

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

A MIS ASESORES: Dr. Pierre Christen y Dr. Sergio Revah M. Y PROFESORES.

Por haberme permitido colaborar con ellos y transmitirme ese conocimiento que me ha dado confianza y seguridad en mi andar.

A MIS COMPAÑEROS DEL LAB. T-166 (UAM-I) y a todos aquellos que estuvieron cerca de mi durante el desarrollo de la maestría.

A MI PEQUEÑA Y GRAN FAMILIA.

Mis Padres.

Irma Contreras Blancas.

Fidel Meza Camacho.

Marisol, Karla, Katya, Irma, Liliana, Magdalena, Rosalinda...

Por creer en mi, darme libertad e impulsarme a no conformarme con lo que lograba cada día.

26/9/66

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Eduardo Bárzana García.
Primer Vocal: Dr. Oscar Monroy Hermosillo.
Secretario: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.
Primer Suplente: M. en C. Mariano García Garibay.
Segundo Suplente: Dr. Hermilo Leal Lara.

Asesores: Dr. Pierre Christen y Dr. Sergio Revah M.
Sústantante: Q.F.B. Juan Carlos Meza Contreras.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioprosesos del Dpto. de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría del Dr. Pierre Christen y del Dr. Sergio Revah M.

Índice.

	Pag.
INDICE.	i
LISTA DE FIGURAS.	iv
LISTA DE TABLAS.	v
RESUMEN.	vii
I.- INTRODUCCION GENERAL.	1
II.- GENERALIDADES DE FERMENTACION SOLIDA.	1
II.1.- Producción de algunos metabolitos de interés por fermentación en medio sólido.	2
II.2.- Producción de aromas por vía biotecnológica.	4
III.- JUSTIFICACION.	5
IV.- OBJETIVOS.	6
V.- MATERIALES Y METODOS.	7
V.1.- MATERIALES.	7
V.1.1.- Microorganismo.	7
V.1.2.- Preparación de inóculo.	7
V.1.3.- Soportes utilizados en la fermentación en estado sólido.	8
V.1.4.- Medios de cultivo.	9
V.1.5.- Técnicas de cultivo usadas para la FES.	9
V.1.5.1.- Experimentos en matraces Erlenmeyer.	10
V.1.5.2.- Experimentos en columnas.	10

V.2.- METODOS ANALITICOS.	15
V.2.1.- Medición de pH.	15
V.2.2.- Determinación de CO ₂ y O ₂	15
V.2.3.- Medición de la humedad relativa de los soportes.	16
V.2.4.- Determinación de actividad de agua (a _w).	16
V.2.5.- Separación, identificación y cuantificación de los volátiles producidos durante la fermentación.	16
V.2.6.- Evaluación sensorial de los cultivos.	17
V.2.7.- Análisis de los datos de CO ₂ y volátiles producidos.	17
VI.- RESULTADOS Y DISCUSION.	18
VI.1.- Experimentos en matraces Erlenmeyer.	18
VI.1.1.- Estudio preliminar para determinar la capacidad de crecimiento y producción de aromas de <i>C. fimbriata</i> sobre tres soportes ; Bagazo de caña de azúcar (BCA), bagazo de yuca (BY) y salvado de trigo (ST).	18
VI.1.2.- Influencia de la naturaleza de los aminoácidos sobre la producción de aromas.	18
VI.1.3.- Efecto de la concentración de leucina y valina.	19
VI.1.4.- Relación entre el crecimiento y la producción de metabolitos volátiles.	22
VI.1.5.- Estudios de crecimiento.	23
VI.1.6.- Producción de aroma.	23
VI.1.7.- Compuestos volátiles producidos por <i>C. fimbriata</i>	25
VI.1.8.- Producción total de compuestos volátiles.	27
VI.1.9.- Producción de compuestos volátiles clave.	27
VI.1.9.1.- Salvado de trigo.	28
VI.1.9.2.- Bagazo de yuca.	29
VI.1.9.3.- Bagazo de caña de azúcar + medio sintético.	29

VI.2.- Experimentos de columnas empacadas con aereación forzada.	32
VI.2.1.- Influencia de la tasa de aereación sobre la producción de aroma y crecimiento del microorganismo.	32
VI.2.2.- Efecto de la naturaleza del soporte y del medio nutritivo sobre la producción de aroma y crecimiento del hongo.	34
VI.2.2.1.- Estudios de crecimiento.	34
VI.2.2.2.- Producción de aroma.	35
VI.2.2.3.- Compuestos volátiles producidos.	36
VI.2.2.4.- Producción de compuestos volátiles totales.	38
VI.2.2.5.- Tipo de metabolitos volátiles producidos.	38
VI.2.2.5.1.- Alcoholes.	38
VI.2.2.5.2.- Esteres.	40
VI.2.2.5.3.- Cetonas.	41
VII.- CONCLUSIONES.	44
VIII.- BIBLIOGRAFIA.	46

Lista de figuras.

	Pag.
Figura 1.- Diagrama de flujo del trabajo experimental.	11
Figura 2.- Diagrama de flujo del sistema experimental de fermentación sólida en matraces Erlenmeyer.	12
Figura 3.- Dispositivo experimental de la fermentación en medio sólido.	13
Figura 4.- Cromatogramas de la fase gaseosa (FG) de los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de <i>C. fimbriata</i> sobre bagazo de yuca (A), bagazo de yuca + 166.5 mmol/L de leucina (B), bagazo de yuca + 166.5 mmol/L de valina (C).	21
Figura 5.- Efecto del precursor sobre el CO ₂ acumulado.	22
Figura 6.- Efecto del precursor sobre los volátiles totales acumulados.	22
Figura 7.- Relación entre la producción de CO ₂ y de metabolitos volátiles.	22
Figura 8.- Evolución de dióxido de carbono en los cultivos en matraces de <i>Ceratocystis fimbriata</i> . A: comparación de los 3 substratos sin adición, B: salvado de trigo, C: bagazo de caña de azúcar + medio sintético, D: bagazo de yuca.	24
Figura 9.- Evolución de los compuestos volátiles totales en los cultivos en matraces de <i>Ceratocystis fimbriata</i> . A: comparación de los 3 substratos sin adición, B: salvado de trigo, C: bagazo de caña de azúcar + medio sintético, D: bagazo de yuca.	28
Figura 10.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos en matraces de <i>Ceratocystis fimbriata</i> crecido sobre salvado de trigo. A: sin adición, B: + urea, C: + leucina.	30
Figura 11.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos en matraces de <i>Ceratocystis fimbriata</i> crecido sobre bagazo de yuca. A: sin adición, B: + urea, C: + leucina, D: + valina.	31
Figura 12.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos en matraces de <i>Ceratocystis fimbriata</i> crecido sobre bagazo de caña de azúcar. A: sin adición, B: + leucina.	32

Lista de tablas.

	Pag.
Tabla 1.- Algunos metabolitos de interés producidos por FES.	3
Tabla 2.- Composición porcentual de los substratos utilizados (materia seca como base).	8
Tabla 3.- Condiciones de cultivo para los experimentos realizados sin aereación forzada en matraces Erlenmeyer.	14
Tabla 4.- Condiciones de cultivo para los experimentos realizados con aereación forzada en un dispositivo provisto de columnas.	14
Tabla 5.- Evaluación sensorial de los aromas detectados en los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de <i>C. fimbriata</i> crecido sobre salvado trigo suplementado con aminoácidos.	18
Tabla 6.- Evaluación del aroma detectado en los cultivos de <i>C. fimbriata</i>	19
Tabla 7.- Parámetros de ajuste en la ecuación de saturación que describe la relación entre la concentración de aminoácido y la producción de CO ₂ y compuestos volátiles.	22
Tabla 8.- Comparación del aroma y compuestos volátiles producidos en la FG de los cultivos en matraces de <i>C. fimbriata</i> y en el de un plátano maduro (control). . .	25
Tabla 9.- Compuestos volátiles identificados en la FG de los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de <i>C. fimbriata</i> y en el correspondiente de un plátano maduro.	26
Tabla 10.- Resultados de producción de aromas en cultivos con aereación forzada. .	33
Tabla 11.- Constantes cinéticas para la producción de CO ₂ de acuerdo al modelo de Gompertz.	35
Tabla 12.- Compuestos volátiles identificados en la FG de los cultivos de 2 días de fermentación de <i>C. fimbriata</i> suplementados con valina y con una aereación de 5 mL/h·gMS.	37
Tabla 13.- Constantes cinéticas para la producción de volátiles totales de acuerdo al modelo de Gompertz.	40
Tabla 14.- Constantes cinéticas para la producción de alcoholes totales de acuerdo al modelo de Gompertz.	40

Tabla 15.- Constantes cinéticas para la producción de ésteres totales de acuerdo al modelo de Gompertz. 42

Tabla 16.- Constantes cinéticas para la producción de cetonas totales de acuerdo al modelo de Gompertz. 43

Producción de aromas frutales utilizando una cepa del hongo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* crecida en cultivo en estado sólido.

MEZA J.C.*1,3, CHRISTEN P.1,2 y REVAH S.1

¹Depto. de Ingeniería de Procesos e Hidráulica. UAM-Iztapalapa, Apdo. Postal 55-534, 09340, México D.F. Fax: 724-49-00. ²ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération). ³Depto. de Alimentos, Fac. de Química, UNAM.

Resumen.

Se estudió la producción de aromas frutales por *Ceratocystis fimbriata* en fermentación sólida. Se prestó particular atención a la naturaleza del soporte (amberlita IRA900, anillos de vidrio poroso y bagazo de caña de azúcar (BCA)) y del soporte substrato (amaranto (Am), bagazo de yuca (BY) y salvado de trigo (ST)), la impregnación de éstos con una solución nutritiva (medio sintético con 200 g/L de glucosa y medio natural-caldo de papa), la importancia de la adición en el medio de compuestos precursores (aminoácidos y urea) y la tasa de aereación (50 y 5 mL/h.gMS)), sobre el crecimiento y producción de metabolitos volátiles.

El perfil aromático fue caracterizado por evaluación sensorial ("olfatometría") y por análisis de la fase gaseosa de los cultivos ("headspace") por cromatografía de gases. El crecimiento fue seguido por respirometría (medición de CO₂).

