo  $\times$  medio sobre el pH, la biomasa, los volátiles totales y el etanol.

Cuando se usó el inóculo T+ o el medio MET los valores de pH, volátiles totales y etanol fueron más altos que con el inóculo T- en los caldos de cultivo ME y MEL.



La producción de biomasa fue mayor en T- y en medio MET que en las otras combinaciones inóculo  $\times$  medio (5.63 g/L vs 3.34-3.68 g/L). Esto indica un comportamiento de fenotipo ahorrador (thrifty) con crecimiento exuberante y baja producción de volátiles, ya que la relación concentración de volátiles totales /biomasa es menor en T- (22.4, 21.3 y 20.4  $\mu$ M de volátiles por g de biomasa en ME, MEL y MET respectivamente) que en T+ (27.9, 30.8 y 28.3  $\mu$ M de volátiles por g de biomasa en ME, MEL y MET respectivamente).

Cuando  $a_w=1$  se observó el pH más bajo en ME y el más alto en MET. La reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ) resultó en la ausencia de diferencias entre los valores de pH.

De la misma manera, cuando  $a_w=1$  la biomasa, los volátiles totales y el etanol producidos fueron más altos en MET y más bajos en MEL y las diferencias entre las medias de estas variables desaparecieron con la reducción en la  $a_w$ .

Una reducción significativa de pH en el medio estándar ME conforme el tiempo de fermentación avanza contrasta con la ligera y no significativa disminución de pH ( $P>0.05$ ) observada en MEL y MET.

Como se esperaba la producción de biomasa, volátiles totales y etanol se incrementaron con el tiempo, pero la producción final en MET fue cuando menos el doble que en ME y MEL.

La interacción actividad de agua  $\times$  tiempo sobre la biomasa, los volátiles totales y el etanol se muestran en la figura 5.4. Cuando la actividad de agua no está restringida la producción de biomasa, volátiles totales y etanol alcanzaron su máximo entre las 72 y las 96 horas de fermentación. La reducción en  $a_w$  resultó en un retraso de la producción de estas variables.



La producción de volátiles totales aumentó con el tiempo y fue más alta en T+ que en T-, pero la disminución de  $a_w$  fue paralela a la reducción de volátiles totales en T+ y en T- (figura 5.5).

La producción de acetaldehído y butirato de etilo tendió a ser mas alta en T+ que en T- en los medios ME y MEL pero el valor más alto se observó en T- y MET. Cuando el inóculo fue T- se observó una tendencia similar en la producción de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo, pero cuando el inóculo fue T+ y el medio MEL, la producción fue similar a la señalada para MET y T- (figura 5.6).

La producción de butirato de etilo aumentó con el tiempo pero este incremento fue más alto con el inóculo T+ que en T-. La producción de acetato de isoamilo alcanzó su máximo a las 72 horas de cultivo cuando el inóculo era T- mientras que en T+ la producción se retrasó y los valores máximos se observaron a las 120 horas. La producción de alcohol amílico disminuyó con el tiempo cuando se usó el inóculo T- mientras que en T+ se observa lo contrario (Figura 5.7).

Con  $a_w = 1$ , la producción de acetaldehído, acetato de etilo, propionato de etilo y acetato de isobutilo fue más del doble en T+ que en T-, la disminución en los valores de  $a_w$  produjo la disminución de la producción de estos compuestos (figura 5.8).

La producción de butirato de etilo y acetaldehído aumentó con el tiempo de cultivo en el medio MET (figura 5.9).

La reducción de la actividad de agua indujo un retraso de la producción de acetato de etilo, butirato de etilo, propionato de etilo y acetato de isobutilo (figura 5.10).













La producción de butirato de etilo y de acetato de isobutilo fue mayor en MET que en MEL y ME y la reducción de  $a_w$  produjo una disminución drástica en la producción de ambos (figura 5.11).

### 5.2.3 *Discusión de resultados*

Este estudio mostró la influencia de la adición de tiamina al preparar el inóculo, el efecto de la adición de leucina y tiamina al medio y como sus interacciones con la actividad del agua afectan el crecimiento y la producción de aromas por *C. fimbriata*.

La producción de etanol, acetato de etilo, butirato de etilo, propionato de etilo, acetato de isobutilo y acetaldehído por *C. fimbriata* fue mayor cuando el inóculo se preparó con tiamina.

El papel de la tiamina en el crecimiento y en la reproducción de muchos hongos incluyendo a *C. fimbriata* está bien establecido (Robins y Ma 1942; Barnett y Lilly, 1947; Campbell, 1958). Aunque *C. fimbriata* puede presentar reproducción asexual (comportamiento homotálico) este hongo ha desarrollado un mecanismo para asegurar el entrecruzamiento (heterotalismo sexual), prevenir mutaciones y mantener los beneficios de la variabilidad genética (Webster y Butler, 1962b).

*C. fimbriata* se comporta de una manera ahorradora (thrifty) ya que creció de manera exuberante en el medio MET cuando el inóculo era pobre (sin tiamina) pero con una tasa de volátiles totales/biomasa baja en relación con la observada cuando el inóculo contenía tiamina, independientemente del medio de cultivo usado. Esto puede ser una respuesta a la limitación de nutrientes que aumenta la sobrevivencia del microorganismo privado de tiamina (T-), porque cuando encuentra mejores condiciones incrementa la biomasa, aunque es menos eficiente en producción de volátiles que los microorganismos



no privados (T+). Esto podría considerarse paralelo a la hipótesis del fenotipo ahorrador (thrifty phenotype; Bindon y Baker, 1997) que se explica como consecuencia de regulación metabólica y genética (Moat y Foster, 1995) y probablemente por impronta metabólica (Waterland y Garza, 1999).

La adición de leucina al ME al inicio de la fermentación no aumentó la producción de biomasa, sin embargo se observó un ligero incremento en la producción de alcohol isoamílico y acetato de isoamilo. Este resultado se esperaba debido a que la leucina es un sustrato para la producción de alcohol isoamílico y acetato de isoamilo, los cuales se producen a través de un mecanismo de biotransformación conocido como la ruta de Ehrlich.

Cuando se adicionó leucina a una fermentación con levaduras, también se incrementó la producción de alcohol isoamílico y acetato de isoamilo, pero con un aumento en la biomasa (Derrick y Large, 1992; Dickinson y col., 1998). Lo mismo ocurrió para *C. fimbriata* en medio sólido de fermentación adicionado con leucina empleando una corriente forzada de aire húmedo (Christen y col., 1997; Meza y col. 1998), y en medio líquido cuando la leucina fue añadida al inicio de la fase estacionaria (Sánchez y col., 2002).

Probablemente cuando se añade la leucina a los medios líquidos y sólidos, existen diferencias de disponibilidad de nutrientes. La explicación de porqué la leucina no aumenta la biomasa en el medio líquido, cuando se añade desde el inicio de la fermentación, puede ser por el mecanismo de inhibición por retroalimentación o por producto final.

La adición de tiamina al inóculo y al medio de cultivo no compensó los efectos adversos de la  $a_w$  inducidos por la adición de etilenglicol al medio de cultivo líquido. Existen reportes de que la  $a_w$  de los medios de cultivo afecta drásticamente la fisiología de

los microorganismos (Czonka, 1989; Gervais y col., 1996), por lo que se esperaba una reducción en la producción de biomasa.