Se encontró que los soportes: Am, BCA, ST y BY, fueron adecuados para el crecimiento y producción de aromas por *C. fimbriata*, no así la amberlita y los anillos de vidrio. Se observó que a la más alta velocidad de aereación probada (50 mL/h.gMS), no se detectó o un ligero aroma fue observado, mientras que a 5 mL/h.gMS se registró una variedad importante de aromas (dulce, frutal, manzana/pera, piña, plátano) a una mayor intensidad. En Am se detectaron intensas notas frutales (plátano y piña) mientras que un débil aroma a plátano fue detectado en BY y a manzana/pera en ST. Entre los medios nutritivos probados, el BCA suplementado con medio sintético o con caldo de papa dió un aroma frutal de intensidad media, mientras que la complementación del medio con la valina (Val) o la leucina (Leu) generó un intenso aroma a plátano. La producción de CO₂ fue más baja sobre ST que en BY y Am, mientras que la combinación Am + BY favoreció el mayor crecimiento del hongo, alcanzando una producción de CO₂ de más de 10 veces la registrada en ST. La adición de una fuente de nitrógeno como la Val o Leu en la mayoría de los casos mejoró la producción de CO₂ y en particular en ST (más de seis veces). El soporte más adecuado para la producción de compuestos volátiles fue Am, logrando alcanzar 3, 114 y 116 veces más los obtenidos en Am+BY, BY y ST, respectivamente. La adición de Val a los diferentes medios incrementó de manera importante, en la mayoría de los casos la producción de estos metabolitos, alcanzando valores hasta de 14 veces más respecto al

mismo sustrato utilizado como control. Los principales grupos de compuestos encontrados fueron alcoholes, ésteres y cetonas en menor cantidad. En el caso de Am+BY el valor máximo de ésteres correspondió a un 47% de los volátiles totales mientras que en el resto de los casos varió entre 11 y 35%. Estos precursores promovieron positivamente el crecimiento del hongo y en general mejoraron notablemente la producción de los metabolitos volátiles, particularmente de los ésteres que confieren notas frutales (acetato de etilo, propionato de etilo, acetato de 3-metilbutilo-compuesto característico del aroma a plátano- y también de ésteres del ácido butírico con alto valor comercial). Se observó que la producción de aroma está vinculada con el crecimiento y la máxima intensidad de aroma es registrada pocas horas antes o después de la máxima actividad respiratoria (entre 24 y 48 h). Un total de 24 compuestos fueron separados por cromatografía de gases e identificados 20 de ellos (8 alcoholes, 1 aldehído, 7 ésteres y 4 cetonas). Se demostró claramente que el perfil cromatográfico del "headspace" de cada cultivo depende del sustrato usado, de la velocidad de aereación y del precursor adicionado, cuando fue el caso.

I, II y III.- Introducción, Generalidades y Justificación.

I.- INTRODUCCION.

En la República Mexicana, la industrialización de los recursos agrícolas (caña de azúcar, trigo, maíz, café, frutas, hortalizas, etc.), genera una fuente continua de residuos (bagazos, pajas, pulpas, etc.), los cuales constituyen aproximadamente 135 millones de toneladas anuales y muchos de estos son subutilizados. Una alternativa para la transformación de éstos residuos, son los procesos biotecnológicos, con potencial para la obtención de diversos productos (antibióticos, enzimas, hormonas, etc.) útiles en las industrias farmacéutica y alimentaria entre otras. Por otro lado, en las últimas tres décadas, la tecnología de alimentos apoyada en la química analítica (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta presión y espectrometría de masas, principalmente) alcanzó grandes avances, lo que se ha traducido en el uso cada vez mayor de ingredientes artificiales en la industria (aromas, sabores, colorantes, etc.). Sin embargo, por los riesgos toxicológicos que pueden presentar, la preferencia del consumidor por los productos y aditivos naturales biotecnológicos ha crecido considerablemente (Horton, 1987). Esta concepción ha incrementado el mercado de dichos aromas (mercado mundial en 1990 = 8,600 millones de dolares, Unger, 1989). Esta demanda no puede ser satisfecha completamente por las fuentes tradicionales (flores, hierbas, frutos y animales) por diversos factores como la variabilidad y disponibilidad de materias primas estacionales. La biotecnología puede ser una alternativa viable para satisfacer la demanda de estos ingredientes y desarrollar nuevos productos con etiqueta natural (Gatfield, 1988).

II.- GENERALIDADES DE FERMENTACION SOLIDA.

La fermentación en estado sólido (FES) se basa en el crecimiento de un microorganismo sobre la superficie o en el interior de una partícula porosa sólida, en presencia mínima y suficiente de agua, absorbida dentro del sólido (Durand y col.,

I, II y III.- Introducción, Generalidades y Justificación.

I.- INTRODUCCION.

En la República Mexicana, la industrialización de los recursos agrícolas (caña de azúcar, trigo, maíz, café, frutas, hortalizas, etc.), genera una fuente continua de residuos (bagazos, pajas, pulpas, etc.), los cuales constituyen aproximadamente 135 millones de toneladas anuales y muchos de estos son subutilizados. Una alternativa para la transformación de éstos residuos, son los procesos biotecnológicos, con potencial para la obtención de diversos productos (antibióticos, enzimas, hormonas, etc.) útiles en las industrias farmacéutica y alimentaria entre otras. Por otro lado, en las últimas tres décadas, la tecnología de alimentos apoyada en la química analítica (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta presión y espectrometría de masas, principalmente) alcanzó grandes avances, lo que se ha traducido en el uso cada vez mayor de ingredientes artificiales en la industria (aromas, sabores, colorantes, etc.). Sin embargo, por los riesgos toxicológicos que pueden presentar, la preferencia del consumidor por los productos y aditivos naturales biotecnológicos ha crecido considerablemente (Horton, 1987). Esta concepción ha incrementado el mercado de dichos aromas (mercado mundial en 1990 = 8,600 millones de dolares, Unger, 1989). Esta demanda no puede ser satisfecha completamente por las fuentes tradicionales (flores, hierbas, frutos y animales) por diversos factores como la variabilidad y disponibilidad de materias primas estacionales. La biotecnología puede ser una alternativa viable para satisfacer la demanda de estos ingredientes y desarrollar nuevos productos con etiqueta natural (Gatfield, 1988).

II.- GENERALIDADES DE FERMENTACION SOLIDA.

La fermentación en estado sólido (FES) se basa en el crecimiento de un microorganismo sobre la superficie o en el interior de una partícula porosa sólida, en presencia mínima y suficiente de agua, absorbida dentro del sólido (Durand y col.,

1991; Moo-Young, 1983), para dar una actividad de agua (a_w) que garantice de manera adecuada las reacciones metabólicas involucradas en el crecimiento, desarrollo y producción metabólica o secreción por parte de un microorganismo (Viniestra, 1988; Pandey, 1992). Esta a_w puede ser controlada de acuerdo a la naturaleza de la matriz sólida y condiciones ambientales del proceso. El soporte sólido puede ser: a) asimilable y en entonces también es sustrato (soporte sustrato), como algunos desechos agroindustriales que contienen nutrientes para el microorganismo (carbohidratos, fuentes de nitrógeno y sales minerales) como: salvado de trigo, cáscaras de cereales como el arroz. b) inerte (como bagazo de caña o algunos materiales sintéticos: resinas poliméricas, etc.). Estos sistemas FES se han caracterizado por proveer ambientes con bajos niveles de agua, lo cual propicia que determinadas especies de hongos y levaduras puedan crecer preferencialmente y sintetizar concentraciones elevadas de productos poco usuales. Las características básicas de la FES, sus ventajas, desventajas y comparación con la fermentación en medio sumergido han sido revisadas ampliamente (Doelle y col., 1992; Nigam y Singh, 1994). La mayoría de sus ventajas están relacionadas al bajo contenido de agua requerido, lo cual conlleva a bajos costos energéticos de esterilización y a la recuperación del producto (sistema concentrado, porque excretan más el producto que en cultivo sumergido), fácil aereación (el aire circula fácil y libremente entre las partículas del sustrato), al impacto de ser un proceso limpio al no tener prácticamente efluentes líquidas contaminantes y al empleo de medios relativamente simples (desechos agroindustriales, materiales sintéticos adicionados únicamente de agua o una solución simple de nutrientes). Por otra parte, las desventajas de la FES están asociadas fundamentalmente a los problemas creados por la heterogeneidad del sistema y la limitada transferencia de masa y energía. Esto origina dificultad para la medición y control de las variables de proceso (pH, T, humedad, calor metabólico, etc.) y actividad metabólica (crecimiento, formación de producto, etc.). Esto en conjunto ha generado dificultades para el escalamiento de esta tecnología (Nigam y Singh, 1994; Hesseltine, 1977; 1987; Lonsane y col., 1985; Cannel y Moo Young, 1980).

II.1.- Producción de algunos metabolitos de interés por fermentación en medio sólido.

Los procesos de FES han sido ampliamente usados desde la antigüedad en los países orientales, asiáticos y africanos, para la preparación de alimentos fermentados, como es el caso del koji en China y Japón y del temphe en Indonesia. Tales

fermentaciones originan productos con aromas más aceptables (respecto a las materias primas originales) y digestibilidad mejorada. Una revisión interesante sobre los orígenes e historia de estos productos fue realizada por Aidoo y col. (1982) y Hesseltine (1977 y 1987). La FES es también usada para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas (sake), la maduración de quesos, ensilado y composteo, en los países mencionados y en Europa. Revisando la literatura podemos observar que en los últimos treinta años esta antigua técnica ha sido revaluada, modernizada y ha tenido una importancia tecnológica considerable, con un gran campo de aplicación. La FES es un sistema prometedor para la manufactura de productos no tradicionales de interés para las industrias de alimentos, farmacéuticas y químicas, empleando microorganismos miceliares cultivados sobre sustratos naturales apropiados (Pandey, 1992; Doelle y col., 1992). La FES es una alternativa interesante para el mejoramiento del contenido de proteína de residuos agroindustriales (Durand y Chereau, 1988), la producción de algunos metabolitos (ácidos orgánicos, alcoholes, antibióticos, biopesticidas, micotoxinas, etc.), enzimas, etc. (Roche y col., 1994; Riba y col., 1989; Pandey, 1992; Aidoo, 1982). Este proceso se ha utilizado para producir compuestos con un mayor rendimiento o que difícilmente se pueden obtener por otras vías (Tabla 1).

Tabla 1.- Algunos metabolitos de interés producidos por FES.

Producto / Substrato	Microorganismo	Referencia
Metabolitos :		
ac. cítrico,	<i>A. niger</i>	Shankaranand y Losane, 1994
citrinina	<i>Monascus</i>	Blanc y col., 1995
micotoxinas	<i>A. flavus</i>	El-Naghy y col., 1991
penicilina	<i>P. chrysogenum</i>	Barrios-Gonzales y col., 1993
Composta y estabilización de residuos agrícolas, alimenticios y municipales	Flora mixta	Poggi-Varaldo y col., 1996; 1997 Rivar y col., 1995
Ensilado	<i>Lactobacillus spp</i>	Saucedo-Castañeda y col., 1990
Enzimas:		
proteasas,	<i>A. niger</i>	Ikasari y Mitchell, 1994; Villegas y col., 1993
β -glucosidasa y α -L-arabinofuranosidase,	<i>T. aurantiacus</i>	Roche y Durand, 1996
lipasas	<i>Rhizopus delemar</i>	Christen y col., 1995
pectinasas	<i>A. niger</i>	Berovic y Ostroversnik, 1997

II.2.- Producción de aromas por vía biotecnológica.

Los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) son capaces de producir metabolitos aromáticos (que confieren aroma) volátiles durante su crecimiento en medios de cultivo (Schindler y Schmid, 1982) y juegan un papel importante en la generación de aromas naturales, particularmente en el campo de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Welsh y col., 1989; Janssens y col., 1992). Esta capacidad de ciertos microorganismos para sintetizar aromas y sabores a partir de diferentes medios de cultivo fue identificado y sugerido como un tipo de clasificación taxonómica por primera vez por Omeliansky en 1923.

Por otro lado, es bien conocido que los hongos presentan una adaptación preferencial para desarrollarse en sistemas sólidos, produciendo altos rendimientos de metabolitos de interés (Doelle y col., 1992). Este tipo de fermentación en estado sólido (FES) resulta ser una alternativa interesante para la producción de aromas, como lo manifiestan algunos estudios recientes. Por ejemplo, Yamauchi y col. (1989), lograron producir un intenso aroma frutal (caproato de etilo) mediante el crecimiento de una cepa de *Neurospora* sobre arroz pregelatinizado y Gervais y Sarrete (1990) estudiaron la producción de aroma de coco (6-pentil- α -pirona) por *Trichoderma viride* sobre agar. La producción de metabolitos aromáticos a partir de la bioconversión de compuestos relacionados o precursores de aroma por vía enzimática o microbiana, también ha tomado una gran atención últimamente por algunos autores. Humphrey y col (1990), patentaron un proceso de bioconversión de aceite de coco adsorbido en fibras de celulosa en metil cetonas por *Aspergillus niger*, mientras que Gatfield y col (1993), llevaron a cabo la biotransformación de ácido ricinoleico a γ -decalactona con una cepa de *Candida*. Entre estos microorganismos, los hongos filamentosos han alcanzado importancia económica. Se pueden destacar los *Phycomycetes* (géneros *Mucor* y *Rhizopus*); los *Ascomycetes* (géneros *Aspergillus* y *Penicillium*) y los *Basidiomycetes* (especialmente los hongos de raíz blanca, incluyendo, ciertos hongos comestibles) (Moo-Young, 1983). Este grupo de hongos pueden ser muy útiles por su capacidad para producir un gran número de compuestos que conforman diversos perfiles aromáticos, y que constituyen una fuente potencial de aditivos aromatizantes naturales; por su facilidad de liberar enzimas que modifican aromas como lo es el caso de la producción de aroma a queso en FES (Revah y Lebeault, 1989). Dentro de estos hongos, el género *Ceratocystis* y sus principales especies: *fimbriata*, *moniliformis* y *platani*; resultan ser muy interesantes por su capacidad para producir etanol, propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol y sus acetatos correspondientes (responsables de una amplia variedad de aromas frutales) a partir de sustancias simples como carbohidratos,

sulfato de amonio, urea y sales minerales (Collins y Morgan, 1961; Lanza y col., 1976; Hanssen y Sprecher, 1981). Por otro lado, *Ceratocystis fimbriata* es estudiado por sus características de rápido crecimiento, por la gran variedad de compuestos aromáticos generados y por su buena capacidad de producción de esporas: se ha empleado a nivel laboratorio y a nivel planta piloto para obtener una producción de 1 g/L de alcoholes monoterpénicos (Schindler y Burns, 1980). Sobre este microorganismo se han realizado otros estudios de interés en FES, sobre todo para estudiar su capacidad de crecimiento y producción de aromas en diferentes soportes sólidos (naturales y sintéticos) (Christen y col., 1994). Debido a que resulta ser un microorganismo muy interesante por lo antes mencionado y a que se cuenta con poca información referente al comportamiento de este hongo en FES (por la relativa facilidad de recuperación de los compuestos volátiles generados), resultaría muy interesante llevar a cabo estudios más a fondo. La síntesis de esta gran variedad de compuestos químicos, el rendimiento y su especificidad dependen considerablemente de las condiciones de cultivo, principalmente de la fuente de carbono y nitrógeno y del tipo de cepa (Christen y col., 1994; Lanza y col., 1984).

III.- JUSTIFICACION.

Debido a la demanda creciente de sabores y aromas naturales, a la dependencia tradicional de su síntesis orgánica y a la variabilidad en la disposición de materias primas naturales, surge la idea de producirlos por una alternativa biotecnológica, empleando un cultivo en medio sólido. Estos sistemas han demostrado ser procesos prometedores para la producción de metabolitos con un mayor rendimiento respecto a los medios sumergidos en los cuales además los metabolitos volátiles (ésteres, terpenos, etc.) son poco solubles e inestables. Un ejemplo de la versatilidad de la FES, es la producción a nivel industrial de metil-cetonas a partir de aceite de coco por *Aspergillus niger* cultivado en un soporte sólido, las cuales confieren diversos aromas (a queso y a frutas), que encuentran diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Humprey y col., 1990).

IV.- Objetivos.

Objetivo General.

Producir aromas frutales utilizando una cepa del hongo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* crecida en cultivo en estado sólido.

Objetivos Particulares.

- 1) Determinar la relación que existe entre la naturaleza del soporte y el medio nutritivo con respecto al crecimiento del hongo y al perfil del aroma generado.
- 2) Caracterización y cuantificación de los principales compuestos volátiles producidos en los cultivos.
- 3) Evaluar el efecto de compuestos precursores agregados en la generación de aromas y crecimiento del hongo.
- 4) Evaluar la influencia del tipo de aereación (estática y dinámica) en el cultivo sobre la producción de aroma y crecimiento del microorganismo.
- 5) Desarrollo de un modelo matemático que permita describir la relación existente entre la producción de aromas frutales y el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* en medio sólido.
- 6) Comparación del aroma generado en los cultivos con el de los frutos correspondientes.

V.- Material y Métodos.

V.1. MATERIALES

V.1.1.- Microorganismo.

El hongo filamentoso estudiado es *Ceratocystis fimbriata* CBS 374-83 (Ellis and Halst) donado por el Dr. Bensoussan (ENSBANA Dijon-France). Pertenece a la familia de los ascomicetos, es aerobio, con temperatura óptima de crecimiento de 30 °C y pH óptimo de 6. Su reproducción es vegetativa (asexual), formando ascosporas uniformes. (Sprecher y col., 1983).

V.1.2.- Preparación del inóculo.

La cepa se sembró en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de papa, dextrosa y agar (39 g/L); se cerraron con un tapón de gasa y algodón y se incubaron por 5 días a 30 °C. Se cosecharon las conidio esporas con una solución de agua destilada estéril que contenga algunas gotas de Tween 80 (agente que mejora la cosecha), perlas de vidrio, y una barra magnética con el fin de recuperar la máxima cantidad de esporas. Después de agitar nuevamente el medio durante 5 min, se recuperó la suspensión de esporas. Se tomó 1 mL de la suspensión de esporas recolectada y se realizó una dilución de ésta, se homogenizó y se tomó un poco de la solución con una pipeta Pasteur. Con el volumen tomado se llena la cámara de Neubauer. Se contó el número de células presentes en 13 cuadros elegidos aleatoriamente y se obtuvo el valor promedio de las esporas presentes en la cámara. Dicho valor es multiplicado por un factor de corrección de 25×10^4 , el cual está referido a las dimensiones de los cuadros de la cámara de Neubauer (0.1mm x 0.1mm x 1mm). En caso de haber llevado a cabo una dilución se multiplica también por el factor de dilución empleado. El resultado final del conteo permite determinar el número de esporas presentes en 1 mL. El conteo se hace extemporáneamente.

V.1.3.- Soportes utilizados en la fermentación en estado sólido (FES).

Se emplearon tres soportes que a la vez pueden ser empleados por el microorganismo como sustrato: amaranto, bagazo de yuca y salvado de trigo, los cuales contienen una composición diferente de nutrientes (fuente de carbono y nitrógeno) según la Tabla 2. También se probaron tres soportes: bagazo de caña de azúcar (composición química: celulosa (43 %), hemicelulosa (26 %), lignina (21 %), cenizas (3 %), componentes solubles en solventes orgánicos (3 %) y componentes solubles en agua, tales como sacarosa, otros azúcares y polisacáridos (4 %), Manzur y col., 1997); una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA-900, Rohm and Haas, USA) y anillos de vidrio poroso, cuya función exclusiva es el de soportar el crecimiento del microorganismo, por lo cual fue necesario complementarlos con un medio sintético (MS) conteniendo las fuentes de carbono y nitrógeno. El salvado de trigo y el bagazo de yuca fueron molidos y tamizados entre las mallas 20/40, con el objeto de tener un tamaño de partícula uniforme (partículas de un tamaño promedio de 0.50 mm). El bagazo de caña de azúcar fue previamente lavado (3 veces con agua destilada), para eliminar impurezas presentes (azúcares residuales, tierra, residuos orgánicos, etc.) y posteriormente preparado como el amaranto, el salvado de trigo y el bagazo de yuca. Después cada sustrato fue esterilizado a 121 °C (15 psi) por 15 min.

Tabla 2.- Composición porcentual de los sustratos utilizados (materia seca como base).

Substrato	amaranto §	bagazo de yuca †	salvado de trigo
Proteína	15.6	2.3	16.1
Almidón	62	63.6	63.8
Azúcares reductores	no reportado	0.24	no reportado
Fibra	15.7	8.33	
Grasa	6.3	0.65	2.8
Cenizas	3.7	0.83	3.6
Referencia	Teutonico, Knorr (1985)	Cereda (1994)	Pyler (1973)

§ El amaranto fue obtenido de un particular originario de Tulyehualco (México, D.F.).

† El bagazo de yuca se obtuvo de la compañía Lorenz S.A. (Paraná-Brazil).

La amberlita es una resina de intercambio iónico (Tipo: IRA-900), compuesta por dos polímeros: estireno (90 %) y polivinil-benceno (10 %); es de forma esférica (diámetro promedio: 0.53 mm) y es inerte para los microorganismos. La resina fue secada a 85 °C durante 48 h. Posteriormente se ajustó el pH a 6 con HCl 1N; utilizando 4 mL de agua destilada por cada gramo de amberlita seca. Se eliminó el exceso de agua y se

amortiguó con una solución amortiguadora de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{KHPO}_4$) a pH 6 (en relación de 2 mL por cada gramo de amberlita húmeda) agitando ésta durante 24 h para alcanzar el pH deseado y se secó a 85 °C durante 24 h (Auria y col., 1990).