Sin embargo en nuestro estudio la producción de aroma fue mas baja cuando los cultivos estuvieron bajo condiciones de estrés acuoso. En contraste con estos resultados, bajo condiciones de estrés acuoso *Trichoderma viride* produce un aumento en la producción de aroma (Gervais y Molin, 1988).

La baja producción de aromas puede explicarse por la correlación positiva observada entre la producción de los compuestos más abundantes (etanol, acetato de etilo y acetaldehído) y la biomasa (Christen y col., 1997) e indica que *C. fimbriata* es altamente sensible al estrés acuoso. Este hongo filamentoso en su habitat natural se desarrolla mejor durante las lluvias y cuando los suelos están húmedos (Malaguti, 1958). Cuando la actividad del agua ( $a_w$ ) del medio externo se desvía del valor óptimo específico para cada especie generalmente entre 0.98 y 0.995, el microorganismo aumenta su consumo de energía para restaurar el equilibrio termodinámico y de esta manera disminuye su habilidad para crecer (Gervais y col., 1988).

La correlación positiva de acetaldehído, acetato de etilo, etanol, propionato de etilo, acetato de isobutilo y butirato de etilo con la biomasa puede relacionarse al crecimiento celular como se reportó para *Sacharomices cerevisiae*, mientras que una correlación negativa de biomasa con butanol podría indicar que la biosíntesis de estos alcoholes se activa bajo condiciones de crecimiento celular disminuído (Mauricio y col., 1997). Este último reporte informa que el isobutanol se produce durante el crecimiento celular. Sin embargo la correlación negativa observada entre biomasa e isobutanol en nuestro estudio, sugiere que en *C. fimbriata* el isobutanol se produce bajo condiciones de crecimiento celular disminuido.

Las mediciones de la producción del aroma no muestran el momento de máxima producción cuando hay un retraso producido por el estrés acuoso por lo que se piensa que se necesitaría más tiempo de fermentación para alcanzar el valor máximo.

Se detectaron cantidades pequeñas y variables de acetona e isopropanol. Esto puede atribuirse parcialmente a la difusión a través del tapón de gasa, fenómeno que también sucede con los otros volátiles. De tal forma que un estudio detallado de estos compuestos debería considerar un sistema de aireación con trampas de adsorbentes (porapak o tenax), tal como se usa en el método de purga y trampa (Börjesson y col., 1993).

#### **5.2.4 Conclusiones**

Este estudio muestra que *Ceratocystis fimbriata* necesita tiamina para la preparación de un inóculo adecuado y obtener una concentración más alta de volátiles del aroma en la fermentación líquida independientemente del medio usado.

El crecimiento y la producción del aroma en el medio líquido aumenta en términos absolutos cuando el medio contiene tiamina, pero el rendimiento de volátiles con respecto a la biomasa no se incrementa.

La adición de leucina al medio de cultivo desde el inicio no aumentó el crecimiento ni la producción de aroma. Sin embargo se observa un ligero aumento en la producción de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo, pero este efecto es comparable al que se obtiene cuando se adiciona tiamina al medio de fermentación. En caso de querer aumentar el rendimiento de estos compuestos, la decisión de añadir leucina o tiamina al medio debe tomar en cuenta factores económicos.

La reducción en la  $a_w$  produce un retraso en el crecimiento y la reducción de la producción de los compuestos del aroma, independientemente del inóculo o del medio de

cultivo utilizado (adicionado de leucina o tiamina). Esto indica la alta sensibilidad de *C. fimbriata* al estrés acuoso.

En consecuencia, los estudios futuros sobre producción de aromas deben considerar un sistema con una trampa para retener todos los volátiles producidos, deben permitir la salida del aire y la realización de la fermentación en volúmenes más grandes (250ml en vez de 20 ml) porque es posible que el microorganismo se comporte de manera diferente en un espacio grande accesible para el crecimiento en un volumen mayor de medio de fermentación.

### 5.3 Reproducibilidad de resultados.

Los resultados de producción de biomasa y de compuestos volátiles en el espacio de cabeza en los controles de los dos estudios de la tesis, se reportan en el Cuadro 5.8.

Cuadro 5.7 Producción máxima de biomasa, volátiles totales y etanol en el espacio de cabeza en los dos estudios.

	Biomasa máxima (g/l)	Producción máxima de volátiles totales	Producción máxima de etanol	Fecha de realización
Estudio 1	4.5	150 $\mu$ M	70.7 $\mu$ M	Junio 1995- mayo 1996
Estudio 2	3.74	76.2 $\mu$ M	38.93 $\mu$ M	enero-mayo 1999
eem	0.2	5.11	3.02	

eem=error estándar de la media

Debido a que el etanol es el compuesto volátil con mayor concentración, se calculó su producción en el medio líquido haciendo uso de su constante de Henry (0.0012) para los dos estudios (Cuadro 5.8).

Cuadro 5.8 Comparación de la producción de etanol en los dos estudios.

	Producción en el medio líquido ( $\mu$ M)	Producción por reactor ( $\mu$ M)	Producción específica ( $\mu$ M/g)
Estudio 1	58 916.00	5 903.66	1 311.77
Estudio 2	34 666.66	697.37	464.91

En los dos cuadros se aprecia que la producción por litro de biomasa, volátiles totales y etanol en todos los casos fue mayor en el estudio 1.

La fermentación en el estudio 1 se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml y en el estudio 2 en frascos serológicos de 100 ml. Ambos estudios fueron realizados empleando

al medio estándar (ME) como control (Christen, 1991). Los factores geométricos de los contenedores se muestran en el Cuadro 5.9.

En los dos estudios se emplearon las mismas condiciones de temperatura y agitación, aunque el primer estudio se realizó en una incubadora con agitación rotatoria de temperatura controlada (New Brunswick Scientific, N.J. USA) y para el segundo estudio se empleó una bañó de agua con agitación rotatoria (New Brunswick Scientific, N.J. USA).

Cuadro 5.9 Características de los matraces y los frascos utilizados (promedio y desviación estándar).

	matraces Erlenmeyer de 250ml	Frascos serológicos
$D_i$ de la boca	$3.05 \pm 0.06$ cm	$1.63 \pm 0.25$ cm
$D_i$ de la base	$7.45 \pm 0.1$ cm	$4.78 \pm 0.19$ cm
$D_i$ en la superficie del medio	$6.90 \pm 0.1$ cm	$4.78 \pm 0.19$ cm
Área de la boca	7.07 cm <sup>2</sup>	2.07 cm <sup>2</sup>
Área de la superficie del medio	37.40 cm <sup>2</sup>	17.9 cm <sup>2</sup>
Área de la base	43.59 cm <sup>2</sup>	17.9 cm <sup>2</sup>
Altura del medio	3.2 cm	1.7 cm
Altura del reactor	$13.40 \pm 0.12$ cm	$9.5 \pm 0.02$ cm
Volumen total	$270.5 \pm 10.5$ cm <sup>3</sup>	$125.5 \pm 1.29$ cm <sup>3</sup>
Volumen del medio	100.00 cm <sup>3</sup>	20.00 cm <sup>3</sup>

$D_i$  = Diámetro interno

En el cuadro 5.9 se observa que el área de la superficie del medio, en los matraces Erlenmeyer es mayor (37.4 cm<sup>2</sup>) que en los frascos serológicos (17.9 cm<sup>2</sup>). Además se obtuvo una velocidad angular de 5419.3 cm/min para los matraces Erlenmeyer y de 3754.2 cm/min para los frascos, estos valores más grandes tanto del área superficial como de la velocidad angular podrían derivar en una mejor transferencia de oxígeno en los matraces Erlenmeyer.