Los anillos de vidrio poroso se trituraron en un mortero y se tamizaron entre las mallas de tamaño 10 y 18 *mesh*; para obtener un tamaño de partícula promedio de 0.80 mm. Esto es con el fin de aumentar la superficie de contacto y tener un tamaño de partícula homogéneo. En seguida se realizaron tres lavados con agua destilada, para eliminar impurezas solubles y posibles inhibidores presentes en el material. Se colocaron en agua destilada, se ajustó el pH a 6 (empleando HCl) y se mantuvo en esta solución durante 24 h. Se eliminó el exceso de agua y se secó durante 24 h a 85 °C.

V.1.4.- Medios de cultivo.

El amaranto, el bagazo de yuca y el salvado de trigo, fueron complementados con una solución de oligoelementos, mientras que el bagazo de caña de azúcar, la amberlita IRA 900 y los anillos de vidrio poroso fueron embebidos con un medio sintético previamente optimizado para medio líquido por Christen y Raimbault (1991), con alta concentración de glucosa. La composición de este medio es la siguiente: glucosa (200 g/L), urea (7.6 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (18 g/L), KH_2PO_4 (4 g/L), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (4 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (3 g/L). La solución de oligoelementos fue: $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (723.8 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (439.8 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (203 mg/L). Ciertos aminoácidos han sido reportados como una fuente de precursores para la sobreproducción de metabolitos aromatizantes (Spinnler y col., 1991; Fabre y col., 1996). Con el objeto de observar su influencia sobre el crecimiento y perfil de aroma generado por *C. fimbriata*. Se decidió probar los siguientes aminoácidos: arginina, fenilalanina, histidina, lisina, metionina, treonina y triptofano. La urea también fue probada como precursor de aromas. Estos compuestos fueron adicionados a una concentración de 166.5 mM, mientras que la leucina (Leu) y la valina (Val) fueron empleadas a concentraciones de 1.1 a 166.5 mM. Los diferentes medios de cultivo estudiados están representados en la Tabla 3 y 4.

V.1.5.- Técnicas de cultivo usadas para la FES.

La FES se realizó en dos etapas. En la primera etapa se implementaron experimentos en matraces Erlenmeyer con la finalidad de: a) desarrollar la metodología para la cuantificación de los metabolitos volátiles producidos en la fase gaseosa (FG) de los cultivos y b) realizar una evaluación rápida y sencilla de la influencia de algunas condiciones ambientales, como de la naturaleza del soporte y del

soporte sustrato y de la adición de compuestos precursores, sobre el crecimiento y perfil aromático generado por *C. fimbriata*.

En una segunda etapa los ensayos se realizaron en un sistema provisto de columnas (como se describe más adelante), con el fin de estudiar: a) la influencia de la tasa de aereación sobre el crecimiento y producción de aromas por el hongo, y b) realizar un balance global del crecimiento (producción total de CO₂) y de la producción total de compuestos volátiles por *C. fimbriata*.

V.1.5.1.- Experimentos en matraces Erlenmeyer.

Los experimentos inicialmente fueron realizados en matraces Erlenmeyer (500 mL) cubiertos con seis capas de gasa. La aereación se hizo por difusión pasiva a través de la gasa. En éstos se colocaron 15 g de materia seca de soporte (gMS) (Figura 1), y se trabajó bajo las siguientes condiciones iniciales: pH: 6, temperatura: 30 °C, concentración de inóculo: 1 x 10⁷ esporas/g MS. El contenido de agua inicial fue calculado de acuerdo a la capacidad de máxima absorción de agua de cada soporte (amaranto: 65 % (p/p); bagazo de caña de azúcar: 63 % (p/p); bagazo de yuca: 65 % (p/p); salvado de trigo: 50 % (p/p); amberlita: 61 % (p/p); anillos de vidrio poroso: 58 % (p/p)). Para cada experimento se usaron dos matraces que fueron sepervisados periódicamente. Uno de ellos para evaluación sensorial y el otro para cuantificar la producción de CO₂ y compuestos volátiles de la FG de los cultivos durante la fermentación. Un experimento (corrida #4) fue reproducido en tres ocasiones en un periodo de cuatro meses para evaluar la repetibilidad del proceso. Las diferentes combinaciones probadas están dadas en la Tabla 3.

V.1.5.2.- Experimentos en columnas.

Se empleó un dispositivo provisto de columnas descritas por Raimbault y col., (1980). Dichas columnas, una vez empacadas con 8 g MS, fueron colocadas en un baño de temperatura controlada a 30 °C, y alimentadas con un flujo de aire suministrado por una bomba. El aire, previamente saturado con agua en un prehumidificador, fue enviado a un humidificador situado abajo de la columna. El flujo que está alimentado a las columnas esta regulado con válvulas de alta precisión (Figura 3). Los flujos manejados fueron: 0.05 L y 0.005 L aire/g MS. Para todos los ensayos, las condiciones iniciales, el sistema de evaluación sensorial, de compuestos volátiles y CO₂, fueon similares a los experimentos en matraces, previamente descritos. Los cultivos estudiados se encuentran indicados en la Tabla 4.

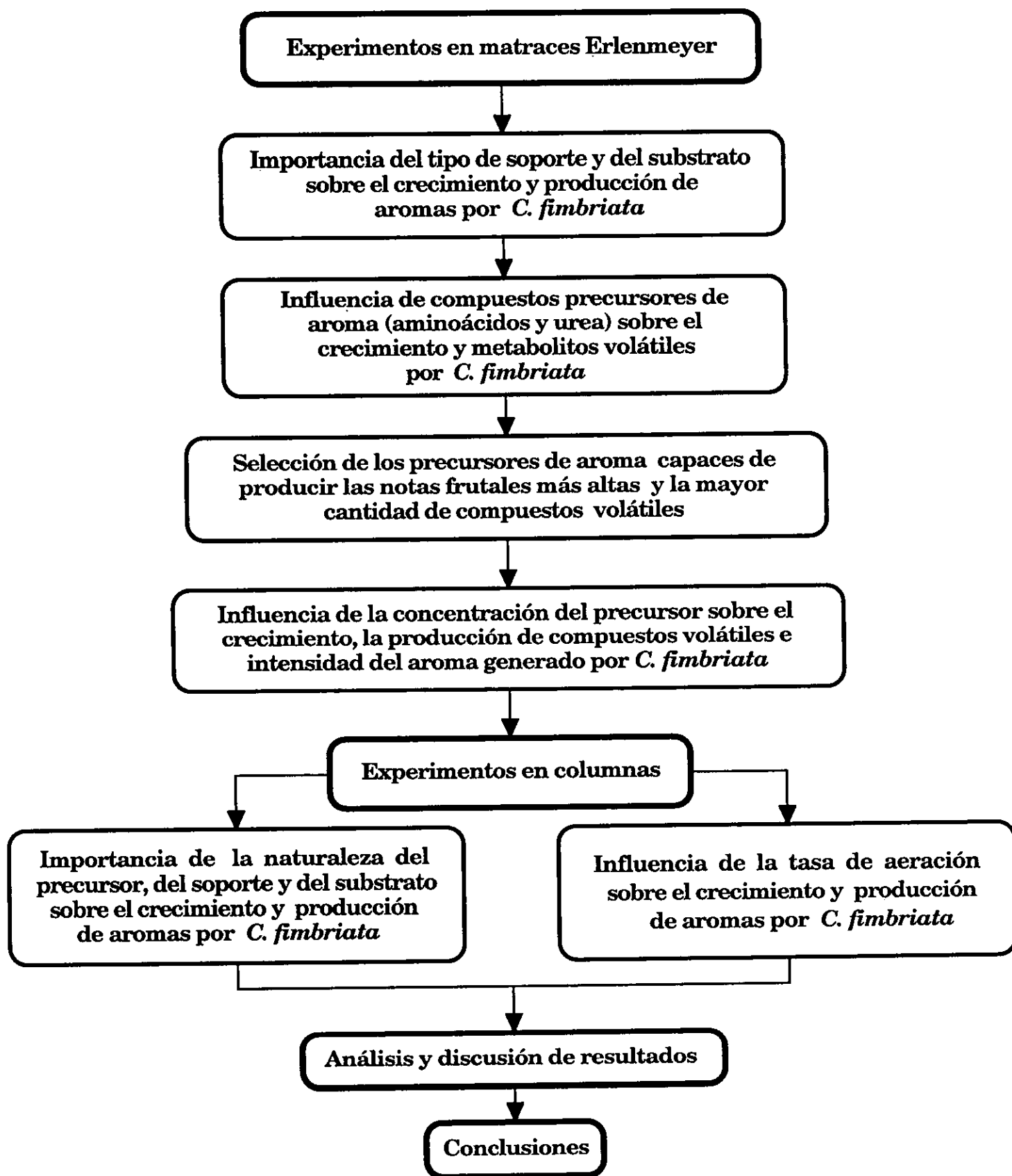


Figura 1.- Diagrama de flujo del trabajo experimental.