En una fermentación, la agitación mecánica (250 rpm) debe asegurar la homogeneidad de todo el volumen del conjunto cultivo-sustrato. Para cultivos con

desarrollos densos como es el caso de los hongos la agitación resulta esencial con respecto a los requerimientos de transferencia de oxígeno ya que ésta es la que va a proporcionar los requerimientos metabólicos de oxígeno, tanto respiratorios como biosintéticos (Sánchez Marroquín, 1961) y también producir la remoción de dióxido de carbono (Henzler and Schedel, 1991).

En las fermentaciones en este trabajo con matraces y frascos agitados, además de la resistencia al transporte en la superficie celular, existe la resistencia a la transferencia entre el gas y el líquido. En las fermentaciones líquidas la transferencia de masa entre el gas y el líquido de los caldos de cultivo se determina solamente por el proceso de transporte en la interfase gas/líquido (Henzler and Schedel, 1991).

Probablemente no sólo los parámetros más importantes como el pH, el oxígeno y la temperatura afectan el curso de una fermentación, también las interacciones entre estos parámetros deben tomarse en cuenta cuando hay cambio de volumen en una fermentación (Demain y Davies, 1999). Además el microorganismo puede comportarse de manera diferente en un mayor espacio para el crecimiento en un volumen mayor para la fermentación (Large, 2003).

### **5.3.1 Inóculo**

Se utilizó la cepa de *Ceratocystis fimbriata* CBS 374-83, proveniente del Central Bureau Voor Schimmelcultures Baarn, en los Países Bajos, esta cepa se depositó desde el inicio en el cepario del CINVESTAV.

La conservación de la cepa se hizo a través de resiembras en tubos de agar inclinado cada tres meses. El tipo de inoculación del agar fue por punteo.

A fines de de 1997, comenzaron a presentarse problemas con el microorganismo que consistieron en una baja producción de esporas en PDA. Se pensó que había algún tipo de contaminación, por lo que se procedió a hacer la purificación del microorganismo en PDA por estría, por la técnica de diluciones y con agar PDA-rosa de bengala con cloranfenicol. No se detectó contaminación ni mejoró la reproducción de *C. fimbriata*.

Las pocas esporas negras que se obtuvieron en estos intentos de purificación se sembraron en PDA. Durante su crecimiento empezaron a aparecer en las placas de PDA sectores blancos en donde aparentemente no había esporulación y sectores negros correspondientes a las esporas. Cuando estas esporas se inoculaban en medio líquido estándar (ME) ya no había crecimiento.

Se estudiaron sustratos alternativos para evaluar la posibilidad de que el microorganismo tuviera alguna deficiencia nutricional por lo que se emplearon otros tipos de medios como: extracto de malta, una suspensión de maíz, medio de Sabourand y agar malta- peptona (Cuadro 5.3.4).

Se encontró que es mejor emplear el medio líquido de maíz que el medio de extracto de malta. En el medio de Sabourand había crecimiento pero la esporulación no era como en el PDA antes de que la cepa presentara el problema.

Cuadro 5.10 Medios de cultivo y sus resultados.

	aroma	Crecimiento	Esporulación
Extracto de malta	poco	sí	esporas cafés en las paredes
Malta- peptona	no	escaso	esporas cafés en las paredes
Maíz en suspensión	sí	sí	esporas negras
Sabourand	no	sí	esporas cafés

Se revisó la morfología del hongo en las cajas Petri de PDA que tenían crecimiento escaso en las que había secciones de crecimiento del hongo en blanco y en negro. El resultado de la evaluación fue: que el hongo no estaba contaminado y lo poco que había crecido conservaba las características de *C. fimbriata*, solamente que estaba presentando sectorización, es decir que iniciaba la degeneración de la cepa (Figura 5.12). Este problema se debió a que la reproducción del hongo se realizaba por punteo y de esta forma no siempre se inoculan las esporas sexuales que se localizan en los peritecios que permanecen en contacto con el agar, solamente se transfieren las esporas aéreas que en este caso son vegetativas (Martínez, 1998). Siempre que se haga una resiembra, se debe asegurar que todo el material genético (esporas sexuales y asexuales) sea transferido al nuevo cultivo. El hecho de realizar varias resiembras, puede traer como consecuencia cambios en el metabolismo del microorganismo o degeneración del mismo durante su crecimiento debido a la selección de genotipos o variantes que puedan aparecer ya sea por mutación espontánea o por estar presentes en el cultivo inicial (Martínez, 1998; Webster y Butler, 1967).

*C. fimbriata* es un hongo auxótrofo en tiamina y requiere de ella para la formación del peritecio que es el lugar en donde se producen las esporas sexuales (Robins y Ma, 1942; Barnett y Lilly, 1947) y en el caso de las levaduras, la tiamina tiene un papel clave en el metabolismo de carbohidratos. Por estas dos razones se adicionó este factor de crecimiento a los cultivos.



Figura 5.12 Sectorización de *Ceratocystis fimbriata* en PDA.

Con *C. fimbriata* procedente de los diferentes cultivos que se tenían de experimentos anteriores, se comparó el crecimiento con tiamina y sin tiamina en PDA, encontrándose que en todos los casos el uso de tiamina fue mejor para el crecimiento y la producción de aromas.

Por todo lo mencionado arriba, se prefirió cambiar la cepa que se estaba usando por la que se había depositado en el CINVESTAV, para realizar el estudio 2. Esta cepa produjo una cantidad de esporas comparable a la primera cepa ( $1 \times 10^8$  esporas por matraz de PDA). Al inocular un cubito de agar PDA con las esporas, se obtuvo nuevamente la

esporulación a los 5 días. Durante la fermentación en el medio estándar (ME) hubo producción de aromas. El estudio 2 se realizó con esta cepa, después de 3 resiembras.

A lo largo de todo el trabajo de tesis, a excepción del período con el problema mencionado durante el segundo semestre de 1998, la producción de esporas fue bastante regular con un coeficiente de variación de 2.5%.

### ***5.3.2 Conclusiones***

El área superficial mayor en los matraces Erlenmeyer junto con la velocidad angular podrían aportar explicaciones para la mayor producción de biomasa, volátiles totales y etanol que se obtuvieron en la primera parte de esta tesis.

*C fimbriata* es aparentemente un hongo inestable genéticamente y probablemente la segunda cepa no tuvo un período de adaptación al PDA igual al de la primera cepa.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

*Ceratocystis fimbriata* es un hongo filamentosos que produce el 1% de compuestos volátiles con aroma de plátano.

De los compuestos volátiles el más importante por su concentración es el etanol (92%), seguido por el acetato de etilo.

La leucina cuando se adiciona al inicio de la fase estacionaria de crecimiento favorece la producción de compuestos del aroma como el alcohol isoamílico y el acetato de isoamilo, mientras que el incremento en concentración de los compuestos del aroma es menor por la adición del aminoácido desde el principio de la fermentación.

La preparación del inóculo con tiamina y el uso del medio estándar es una combinación adecuada para la producción de aromas.

*C. fimbriata* es muy sensible a la disminución de la actividad del agua y por lo mismo la tensión acuosa no ayuda a incrementar los aromas.

## ANEXO 1.

### **Cuantificación de los componentes del extracto etéreo por el método del estándar interno.**

Este es un método de cuantificación en el que la cantidad inyectada no es crítica. Un peso o un volumen de un estándar se mezcla con una cantidad conocida de la muestra problema y se inyecta en el cromatógrafo de gases. Todos los componentes de la mezcla aumentan o disminuyen proporcionalmente con el volumen de inyección. Si se permanece en el rango de concentración en donde la respuesta es lineal, los factores de respuesta relativos (área compuesto problema/ área estándar interno) permanecen constantes.

Las grandes ventajas de este método se deben al hecho de que tanto el estándar como la muestra desconocida se corren juntas en la misma inyección, por eso a esta técnica se le llama estándar interno. Si la sensibilidad del detector se altera, todos los picos se afectan en igual forma; las cantidades relativas no cambian. Si dos operadores inyectan diferentes cantidades de la misma muestra, las alturas de los picos serán diferentes, pero las cantidades relativas permanecen constantes. La clave de todo el procedimiento es el estándar interno de cada muestra.

Una ventaja de este método de cuantificación es, entre otras, que no se necesitan inyecciones repetitivas, sino que se conserve la relación de áreas. La dificultad de este método está en buscar un estándar interno adecuado que no interfiera con los componentes de la muestra. Los requisitos que debe cumplir un estándar interno son:

- 1) Que no se encuentre en la muestra problema.
- 2) Debe ser posible obtenerlo en alta pureza.
- 3) Debe ser estable bajo condiciones cromatográficas.
- 4) Debe ser inerte a todos los componentes de la muestra y de la columna.

- 5) Debe ser cromatográficamente limpio, dando un pico bien formado y separado de todos los picos de la muestra.
- 6) Debe ser soluble en la muestra.
- 7) Debe tener un tiempo de retención comparable a los de los componentes de la muestra.

En el cuadro A.I.1 se indican los valores obtenidos para el coeficiente de regresión lineal (R), la R<sup>2</sup> de los estándares encontrados en las muestras disueltos en éter.

Cuadro A.1.1. Curvas estándar en éter, valores de la regresión lineal y rangos de aplicación de las curvas.

Compuesto	b	A	R	R <sup>2</sup>	Rango de Aplicación μl/l
Acetaldehido	0.09930	0.26845	0.99453	.9890	1-20
1-butanol	0.00955	1.04224	0.99681	0.9936	0.006 - 0.5
Acetato de 2-feniletilo	0.47833	0.76761	0.99915	0.9983	1 - 20
Acetato de isobutilo	0.00496	0.88125	0.99744	0.9948	0.006 - 0.03
Acetato de butilo	0.00665	1.10630	0.98901	0.9781	0.006 - 0.2
Acetato de amilo	-0.51459	0.80939	0.99194	0.9839	0.1 - 20
Acetato de etilo	-0.31147	0.51377	0.98808	0.9763	0.5 - 20
Acetato de isoamilo	-0.46781	0.78472	0.99416	0.9883	0.5 - 20
Acetoína	-0.21993	0.28273	0.99373	0.9874	3 - 24
Etanol	-1078695	0.58555	0.99250	0.9850	50 - 600
Alcohol fenético	0.01986	1.25960	0.98934	0.9787	0.006 - 0.25
Alcohol isoamílico	0.00881	0.99118	0.98704	0.9742	0.006 - 100
Alcohol isobutílico	-0.00631	0.67441	0.99692	0.9938	0.5 - 20
Alcohol isopropílico	0.00340	0.67236	0.99715	0.9943	0.004 - 0.5
Propanol	0.01756	0.57730	0.99978	0.9995	0.5 - 22
Butirato de butilo	0.08055	0.66066	0.99827	0.9965	0.1 - 20
Butilen glicol	0.05987	0.36392	0.99848	0.9969	0.5 - 20
Butirato de etilo	0.01301	0.74448	0.99239	0.9848	0.006 - 0.5
Hexanoato de etilo	0.07668	0.71911	0.99967	0.9993	1 - 22
Propionato de etilo	0.00987	0.71025	0.99087	0.9818	0.006 - 0.05

En el cuadro A1.2, se dan los valores encontrados para las curvas estándar realizadas para el análisis del espacio de cabeza.

Cuadro A.1.2. Curvas estándar del espacio de cabeza, valores de la regresión lineal y rangos de aplicación de las curvas.

Compuesto	b	m	R	R <sup>2</sup>	Rango de aplicación $\mu\text{I}$
Acetato de etilo	-9817.64	55477.49	.9977	.9954	0.2-6
Acetaldehído	176.21	32499.86	.990	.9801	.01-.1
Etanol	4528.42	53753.84	.9975	.9950	0.15-6
Isopropanol	-5909	5636.69	.9968	.9936	0.1-3.0
Propanol	815.346	68242.29	.9998	.9978	0.1-3.0
Propionato de etilo	-5581	54808.26	.9974	.9948	0.2-4.5
Butirato de etilo	370.57	51729.66	.9899	.9781	0.03-3.0
Butanol	-9772	68378.47	.9937	.9874	0.2-4.5
Acetato de isobutilo	370.57	51729.65	.9932	.9864	0.02-2
Acetato de isooamilo	10607	40758.7	.9904	.9808	0.02-2
Alcohol isobutílico	1122	62005	.9943	.9886	0.02-2
Alcohol isoamílico	-7518.02	41124.38	.9904	.9808	0.02-2

## Anexo 2. Compuestos del aroma, sus usos y valores de umbral.

Cuadro A.2.1 Compuestos del aroma producidos por *C. fimbriata*, usos y umbrales de olor.

Compuesto	Aroma	Usos	Concentración Empleada	Referencia	Umbral del aroma.	Referencias
<b>Aldehidos</b>						
Acetaldehido	En altas diluciones reminiscente al café o vino	Manzana, durazno, plátano, piña	4-25 ppm	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	15ppb	Buttery et al 1988
<b>Esteres</b>						
Acetato de etilo	Frutal	Plátano, piña, pera, manzana, durazno, melón, uva, menta	200-1500 ppm	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	25ppb	Mc Donald et al
Acetato de isobutilo	Muy difusivo, etéreo, plátano, recuerda al ron (olor a fermentado), diluido es dulce y frutal	Plátano- piña-raspberry- pera, fresa, mantequilla, tutifrutí	150-160 ppm 800-900 ppm en chicle	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975		
Acetato de butilo	Muy difusivo, etéreo, frutal, pungente, reminiscente de muchas clases de fruta madura y pasada. Olor a pera, plátano, fresa	Plátano, piña, pera, durazno, fresa, chabacano, mantequilla	30-35 ppm 200 ppm en chicle	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	8.8 ppm en jugo	Berger et al, 1992
Acetato de isoamilo	Olor a fruta fresca, pera, plátano, manzana, bergamota, plátano maduro	Plátano, pera, fresa, raspberry, piña, manzana, caramelo, cola, coco, cereza, uva, mantequilla, durazno, ron, vainilla	200 ppm en dulces 3000 ppm en chicle	Arctander, 1982	2ppm en cerveza	
Propionato de etilo	Etéreo, frutal	Ron, manzana, plátano, pera, piña, ciruela, mantequilla tutifrutí	10-100 ppm	Arctander, 1982		
Butirato de etilo	Piña dulce	Fresa, olivo y aceites vegetales	20-1400 ppm	Fenaroli's, 1975		
<b>Alcoholes</b>						
Etanol	Alcohólico	Plátano, pera y manzana	1-34 ppm	Fenaroli, 1975	5.7ppm	Maga, 1976
Isopropanol	Alcohólico	Manzana, cognac	10-75 ppm			Maga, 1976
Propanol	Alcohólico	Plátano		Fenaroli, 1975	9ppm (600 en cerveza)	Maga, 1976