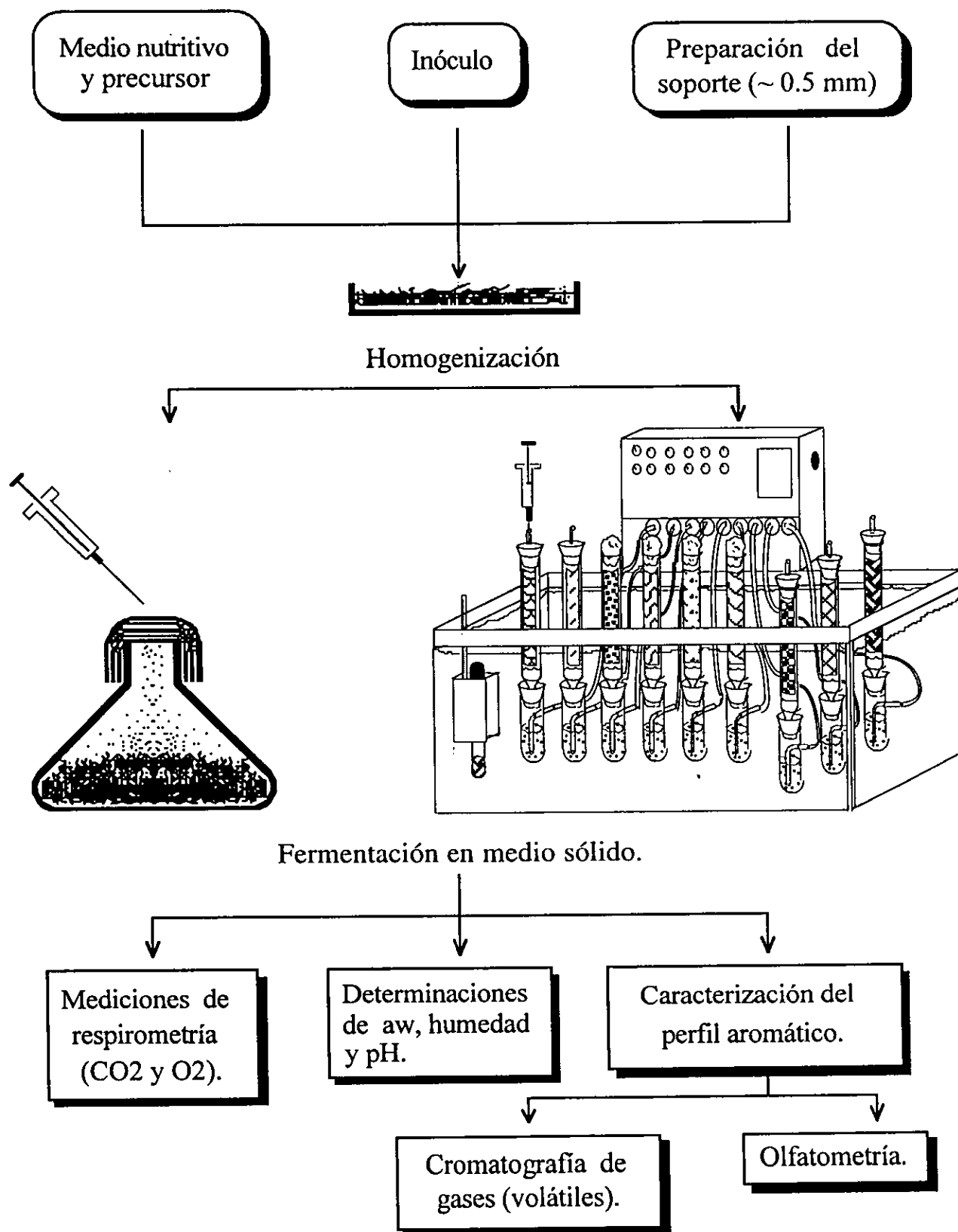


Figura 2.- Diagrama de flujo del sistema experimental de fermentación sólida en matraces Erlenmeyer.

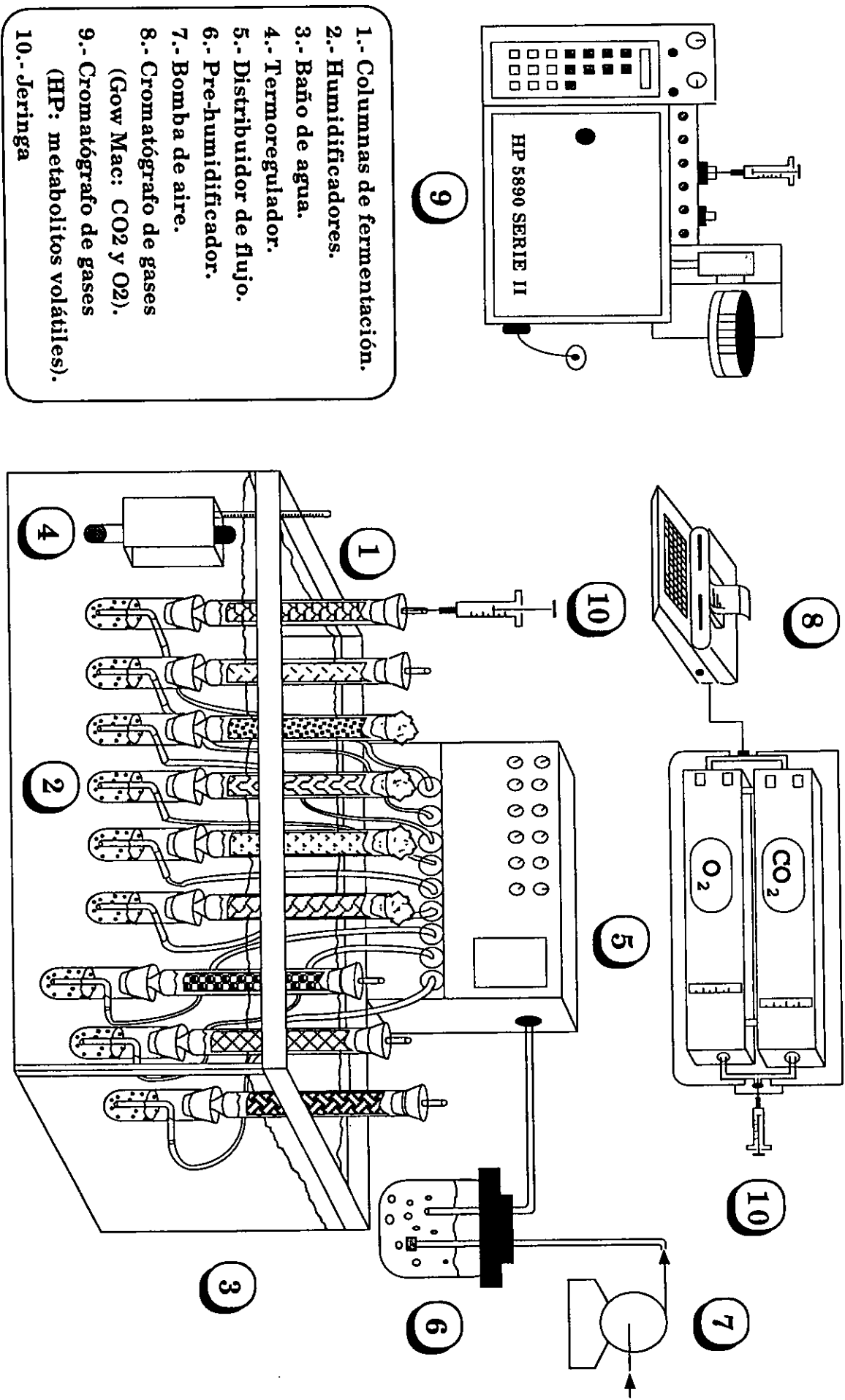


Fig.3.- Dispositivo experimental de la fermentación en medio sólido.

Tabla 3.- Condiciones de cultivo para los experimentos realizados sin aereación forzada en matraces Erlenmeyer.

Corrida #	Substrato/ Medio nutritivo	Complemento
1	Salvado de trigo	-
2	Salvado de trigo	Leucina
3	Salvado de trigo	Urea
4	Bagazo de yuca	-
5	Bagazo de yuca	Leucina
6	Bagazo de yuca	Urea
7	Bagazo de yuca	Valina
8	Bagazo de caña de azúcar + MS *	-
9	Bagazo de caña de azúcar + MS *	Leucina

* MS: medio sintético.

Tabla 4.- Condiciones de cultivo para los experimentos realizados con aereación forzada en un dispositivo provisto de columnas.

Corrida #	Substrato / Medio nutritivo	Complemento	Velocidad de aereación (mL/h · gMS)
10	Amberlita + caldo de papa	-	50
11	Amberlita + caldo de papa	-	5
12	Amberlita + MS	-	5
13	Anillos de vidrio poroso + caldo de papa	-	50
14	Anillos de vidrio poroso + caldo de papa	-	5
15	Anillos de vidrio poroso + MS	-	5
16	Amaranto	-	5
17	Amaranto	Valina	5
18	Amaranto + Bagazo de yuca (1:1)	-	5
19	Amaranto + Bagazo de yuca (1:1)	Valina	5
20	Bagazo de caña de azúcar + MS	-	5
21	Bagazo de caña de azúcar + Caldo de papa + glucosa	-	5
22	Bagazo de yuca	-	5
23	Bagazo de yuca	Valina	5

Tabla 4.- Condiciones de cultivo para los experimentos realizados con aereación forzada en un dispositivo provisto de columnas (Continuación).

Corrida #	Substrato / Medio nutritivo	Complemento	Velocidad de aereación (mL/h · gMS)
24	Salvado de trigo	-	5
25	Salvado de trigo	Leucina	50
26	Salvado de trigo	Leucina	5
27	Salvado de trigo	Urea	50
28	Salvado de trigo	Urea	5
29	Salvado de trigo	Valina	5

* MS: se refiere al medio sintético optimizado por Christen y Raimbault (1991).

V.2.- METODOS ANALITICOS.

V.2.1.- Medición de pH.

Se tomó 1 g de la muestra y se le adicionaron 25 mL de agua destilada, se homogenizó perfectamente, con un Ultraturax (homogenizador de laboratorio TR-10, con rotor tipo cutter SDT100EN, de velocidad variable hasta 20000 rpm., Janke & Kunkel, Kika-Werk) y se midió el pH.

V.2.2.- Determinación de CO₂ y O₂.

El crecimiento del hongo fue caracterizado de manera indirecta por respirometría. Se midió el consumo de O₂ y la producción de CO₂ en la FG de los cultivos (Desgranges y col., 1991; Mitchell, 1992) por cromatografía de gases, en un equipo Gow Mac, equipado con un detector de conductividad térmica y operado bajo las siguientes condiciones: columna concéntrica: CTR1 (Alltech, USA), temperatura de horno: 25 °C, temperatura del inyector y detector: 50 °C, gas acarreador: helio, flujo del acarreador: 60 mL/min, intensidad de la corriente en el detector: 100 mA. El equipo se calibró con una mezcla de gases (O₂, CO₂ y N₂) conocida y aire. El estándar interno fue el nitrógeno. Las muestras de gas (de 100 µL) son tomadas de la fase gaseosa de los matraces o columnas con los medios de cultivo durante el desarrollo de la fermentación, a varios intervalos de tiempo e inyectadas al cromatógrafo de forma inmediata para su análisis. A partir de los resultados obtenidos se calcula el

porcentaje de CO₂ producido (mL CO₂/100 mL aire) y el O₂ consumido (mL O₂/100 mL aire). El límite de detección del aparato es de 0.05 % CO₂.

A partir de estos datos se calculan la tasa de producción de CO₂ (CDPR) y la tasa de consumo de O₂ (OUR). Únicamente en el caso de los experimentos realizados con aereación forzada en columnas, estos parámetros están definidos por las siguientes fórmulas:

$$\text{OUR} = 100 * (\% \text{ O}_2 \text{ consumido} * F) / P \quad F = \text{gasto de aire en mL/h.}$$
$$\text{CDPR} = 100 * (\% \text{ CO}_2 \text{ producido} * F) / P \quad P = \text{carga de materia seca en g.}$$

V.2.3.- Medición de la humedad relativa de los soportes.

Se toma una muestra de 1 g de soporte del matraz o columna y se lleva a secar a una estufa a 85 °C hasta que alcance su peso constante, se pesa nuevamente y se registra la diferencia de peso entre el peso final e inicial, que en este caso es la humedad relativa del soporte dentro del matraz o de la columna según sea el caso.

V.2.4.- Determinación de actividad de agua (a_w).

Se midió al inicio y final de la fermentación, con el objeto de conocer la variación de este parámetro, el cual puede inducir fuertes limitaciones tanto en el crecimiento como en la producción de volátiles. Se realizó en un sistema Decagón CX-1, equipado con un contenedor de plástico, en donde se coloca la muestra, un ventilador que permite la circulación de aire sobre la superficie de la muestra, para eliminar los gradientes de humedad y temperatura en el sistema y para acelerar el equilibrio en el mismo. El equipo mide la humedad de la fase gaseosa y además consta de un sensor de infrarrojo que mide la temperatura de la superficie de la muestra, simultáneamente con la determinación de a_w.