Butanol		Plátano, pera		Fenaroli, 1975	500 ppb, 200ppm en jugo	Buttery et al 1988; Berger,1992.
Isobutanol	Diluido suave, dulce, plátano	Cola, frutal, ron, mantequilla, licor	30-35 ppm	Arctander, 1982	7ppm (100 en cerveza)	
Isoamilico	Plátano	Plátano		Arctander, 1982	300ppb (50 en cerveza), 4.8	
Amilico	Placentero en alta dilución	cereza, manzana, plátano, chocolate, piña, ron, brandy	35 ppm 3500 en chicle	Arctander, 1982		
Fenetilico	Dulce, miel-rosa	Mantequilla, fresa, raspberry, caramelo, miel, melón, frutas complejas	40 ppm 1-20 1-3*	Arctander, 1982	1100 ppm	
Butilenglicol	A altas concentraciones dulce, a bajas concentraciones amargo	Perceptible solo en altas con. Buen disolvente para sabores	5000 ppm	Arctander, 1982		
<b>Cetonas</b>						
2-3- Butanodiona (diacetilo)	Poderoso, difusivo, pungente, aroma de mantequilla	Bebidas alcohólicas, mantequilla	3-30 ppm 40-50 en prod. Horneados 6-9 en imitación mantequilla	Arctander, 1982	1 ppm	

## 7. REFERENCIAS.

- Abraham, B.G. y Berger, R.G. 1994 Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **42**, 2344-2348.
- Agrawal, R. Joseph, R. 2001 Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 335-337.
- Ames, J.M. y McLeod, G. 1990 Volatile compounds of okra. *Phytochemistry* **29**, 1201- 1207.
- Andrus, C. y Hartner, L. 1933 Morphology of reproduction in *Ceratostomella fimbriata*. *Journal of Agricultural Research* **46**, 12, 1059-1077.
- Arctander, S. 1982 *Perfume and flavor chemicals*. Pags. 40-48. Publicado por el autor. USA.
- Bading, H.T. y De Jong C. 1983 Headspace Analisis for the study of aroma compounds in milk and dairy products en *Analytical Volatiles Methods Applied*. Proceedings International Workshop Editado por Schereier, P. Berlin (Publicado en 1984) pp 401-417.
- Banerjee, U.C. 1993 Transformation of Rifamycin  $\beta$  with growing and resting cells of *Curvularia lunata*. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 1037- 1041.
- Barnett, H. y Lilly G. 1947 The relation of thiamin and the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. *Mycologia*, **39**, 699-708.
- Ben, S.M. y Peppard, T. 1996 Caracterizacion of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 557-566.
- Berger, R.G., Detweiller, G.R., Krempler, G. y Drawert, F. 1992 Precursor atmosphere technology. Efficient aroma enrichment in fruit cells. In *Flavor precursors*. Thermally Enzymatic Conversions. Ed. Teranishi, R.; Takeoka, G.R. y Guntert, M. ACS Symposium series 490. American Chemical Society. Washington, D.C.
- Berger, R.G. 1995 Aroma Biotechnology. *Trends in Food Science and Technology* **7**, 177-178.
- Bernd, G.A. y Berger, R. 1994. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 2344-2348.

- Bett, K.L., Vercellotti, J.R., Lovegreen N.V., Sanders T.H., Hinsch, K.L. y Rasmissen, G.K. 1994 A comparison of the flavor and compositional quality of peanuts from several origins. *Food Chemistry* **51**, 21-27.
- Bigelis, R. 1992. Flavour metabolites and enzymes from filamentous fungi. *Food Technology* 151-159.
- Bindon, J.R.; Baker, T.P. 1997. Bergmann's rule and the thrifty genotype. *American Journal of Physical Anthropology* **11**, 533-558.
- Blomberg, A. y Adler, L. 1993. Tolerance of fungi to NaCl. *Stress Tolerance of Fungi*. Jennings, D.H. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Bluemke, W. y Schrader, J. 2001. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomolecular Engineering* **17**, 137-142.
- Boker, A., Fisher, M., y Berger, R.G. 2001. Raspberry ketone from submerged cultured cells of the basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnology Progress* **17**, 568-572.
- Börgesson, T.S., Stöllman, U.M. y Schnurer, J.L. 1993. Off odorous compounds produced by molds on oatmeal: identification and relation to other growth characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 2104-2111.
- Boutur, O., Dubreucq, E. y Galzy, P. 1995 Factors influencing synthesis catalysed in aqueous media by the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron y Guerra. *Journal of Biotechnology* **42**, 23-33.
- Bramorski, A., Soccol, C.R., Christen, P. y Revah, S. 1998. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. *Revista de Microbiología* **28**, 208-212.

- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kebeler, M., Sturner, R., y Zelinski, T. 2004. Industrial Methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International Edition*. **43**, 788-824.
- Brenna, E., Fuganti, C., Serra, S. 2003. Odour active enantiopure compounds: the ten isomers of irone. *Comptes Rendus Chimie* **6**, 529-546.
- Brul, S. y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. *Internacional Journal of Food Microbiology* **50**, 1-17.
- Burkhead, K.D.; Peterson, S.W. y Bolen, P.L. 1994. Microbial hydroxylation. I. Hydroxylation of aniline by *Aspergillus alliaceus*, *A. albertensis* and *A. terreus*. *Journal of industrial microbiology*, **13**, 233-237.
- Buttery, R.G. y Kamm J.A. 1980 Volatile components of alfalfa: Possible insect host plants attractants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 978-981.
- Campbell, R.N. 1958 Nutrient requirements for the production of perithecia by *Ceratocystis variolorum* and other species. *American Journal of Botany* **45**, 263-70
- Campbell, I.M. 1984. Secondary metabolism and microbial physiology. En *Advanced Microbiology Physiology*, Vol 25, Ed. Rose, A.H. y Tempest, D.W. pp. 1-60. London: Academic Press.
- Capell, T. y Christon, P. 2004. Progress in plant metabolic engineering. *Current opinion in biotechnology* **15**, 148-154.
- Cenedella, R. 1986. U.S. Patent 4 628116. En Welsh, F.W., Murray, W.D. y Williams, R.E. 1989 *Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals*. **9**, 2, 105-169.
- Chang, S., Vallesse, F., Sun, L.H., Hsieh, A.L. y Min, D.B. 1977. Apparatus for the isolation of trace volatile constituents from foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 450-455.