V.2.5.- Separación, identificación y cuantificación de los volátiles producidos durante la fermentación.

Los aromas fueron caracterizados por evaluación sensorial con un panel no entrenado (compuesto de 6 miembros) y sin restricción de términos descriptivos del aroma detectado. Los volátiles fueron determinados en la FG de los cultivos por cromatografía de gases, empleando un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890, equipado con una columna Megaboro HP-1 (5 m de longitud) y con un detector de ionización de

flama. Las condiciones de operación fueron: temperaturas del inyector y del detector: 210 °C; horno a 40 °C durante 2 minutos y después programada a una velocidad de 40 °C/min hasta alcanzar 150 °C; flujo de nitrógeno de 1.5 mL/min y una relación de split de 1:32. Los compuestos encontrados fueron identificados de acuerdo a su tiempo de retención comparado con su estandar correspondiente, mientras que la concentración de varios de éstos en el "headspace" fue seguida individualmente y conocida a partir de su curva de calibración, expresándola en $\mu\text{mol/L}$. Los volátiles totales producidos fueron expresados como equivalentes de etanol ($\mu\text{mol eq. etanol/L}$). El análisis de la FG de un plátano maduro fue usado como control de aroma y volátiles. Para esto, 20 g de plátano (cortado finamente) fueron colocados en un matraz Erlenmeyer (500 mL) y cubierto con seis capas de gasa. Este fue equilibrado durante 1 h dentro de una estufa a 30 °C.

V.2.6.- Evaluación sensorial de los cultivos.

El aroma de los cultivos fue determinado mediante la técnica de olfatometría ("Sniffing"), sin restricción de términos descriptivos para el panel no entrenado, compuesto por seis miembros. La intensidad del aroma fue calificada como: - nulo, + débil, ++ medio y +++ fuerte. La nota aromática registrada fue obtenida del promedio de respuestas de los seis panelistas.

V.2.7.- Análisis de los datos de CO₂ y volátiles producidos.

Para los experimentos en columnas, el comportamiento cinético de los datos de producción de CO₂ y compuestos volátiles fueron integrados con respecto al tiempo mediante el método del trapecio y ajustados al modelo de Gompertz, previamente usado por Meraz y col (1992), para la producción de ácido láctico sobre yuca. Este modelo sigmoidal describe la evolución de un producto P (CO₂ o volátiles totales (VT), según el caso) con respecto al tiempo, de la siguiente manera:

$$P = P_{max} \cdot \exp[-b \cdot \exp(-k \cdot t)]$$

Donde P_{max} (CO₂ $_{max}$ o VT $_{max}$), es el valor integral máximo para la producción (cuando $t \rightarrow \infty$) expresados $\mu\text{mol/h} \cdot \text{gMS}$. k (h^{-1}) representa una tasa constante de velocidad de producción y b puede ser usada para obtener el tiempo de la velocidad máxima de producción de $t_{max} = (\ln b)/k$. La integración de los datos y la regresión no lineal del modelo de Gompertz para obtener los valores de P_{max} , b y k fueron hechos con el programa Kaleida Graph Program (Abelbeck Software, USA).

VI.- Resultados y Discusión.

VI.1.- Experimentos en matraces Erlenmeyer.

VI.1.1.- Estudio preliminar para determinar la capacidad de crecimiento y producción de aromas de *C. fimbriata* sobre tres soportes; Bagazo de caña de azúcar (BCA), bagazo de yuca (BY) y salvado de trigo (ST).

Este experimento se realizó con el objeto de saber si el microorganismo en cuestión tiene la capacidad de crecer en medio sólido y producir aromas. Se encontró que en los tres soportes el hongo pudo crecer perfectamente, observándose un crecimiento filamentosos interpartícula abundante y una producción importante de CO₂, preferencialmente en BY. (Datos presentados y discutidos más adelante en el punto VI.1.4). En BCA+Medio Sintético (MS) se detectó un aroma frutal de intensidad media, mientras que en BY se encontró uno ligero a plátano. En ST no se percibió ningún olor.

VI.1.2.- Influencia de la naturaleza de los aminoácidos sobre la producción de aromas.

El substrato usado fue salvado de trigo, por que previamente se demostró que con este no promovía la síntesis de aroma y por lo tanto no debía causar interferencia con los precursores estudiados. Se probaron nueve aminoácidos y los resultados son presentados en la Tabla 5.

Tabla 5.- Evaluación sensorial de los aromas detectados en los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de *C. fimbriata* crecido sobre salvado trigo suplementado con aminoácidos.

Aminoácido	#	Arg	Phe	His	Leu	Lys	Met	Thr	Trp	Val
Aroma e	-	-	floral +	-	plátano	agrio +	frutal +	frutal +	floral +	plátano
intensidad *			herbáceo +		+++	rancio +		dulce ++	herbáceo +	+++

*: - nulo, + débil, ++ medio, +++ fuerte ; # control sin ninguna adición.

Arg: Arginina; Phe: fenilalanina; His: Histidina; Leu: Leucina ; Lys: Lisina; Met: Metionina; Thr: Treonina; Trp: Triptofano; Val: Valina.

Como puede observarse se detectó una diversidad de aromas de acuerdo al aminoácido usado. Únicamente la histidina y la arginina no promovieron la producción de aroma. Los aminoácidos aromáticos (triptófano y fenilalanina) dieron la misma nota floral/herbal con una baja intensidad. Los precursores derivados del piruvato (leucina y valina) generaron un fuerte aroma a plátano, logrando su valor máximo después de 2 días de cultivo; mientras que los derivados del aspartato produjeron una nota frutal débil (metionina y treonina) o nota agria/rancia (lisina). Por consiguiente, parece ser que el origen de los aminoácidos adicionados tiene una influencia sobre el aroma detectado. Por otra parte, se encontró que la leucina y la valina fueron los más eficientes para la producción de aromas. La influencia de la concentración de estos dos precursores sobre el crecimiento y producción de compuestos volátiles fue investigada posteriormente.

VI.1.3.- Efecto de la concentración de leucina y valina.

Los resultados positivos obtenidos con leucina y valina nos condujeron a probar diferentes concentraciones de estos aminoácidos de 1.1 a 166.5 mM. El substrato usado en la siguiente parte fue bagazo de yuca, por que éste permitió un mejor crecimiento del hongo que el salvado de trigo. Los resultados de la percepción de aroma están presentados en la Tabla 6.

Tabla 6.- Evaluación del aroma detectado en los cultivos de *C. fimbriata*.

Precursor	-	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Val	Plátano
Concentración (mM)		(1.1)	(41.6)	(166.5)	(1.1)	(41.6)	(166.5)	
Intensidad *	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
T max (h) #	63	61	60	58	71	61	56	-

* : - nulo, + débil, ++ medio, +++ fuerte.

T max: tiempo de máxima percepción de aroma.

El aroma detectado para cada caso fue calificado por el panel como aroma a plátano sin diferencias entre ambos precursores. Este aroma fue registrado con mayor intensidad de acuerdo a la cantidad de precursor adicionada, incrementándose de débil (cuando no fue adicionado el aminoácido) a fuerte para una concentración de 41.6 mM. No se encontró un aumento en la intensidad del aroma cuando se agregó una mayor cantidad del precursor (166.5 mM), probablemente por que los receptores nasales fueron saturados.

Cuando se usaron la leucina (Figura 4B) o la valina (Figura 4C), se incrementó el número de compuestos detectados 18 y 19, respectivamente, contra 10 compuestos presentes en el medio de yuca sin adición de precursor (Figura 4A). Entre los compuestos separados en este caso, se identificaron: acetaldehído, etanol, 2-propanol, acetato de etilo, propionato de etilo, 3-metil butanol (3-MB) y acetato de 3-metil butilo (A-3-MB). Con leucina, la concentración de estos compuestos fue incrementada drásticamente, en especial el etanol, el acetato de etilo, el propionato de etilo, el 3-MB y el A-3-MB. Los dos últimos compuestos fueron los de mayor impacto sobre el aroma a plátano detectado. En este caso, aparecieron también compuestos tales como acetona, 1-butanol y heptanona. A pesar del aroma similar detectado en ambos cultivos, el perfil cromatográfico obtenido con valina es significativamente diferente (Figura 4C). Algunos compuestos como la acetona o el 1-butanol no fueron encontrados, pero otros como el 1-propanol, el 2-metil propanol o el pentanoato de etilo aparecieron. Además, se observó un incremento fuerte en las concentraciones de propionato de etilo, de 3-MB, de 2-hexanone y de 2-hexanol.

La producción acumulada (integrada) de CO₂ y de volátiles fueron correlacionados a la concentración de precursor con una ecuación de saturación de la siguiente manera:

$$P = m_0 + (m_1 \cdot [A] / m_2 + [A])$$

Donde:

P: concentración de CO₂ (L/g MS) o compuestos volátiles (mmol/g MS) acumulados.

A: concentración de aminoácido (leucina o valina) adicionada (mmol/L)

m₀, m₁, m₂ son coeficientes de ajuste.

Esto es presentado en la Figuras 5 y 6 para la producción de CO₂ y volátiles, respectivamente.

Para cada aminoácido, estos coeficientes están dados en la Tabla 7. El ajuste de los datos experimentales con el modelo fue adecuado, como puede ser observado en el coeficiente de correlación (R²). En ambos casos, el crecimiento, indicado por la producción de CO₂, es altamente promovido por la adición de estos compuestos conteniendo nitrógeno. Los mejores resultados fueron obtenidos con leucina, como lo muestran los coeficientes m₁. Este modelo también fue satisfactoriamente aplicado para la producción de compuestos volátiles. Para éste parámetro, se puede observar que la valina promovió mejor la producción que la leucina (ver los coeficientes m₁).

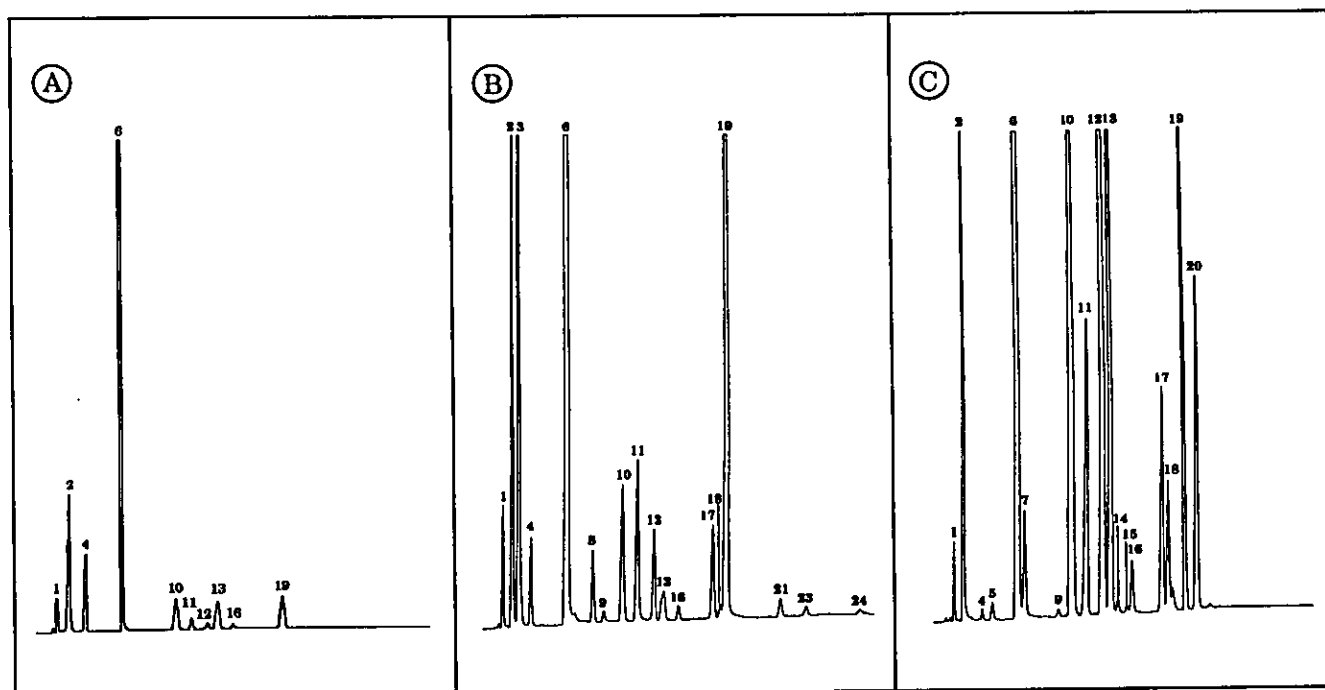


Figura 4.- Cromatogramas de la fase gaseosa (FG) de los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de *C. fimbriata* sobre bagazo de yuca (A), bagazo de yuca + 166.5 mmol/L de leucina (B), bagazo de yuca + 166.5 mmol/L de valina (C). Los compuestos son: (1), acetaldehído; (2), etanol; (3), acetona; (4), 2-propanol; (5), 1-propanol; (6), acetato de etilo; (7), 2-metil propanol; (8), 1-butanol; (9), desconocido; (10), propionato de etilo; (11), 3-metil-1-butanol; (12), 2-hexanona; (13), 2-hexanol; (14), acetato de 2-metil propilo; (15), desconocido; (16), butirato de etilo; (17), 2-heptanona; (18), desconocido; (19), acetato de 3-metil butilo; (20), pentanoato de etilo; (21), 2-octanona; (22), 2-octanol; (23), hexanoato de etilo; (24), desconocido.

Figura 5. Efecto del precursor sobre el CO2 acumulado

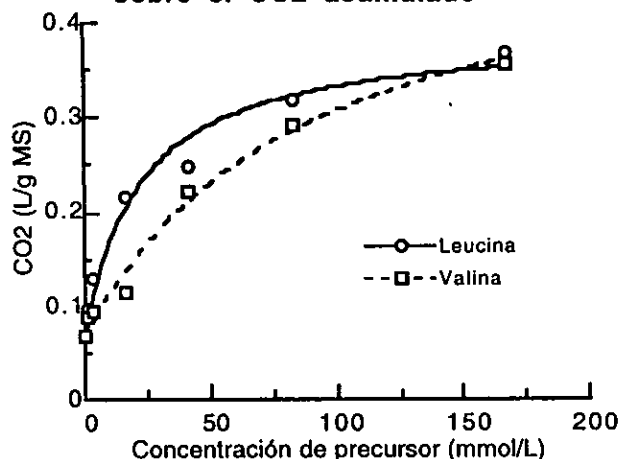


Figura 6. Efecto del precursor sobre los Volátiles totales acumulados

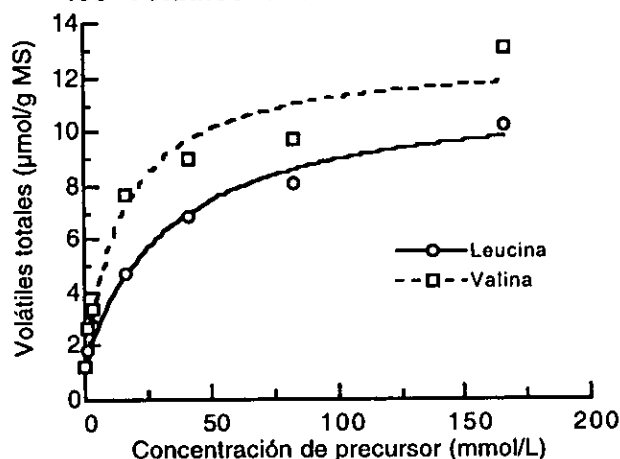


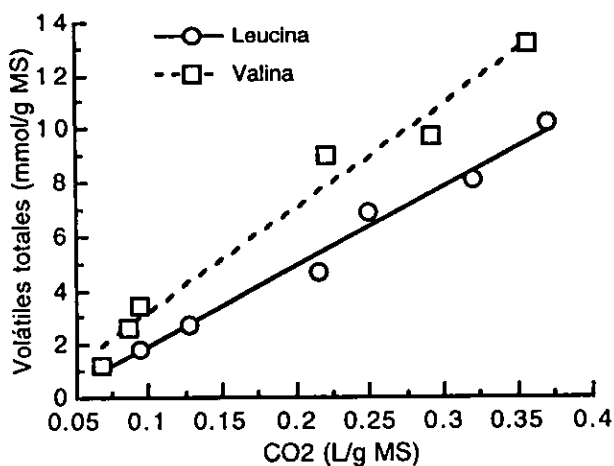
Tabla 7.- Parámetros de ajuste en la ecuación de saturación que describe la relación entre la concentración de aminoácido y la producción de CO₂ y compuestos volátiles.

	producción de CO ₂				producción de volátiles			
	m0	m1	m2	R ²	m0	m1	m2	R ²
Leucina	0.067	0.325	21.8	0.976	1.22	10.31	32.8	0.986
Valina	0.067	0.450	86.7	0.987	1.22	11.60	15.3	0.961

VI.1.4.- Relación entre el crecimiento y la producción de metabolitos volátiles.

Para cada concentración de precursor, el máximo de metabolitos volátiles es graficado contra el máximo de CO₂, y es presentado en la figura 7.

Figura 7. Relación entre la producción de CO₂ y de metabolitos volátiles



Relación lineal existente entre la producción de CO₂ y metabolitos volátiles:

Para leucina:

$$y = -0.97 + 29.3 x \quad (R^2 = 0.986)$$

Para valina:

$$y = -0.65 + 38.5 x \quad (R^2 = 0.975)$$

El valor más alto de la pendiente fue observada para valina, lo cual sugiere que este aminoácido promueve la producción de volátiles 1.3 veces más que la leucina. Lo cual puede ser debido a que la Val puede ser utilizada preferencialmente por el hongo e incorporarla a otras rutas metabólicas que están originando una mayor cantidad de precursores de aroma y por lo tanto se vea reflejado en un incremento en los volátiles totales. Los valores negativos de la abscisa corresponden al hecho de que el ciclo de producción de volátiles comienza después del inicio de la producción de CO₂. La buena correlación entre compuestos volátiles y producción de CO₂ significa que la producción de los primeros puede ser predicha a partir de los datos de producción del segundo. Esto también fue reportado por Börjesson y col. (1990) para una cepa de *Penicillium* crecida sobre sustratos sólidos.

VI.1.5.- Estudios de crecimiento.

El crecimiento fue cuantificado por la evolución del CO₂ en la FG de los matraces, como puede ser observado en las Figuras 8A-D. Para todas las corridas, la evolución de este parámetro fue similar: inicialmente se presentó una etapa de latencia corta (no mayor a 20 h), después la producción de CO₂ se incrementó drásticamente alcanzando su valor máximo entre 40 y 60 horas, y finalmente disminuyó hasta niveles inferiores a los detectables (después de 5 días). En la Figura 8A, se puede observar que el máximo de CO₂ es más alto para los cultivos sobre bagazo de caña de azúcar adicionado con medio sintético, que para los de bagazo de yuca y salvado de trigo usados solos. La adición de una fuente de nitrógeno mejoró la producción de CO₂ para bagazo de caña y de yuca, debido probablemente a limitaciones de nitrógeno en las corridas: 1, 4 y 8, (Figuras 8C-D). En salvado de trigo (Figura 8B), se encontró un mejoramiento en la producción de CO₂ con leucina, pero no con urea, lo cual podría implicar limitaciones de fuente de carbono asimilable.

VI.1.6.- Producción de aroma.

Los aromas detectados por evaluación sensorial son presentados en la Tabla 8. El tiempo de máxima percepción de aroma (T_{max}) coincidió con la máxima actividad respiratoria, reflejado por la producción de CO₂ reportado en las Figuras 8A-D. Cuando se usó el salvado de trigo o el bagazo de yuca sin adición de nitrógeno (corridas: 1 y 4), se detectó un aroma ligero. En los otros casos, se registró un aroma a plátano de intensidad media o fuerte, excepto para salvado de trigo + urea (corrida: 3), donde éste fue un aroma débil a manzana/pera. Estas observaciones sensoriales fueron bien correlacionadas con el máximo de los compuestos volátiles totales detectados por cromatografía de gases (Tabla 8).