- Charalambous, G. 1978. Analysis of foods and beverages in *Headspace Techniques*. Academic Press. USA.
- Charalambous, G. 1983. *Instrumental Analysis of Foods. Recent Progress*. Vol. II pags. 76-92. Academic Press. USA.
- Cheetham, P.S.J. 1993. The flavour and fragrance industry. *Trends in Biotechnology* **11**, 478-487.
- Cheetham, P.S.J. 1996. The flavour and fragrance industry. In *Biotechnology. The Science and the Business*, V. Moses y Cape, R.E. (eds.), Harwood Acad. London, **26**, 481.
- Christen, P. y Raimbault, M. 1991 Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters* **13**, 7, 521-526.
- Christen, P. Auria, R. y Palma I. 1992. Crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* sobre diferentes medios líquidos y sólidos para la producción de aromas. *Avances en Ingeniería Química* **13**, 17-21.
- Christen, P. Villegas, E. Revah, S. 1994. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnology Letters* **16**, 11, 1183-1188.
- Christen, P. 1995. Producción de aromas por fermentación en medio sólido. *Tópicos de Investigación y de Posgrado* **4**, 2, 102-109.
- Christen, P., Meza, J.C. y Revah, S. 1997 Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycological Research* **101**, 8, 911-919.
- Claus, G.W. 1989. *Understanding microbes*. Pags.349-359. W.H. Freeman and Co. New York USA.
- Collins, R.P. 1978. The production of volatile flavour compounds by filamentous fungi. *Developments in Industrial Microbiology*, **20**, 239.

- Collins, R.P. y Morgan M.E. 1961. Identity of fruit like aroma substances synthesized by endoconidial forming fungi. *Phytopathology* **52**, 407-409.
- CONABIO 2002. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad en México [http://: www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*. **53**,1,121-147.
- Davis, E.M., Croteau, R. 2000 Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, Sesquiterpenes and diterpenes. En *Biosynthesis*. Eds. Leeper, F.J. y Vederas, J.C. Springer Verlag . Berlin. Pags. 53-96.
- Davis, R. y Ristow, J. 1995. Stress with NaCl and glycerol products. *Experimental Mycology* **19**, 241-46.
- De Araujo, A.A.; Pastore, G.M. y Berger, R.G. 2002. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98**, 747-751.
- De Vos, W.M. y Hugenholtz, J. 2004 Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology* **22**, 72-79.
- Demain, A.L. Davies, J.E. 1999. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society of Microbiology. Washington D.C. Pags. 49-60.
- Derrick, S. y Large, P.J. 1993 Activities of the enzymes on the Ehrlich pathway and formation of branched chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology* **139**, 2783-2792.
- Díaz, P. Señorans, F.J., Reglero G., Ibáñez, E. 2002. Truffe aroma analysis by headspace solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6408-6472.

- Dickinson J.R, Harrison S.J, Hewlins M. 1998. An investigation of metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25751-25756
- Dijksterhuis, G.B. y Pigot, J.R. 2001. Dynamics methods of sensory analysis. *Trends in Food Science and Technology* **11**, 284-290.
- Dirinck, P. Schreyen,L y Schamp,N. 1977. Aroma Quality evaluation of tomatoes, apples and strawbewrries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25** (4), 759-763.
- Engel, K.H. y Tressl, R. 1983. Studies on the volatile components of two mango varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**, 796-801.
- Erickson, R.E. 1976. The industrial importance of monoterpenes and essential oils. *Lloydia*, **39**,1, 8-19.
- Fabre, C.E., Blanc, P.J. y Goma, G. 1996. Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sciences des Aliments* **16**, 61-68.
- Fabre, C.E., Condoret, J. y Marty, A. 1999. Extractive fermentation of aroma with supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering* **64**, 392-400.
- Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L. , Brunerie, Y. G. y Colonna-Cecaldi, B. 1994 . Vainillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white root fungus. *Picnoporus cinnabarinus*; identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology* **37**, 123-132.
- Fenaroli's Handbook of flavour ingredients 1975 2nd edn, Vol. 2, ed. Furia, T.E. y Bellanca, N. Cleveland: CRC Press. ISBN 0-87819-533-5. pp. 567-572.
- Forage, R.G., Harrison, D.E.F. y Pitt, D.E. 1985. Effect of enviroment on microbial activity. In: *Comprehensive Biotechnology*, **1**, pags. 253-279. Edited by Moo-Young, M.

- Fromza, G. C., Fuganti C., Zucchi, G, Barbeni, M y Cisero, M. 1996. Natural abundance  $^2\text{H}$  nuclear magnetic resonance study of the origin of n-hexanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 887-91.
- Gatfield, I.L. 1988 Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technology* 110-169.
- Gatfield, I.L., Guntert, M. Sommer, H. Werkhoff,P. 1993. Some aspects of the microbiological reduction of flavor active lactones with particular reference to  $\gamma$ -decalactone. *Chemical Microbiology and Technology Lebensm* **15**, 165-170.
- Gervais, P. y Molin, P. 1988 Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering* **31**, 457-463.
- Gervais, P., Belin, J.M., Grajek, W. y Sarrette, M. 1988 Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. *Journal of Fermentation Technology* **66**, 403-407.
- Gervais, P. y Batut, G. 1989. Influence of water potential on  $\gamma$ -decalactona production by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Applied and Enviromental Microbiology* **55**, 2939-2943.
- Gervais, P. y Sarrette, M. 1990. Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **69**, 1, 46-50.
- Gervais, P. Marechal, P.A. y Molin, P. 1992. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering* **40**, 1435-1439.
- Gervais, P. Marechal, P.A. y Molin, P. 1996 Water relations of solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research* **55**, 343-357

- Glick, B.R. 1994. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, **13**, 247-261.
- Goudar, C.T., Strevett, K.A. y Shah, S.N. 1999 Influence of microbial concentration on the rheology of non Newtonian fermentation broths. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 3, 310-315.
- Hadar, Y. y Dosoretz, C.G. 1991. Mushroom mycelium as a potential source of food flavour. *Trends in Food Science and Technology* 214-218.
- Hagedorn S. y Kaphamer, B. 1994 Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annual Review of Microbiology* **48**, 773-800.
- Halim, A.F., Narciso, J.A. y Collins, R.P. 1975. Odorous constituents of *Penicillium decumbens*. *Mycologia*, **67**, 1128-1130.
- Halling, P.J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventional media: Theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 178-206.
- Hanssen, H.P. y Sprecher, E. 1981 Aroma producing fungi: influence of strain specificity and culture conditions on aroma production. *Flavours*. Editor P. Schieier pags. 547-556. Elsevier.
- Hanssen, H.P., Sprecher, E. y Abraham, W.R. 1986. 6-protoilludene, the major metabolite from *Ceratocystis piceae* liquid cultures. *Phytochemistry* **25**, 8, 1979-1980.
- Hengchen, L. y Pheland, P.L. 1992. Comparison of volatiles from beetle transmitted *Ceratocystis fagacearum* and four non insect dependent fungi. *Journal of Chemical Ecology* **18** (9) 1623-1632.
- Henzler, H.J. y Schedel, M. 1991 Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Engineering* **7**, 123-131.

- Hiroshi, Y. e Hiroji, S. 1993. New aliphatic delta lactones, metabolites of *Ceratocystis piceae*. *Natural Products Letters* **2**, 221-226.
- Hocking, A. D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes on water activity. En *Stress Tolerance Fungi*. D.M. Jennings, Ed. Marcel Dekker. N.Y.pags. 101-141.
- Hohmann, S. 1997 Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. En *Yeast Stress Responses*. Landes Bioscience. Chapman and Hall. Texas, USA.
- Hubball J.A. y Collins, R.P. 1978. A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variospora*. *Mycologia* **70**, 117-129.
- Humprey, M. Pearce, S y Skill, B. (1990). Biotransformation of coconut fat to methyl ketones. A commercial scale solid-state dermentation. En *Abstracts of the Symposium on Biotransformation of Flavours*. London.
- Hunt, J. 1956. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* **19**, 1-58.
- Inch, J.M.M. y Trinci, P.J. 1988 Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *Journal of General Microbiology* **133**, 247-252.
- Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T. and Kobayashi, S. 1990 Volatile compounds produced by the fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**, 3, 169-172.
- Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M. y Vandamme, E.J. 1992 Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* **27**, 195-215.
- Janssens, L.; De Pooter, H.L.; Schamp, N.M. and Vandamme, E.J. 1987 Production of flavours by the yeast *Hansenula mrakii*. *Gent* **52**, 4, 1907-1913.
- Kaminsky, E., Stawicki, S. y Wasowics, E. 1974 Volatile flavour compounds produced by molds *Aspergillus*, *Penicillium* and fungi imperfecti. *Applied Microbiology* **27**, 1001-1004.

- Karlsson, H.O.E., Loureiro, S. y Trägårdh, G. 1995. Aroma compound recovery with pervaporation-temperature effects during pervaporation of a muscat wine. *Journal of Food Engineering* **26**, 177-191.
- Kieslich, K. Abraham, W.R., Stumpf, B., Thede, B. y Washausen, P. 1986. Transformations of terpenoids. *Process in oil research*. Brunke, E. Ed., Walter de Gruyter, N. York
- Kinsella, J. E. y Hwang, D. 1976 Biosynthesis of flavor by *Penicillium roqueforti*. *Biotechnology and Bioengineering*, **18**, 927.
- Klibanov, A.M. 1986. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech*, june, 354-359.
- Konar, T.A. 2000. Natural flavor production using enzymes. En *Flavor Chemistry*. Industrial and Academic Research. Risch, S.J. y Ho, C. ACS Symposium series **756**. American Chemical Society. Washington D.C. pags. 87-92.
- Krings, U., Berger, R.G. 1998 Biotechnological production of flavors and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**, 1-8.
- Kurtzmann, C. P. 1983. Fungi sources of food, fuel and biochemicals. *Mycologia*, **75**, 374-382.
- Large, J.P. 2003. Comunicación personal
- Lanza, E.; Ko, K.W. y Palmer J.K. 1976. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 1247.
- Lanza, E. y Palmer, J.K. 1977. Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratocystis moniliformis*. *Phytochemistry* **16**, 1555-1560.
- Larroche, C.; Besson, I. y Gross, J. 1994. Behavior of spores of *Penicillium roquefortii* during feed batch bioconversion of octanoic acid into 2-heptanone. *Biotechnology and Bioengineering* **6**, 801-807.
- Leffingwell y Asociados 2002 [http://: www.Leffingwell.com](http://www.Leffingwell.com)
- Lehninger, A. 1994. Bioquímica Segunda Edición. Ediciones Omega. Barcelona, España pags. 341-345, 989-997.

- Levit, J. 1980. The Nature of stress injury and resistance. Responses of plants to environmental stresses. En *Physiological Ecology*. A series of Monographs. Editor T.T. Koslowski pags 10-18.
- Lin, H. 1992. Comparison of volatiles from beetle transmitted *C. fagacearum* and four non-insect-dependent fungi. *Natural Products letters* **3**, 123-126.
- Lomascolo, A., Lessage-Messen, L., Haon, M., Navarro, D., Antona, C., Craig, F. y Marcel, A. 2001. Evaluation of the potencial of *Aspergillus Níger* species for the bioconversion of L-phenilalanine into 2-phenylethanol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **17**, 99-102.
- Maga J.A. (1976).The potential of certain fungi as sources for natural flavor compounds. *Chemical senses and flavor* **2**, 255-262.
- Magee, R.J. & Kosaric, N. 1987 The microbial production of 2, 3-butanediol. En *Advances of Applied Microbiology* **32**, 89-158. ed. Laskin, A.I. pags 89-158. London: Academic Press. ISBN 012 002632-5
- Malaguti, G. 1958. Observaciones sobre la enfermedad de necrosis del tronco de cacao por *Ceratostomella fimbriata* en Venezuela. En: Ministerio de Agricultura de Colombia, Séptima Conferencia Interamericana de Cacao. Palmira Colombia. 13 al 19 de julio pags. 80-85.
- Manitto, P. 1981. *Biosynthesis of natural products*. Pags. 169-212; 346-363. John Wiley. USA
- Marechal P.A. y Gervais, P. 1994. Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied and Microbial Biotechnology* **42**, 617-622.
- Martin, J.F. y Demain, A.L.1990. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews* **44**, 230-251.
- Martinez, J. 1998. Comunicación personal

- Mason, S.; Sciaky, M; Desmoulin, F.; Fontanarava, E. y Cozzone, P.J. 1991. Simple cation-exchange high performance liquid chromatography optimized to the measurement of metabolites in the effluents from perfused rat livers using refractive index and ultraviolet detectors. *Journal of Chromatographia* **563**, 231-242.
- Mauricio, J.C., Moreno, J., Zea, L., Ortega, J. y Medina, M. 1997 The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Science and Food Agriculture* **75**, 155-160.
- McIntyre y Mc Neil 1998. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 291-298.
- McLeod, G. 1990. Volatile components of chayote. *Phytochemistry* **29**, 4, 1197-1200.
- Mc Neil B y Harvey, L.M. 1993. Viscous fermentation products. *Critical Reviews in Biotechnology* **13**, 4, 275-304.
- Meza, J.C., Christen, P. y Revah, S. 1998. Effect of added amino acids on the production of a fruity aroma by *Ceratocystis fimbriata*. *Sciences des Aliments* **18**, 627-636.
- Moat, A.G. y Foster, J.W. 1995. *Microbial Physiology* pags. 9-10. Third Edition. Wiley. USA ISBN 0-471-01452-4
- Molinari F. Marianelli G. y Aragozzini F. 1995. Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 967-973.
- Morales M.T. Aparicio R. y Ríos J.J. 1994 Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, **668**, 455-462.
- Movahedi, S. Y. y Waites, W. 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. *Journal of Bacteriology*, 5275-5281.

- Murray, KE 1977 Concentration of headspace, airborne and aqueous volatiles on chromosorb 1056 for examination by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **135**, 49-60
- Nakamura K. Higaki M Ushio K Oka.S, Ohno A. 1985. Synthesis with immobilized enzymes. *Tetrahedron Letters* **26**, 4213
- Nawar, W. 1969 Thermal degradation of lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **17**, 18-21.
- Nelson, D.R., Sadlowski, Y., Eguchi, M. Y Kjelleberg. 1997. The starvation-stress response of *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Microbiology*, **143**, 2305-2312.
- Omelianski, V.L. 1922. Aroma producing microorganisms. *Journal of bacteriology* **8**, 393-419.
- Owens, J., Allagueny, N., Kepping, G. Y. y Ames, J. 1997 Formation of volatile compounds during *B. subtilis* fermentation of soya beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 132-140.
- Pandey, A. 1992. Recent process developments in solid state fermentation. *Process Biochemistry* **27**, 109-117.
- Panke, S., Held, M., Wubbotls, M. 2004. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current opinion in biotechnology* **15**, 1-8.
- Pohl, M, Sprenger, G: y Müller M. 2004. A new perspective on thiamine catalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 335-342.
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V. y Karanth, N.G. 2003. Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemistry and Engineering Journal* **13**, 127-135.
- Rakotoarisoa, M. y Shapouri, S. 2001 Market price and the price of commodities imported from developing countries: the case of U.S. vanilla bean imports. *Agricultural Economics* **25**, 285-294.

- Revah, S. y Lebeault, J.M. 1989 Accelerated production of blue cheese flavors by fermentation on granular curds with lipase addition. *Lait* **69**, 281-289.
- Robbins, W. y Ma, R. 1942. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella* and related fungi, *American Journal of Botany* **29**, 835-843.
- Royal Society of Chemistry, 2000. 2002. [http:// www.chemsoc.org](http://www.chemsoc.org)
- Sánchez, L. Albores-Velasco, M y Del Río, F. 1991 Volatile compounds of *Sargentia greggi*. *Phytochemistry*, **30**, 6, 1915-1916.
- Sánchez, L. Seila, R.L., Christen, P. and Revah, S. 2002. Effect of leucine on aroma volatiles production from *Ceratocystis fimbriata* grown in liquid culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**, 231-237.
- Sánchez Marroquín Alfredo 1961. *Principios de Microbiología Industrial*. Editorial Química. Pags. 87-92. México, D.F.
- Sarrette, M.; Nout, M.J.R.; Gervais, P. y Rombouts, F.M. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. 1992. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**, 420-425.
- Sastry, K.S.M., Rao, C.V.P. y Manavalan, R. 1985. Studies on *Trichoderma viride* (PERS.) and the coconut like aroma produced by this fungus. *Indian Perfumer* **29** (3-4) 193-200.
- Schindler, J. y Bruns K. 1980. Monoterpene containing aroma compounds by fermentation. German Federal Republic Patent 2 840 143.
- Schindler, J. 1982. Terpenoids by microbial fermentation. *Industrial Engineering Chemical Production research Development* **21**, 537-539.
- Schreier, P. 1992. Flavor biotechnology. Conference proceeding series. Harnessing biotechnology for the American Chemical Society, Washington. Editor Ladissch M.R.

- Schwab, W. 2000. Biosynthesis of plant flavors: Analysis and Biotechnological approach. En *Flavor Chemistry*. Industrial and Academic Research Edited by Risch, S.L. and Ho, C. American Chemical Society.
- Schultz, T.H., Flath, R. A., Mon, R., Egging, S.B. y Teranishi, R. 1977 Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 446-449.
- Schwab, W. 2000. Biosynthesis of plant flavors: Analysis and Biotechnological approach. En *Flavor Chemistry*. Industrial and Academic Research Edited by Risch, S.L. and Ho, C. American Chemical Society.
- Secretaría de Economía México 2002. [http:// www.economia.gob.mx](http://www.economia.gob.mx)
- Señorans F.J., e Ibáñez, E. 2002, Análisis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 465,131-144.
- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M & Belin, J. M. 1992 Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnology Letters* **14**, 11, 1019-1024.
- Shaw, P.E. 1979. Review of Quantitative Analyses of Citrus Essential Oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 27, 2, 246-257.
- Spatafora, J. y Blakwell, M. 1994. The polyphyletic origins of *ophiostomatoid* fungi. *Mycological Research* **98**,1, 1-9.
- Sprecher, E. y Hanssen, H.P. 1983. Distribution and strain dependent formation of volatile metabolites in the genus *Ceratocystis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 493-499.
- Teranishi, R. 1981. *Flavour research advances*. Marcel Dekker Inc. N.Y
- Teranishi, R. y Kint, S. 1993 Sample preparation. En Acree, T.E. y Teranishi, R. *Flavor Science. Sensible principles and techniques*. American Chemical Society. Washington D.C.

- Tyrrell, M.H. 1990. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Food Technology*, **1**, 68-72.
- Turner, W.B. y Aldridge, D.C. 1983 *Fungal Metabolites II*. Pag. 103. London: Academic Press. ISBN 012-704551-1
- Waterland, R.A. y Garza, C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 179-197
- Webb, A.D. y Muller C.J. 1972. Volatile aroma components of wine and other fermented beverages. *Advances in Applied Microbiology* **15**, 75.
- Weber, A. y Jung, K. 2002. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays. *Journal of Bacteriology* 5502-5507
- Webster, R. y Butler E. 1967a A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. *Canadian Journal of Botany* **45**, 1457-68
- Webster, R. y Butler E., A. 1967b The origin of self-sterile, cross fertile strains and culture sterility in *Ceratocystis fimbriata*. *Mycologia*, **59**, 212-221.
- Webley, D.M.; Duff, R.F. y Farmer, V.C. 1956. Evidence for oxidation in the metabolism of saturated aliphatic hydrocarbons by soil species of *Nocardia*. *Nature (London)* **178**, 1467.
- Welsh, F.W., Murray, W.D. y Williams, R.E. 1989 Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology* **9**, 2, 105-169.
- Winterhalter y Schreier, 1993. Biotechnology: Challenge for the flavor industry. En *Flavor Science*. Sensible principles and techniques. Edited by Acree, T.E. y Teranishi, R. American Chemical Society Professional. Washington D.C.
- Wilson, C.W. y Shaw, P.E. 1980. Glass capillary gas chromatography for Quantitative determination of volatile constituents in cold pressed grapefruit oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 919-922.

Yada, H. Sato, H. 1993. New aliphatic delta-lactones, metabolites of *Ceratocystis piceae*.  
*Natural Products Letters* **2**, 221-226.

70-31



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Fecha : 21/10/2004  
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de DOCTOR EN CIENCIAS de la alumna FRANCISCA LEONORA SANCHEZ Y GARCIA FIGUEROA, matrícula 95102064, quien cumplió con los 180 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintiocho de octubre del 2004 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE AROMAS POR EL HONGO FILAMENTOSO CERATOCYSTIS FIMBRIATA EN MEDIO LIQUIDO.

Cabe mencionar que la aprobación de la Disertación Pública tiene un valor de 180 créditos y el programa consta de 360 créditos.

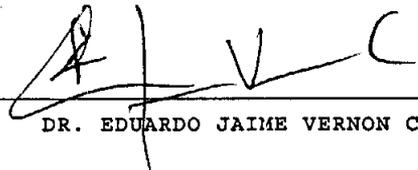
El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

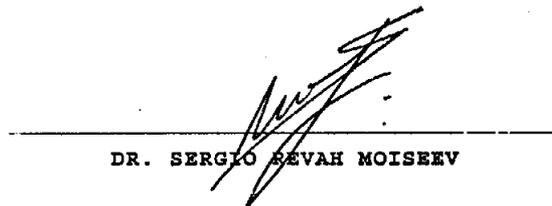
Aprobar

JURADO

Presidente

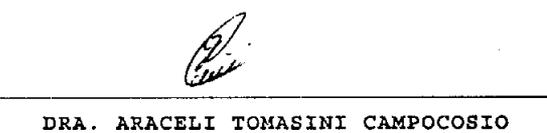
Secretario

  
DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

  
DR. SERGIO BEVAH MOISEEV

Vocal

Vocal

  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

  
DR. ENRIQUE DURAN PARAMO

Vocal

  
DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

UNIDAD IZTAPALAPA

Coordinación de Sistemas Escolares

San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, D.F, 09340, Apdo. Postal 555-320-9000

Tels. 5804-4880 y 5804-4883 Fax 5804-4876