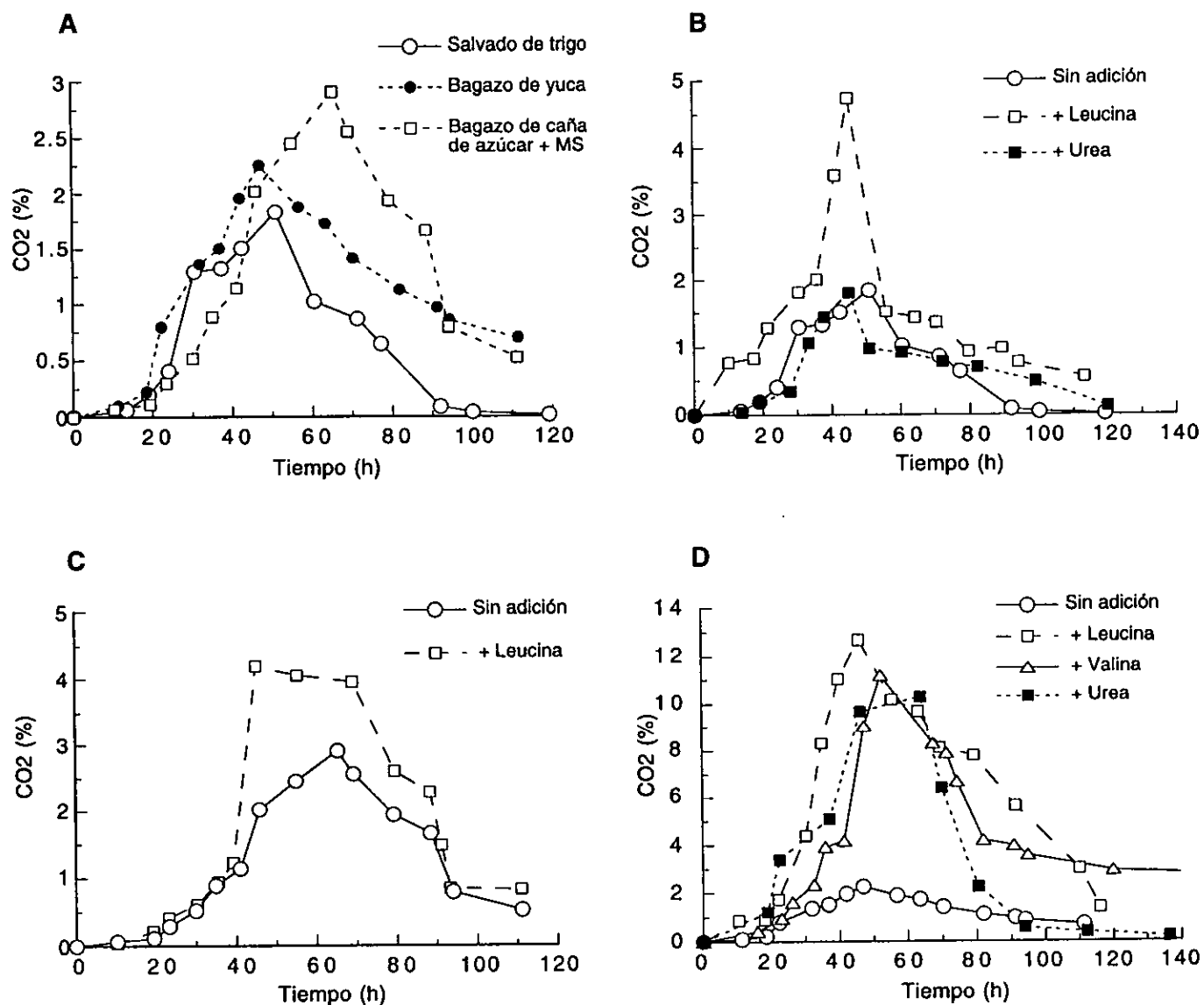


Figura 8.- Evolución de dióxido de carbono en los cultivos en matraces de *Ceratocystis fimbriata*. **A:** comparación de los 3 substratos sin adición, **B:** salvado de trigo, **C:** bagazo de caña de azúcar + medio sintético, **D:** bagazo de yuca.

Las más altas cantidades fueron encontradas cuando se adicionaron a los substratos leucina o valina (corridas: 2, 5, 7, 9). En contraste, la urea no promovió aromas frutales ni producción de volátiles (corridas: 3, 6). Cuando se analizó la FG del plátano maduro, se observó un aroma fuerte de la fruta, aunque los compuestos volátiles totales obtenidos en este caso fueron inferiores a los registrados en los medios modificados con leucina o valina.

Tabla 8.- Comparación del aroma y compuestos volátiles producidos en la FG de los cultivos en matraces de *C. fimbriata* y en el de un plátano maduro (control).

Corrida *	Aroma e intensidad #	T max (h) †	Volátiles totales max (μ mol eq. etanol / L) §
1 : ST	-	-	16.1
2 : ST+Leu	plátano +++	51	319.2
3 : ST+Urea	manzana / pera +	65	27.8
4 : BY	plátano ++	63	46.5
5 : BY+Leu	plátano +++	58	414.3
6 : BY+ Urea	plátano +	63	22.4
7 : BY+Val	plátano +++	56	478.5
8 : BCA+MS	frutal ++	63	44.9
9 : BCA+MS+Leu	plátano +++	45	213.6
Plátano	plátano +++	-	48.4

*: ST: salvado de trigo, BY: bagazo de yuca, BCA: bagazo de caña de azúcar.

#: - nulo, + débil, ++ medio, +++ fuerte.

†: T max: tiempo de máxima percepción de aroma.

§ : μ mol equivalentes de etanol / L

VI.1.7.- Compuestos volátiles producidos por *C. fimbriata*.

Los cromatogramas de gases de los cultivos mostraron un total de 24 compuestos diferentes y 20 de estos fueron identificados por su tiempo de retención (Tabla 9). Los principales grupos de compuestos encontrados fueron alcoholes y ésteres y en menor número, cetonas. Los alcoholes no juegan un papel predominante en los aromas, pero es bien conocido que contribuyen en la calidad de éstos y sobre todo, actúan como precursores de ésteres que confieren notas aromáticas frutales. En microorganismos, tales como levaduras, la biosíntesis de alcoholes diferentes al etanol (alcoholes de fusel), son formados por la reducción de α -cetoácidos, los cuales son derivados del metabolismo de aminoácidos (Fincham y col., 1979; Welsh y col., 1989). De esta manera la leucina y valina, que son sintetizados a partir de piruvato y ácido α -cetoisovalérico (Shuler y Kargi, 1992) promueven la síntesis de los alcoholes correspondientes (2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol). Estos posteriormente pueden ser esterificados con ácido acético para formar el acetato de 2-metil propilo y acetato de 3-metil butilo. Estos ésteres son importantes en aromas frutales y pueden ser producidos a través de dos mecanismos: a) la alcoholisis de compuestos acil-CoA o b) por esterificación directa de

un ácido orgánico con un alcohol. Esta última ruta es específica para hongos (Welsh y col., 1989). El papel del piruvato o la leucina como promotores de la síntesis del acetato de 3-metil butilo y mejoramiento del aroma a plátano, fue también estudiada por Drawert y Berger (1981).

Tabla 9.- Compuestos volátiles identificados en la FG de los cultivos en matraces de 2 días de fermentación de *C. fimbriata* y en el correspondiente de un plátano maduro.

Grupo	Compuesto	Pico N°	N° de Corrida *									Plátano
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Aldehído	Acetaldehído	1	B	M	B	M	A	B	A	B	M	M
Alcoholes	Etanol	2	M	A	A	M	A	M	A	M	A	A
	2-propanol	4	-	B	B	M	M	B	B	B	-	-
	1-propanol	5	-	B	B	-	-	B	B	-	B	B
	1-butanol	8	-	-	-	-	M	-	-	-	-	B
	3-metil butanol	11	-	M	B	B	A	B	A	-	M	B
	2-metil propanol	7	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-
	2-hexanol	13	B	M	B	M	M	B	A	M	B	-
	2-octanol	22	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B
Cetonas	Acetona	3	-	-	-	-	A	-	-	-	B	-
	2-hexanona	12	-	M	B	B	M	B	A	B	M	-
	2-heptanona	17	-	-	-	-	M	-	A	-	B	-
	2-octanona	21	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-
Ésteres	Acetato de etilo	6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	Propionato de etilo	10	M	M	M	M	M	M	A	M	M	B
	Acetato de 2-metil propilo	14	-	-	-	-	-	-	B	-	B	M
	Butirato de etilo	16	-	B	-	B	B	-	M	B	B	B
	Acetato de 3-metil butilo	19	-	M	-	M	H	B	A	-	A	A
	Pentanoato de etilo	20	-	-	M	-	-	-	A	-	-	-
	Hexanoato de etilo	23	-	-	-	-	B	-	-	-	B	-

* 1 : ST; 2 : ST+Leu; 3 : ST+Urea; 4 : BY; 5 : BY+Leu; 6 : BY+ Urea; 7 : BY+Val; 8 : BCA+MS; 9 : BCA+MS+Leu. ST: salvado de trigo; BY: bagazo de yuca; BCA: bagazo de caña de azúcar. A: alto (concentración > 0.8 $\mu\text{mol eq. etanol}\cdot\text{L}^{-1}$), M: medio (0.08 $\mu\text{mol eq. etanol}\cdot\text{L}^{-1}$ < concentración < 0.8 $\mu\text{mol eq. etanol}\cdot\text{L}^{-1}$), B: bajo (concentración < 0.08 $\mu\text{mol eq. ethanol}\cdot\text{L}^{-1}$), -: limite de detección inferior.

En la Tabla 9 se puede observar que varios compuestos (1, 2, 6, 10 y 13) fueron detectados en todos los experimentos, mientras que la presencia de otros en cada cultivo reflejan las variaciones de cada medio y la presencia relativa de estos compuestos específicos es determinada por su presión de vapor. En este sentido, consideramos que el análisis de la FG es menos favorecido para las sustancias menos volátiles. Sin embargo, se encontraron varios patrones consistentes. El 2-hexanol y 2-hexanona fueron detectados en cantidades similares en las corridas 2 a 9. Como fue mencionado arriba, la concentración de los compuestos 11, 16 y 19 fue incrementada con la adición de leucina o valina. Por otra parte, para las corridas que contienen estos precursores, se encontraron más compuestos volátiles y cantidades más altas que en la FG del plátano maduro. Sin embargo, un aroma intenso fue detectado en estos casos, lo cual podría ser debido al registro de una alta concentración de acetato de 3-metil butilo y la presencia de acetato de etilo y acetaldehído en cantidades importantes, aunque globalmente se produjo una baja cantidad de volátiles ($48.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

VI.1.8.- Producción total de compuestos volátiles.

La producción máxima de compuestos volátiles totales y CO_2 ocurre aproximadamente de manera simultánea en cada corrida (Figuras 8 y 9). De manera similar, la producción de volátiles totales se encontró relacionada al crecimiento, resultando ser más alta en bagazo de yuca y bagazo de caña de azúcar + MS, que sobre salvado de trigo (Figura 9A). El valor máximo fue alcanzado entre las 48 y 62 horas, lo cual coincidió con la percepción máxima por "olfatometría". En las Figuras 10B-D y Tabla 8 se observa que para los 3 substratos la adición de leucina o valina, además de promover el crecimiento, mejora grandemente la producción total de volátiles, y en particular de seis compuestos importantes (acetaldehído, etanol, acetato de etilo, propionato de etilo, 3-metil butanol y acetato de 3-metil butilo). El máximo logrado en estos casos fue aproximadamente diez veces superior al encontrado en la fruta.

VI.1.9.- Producción de compuestos volátiles clave.

La evolución de la concentración en la FG fue evaluada para: acetaldehído, etanol, acetato de etilo, propionato de etilo, 3-metil butanol y acetato de 3-metil butilo. Estos seis compuestos fueron seleccionados por que han sido frecuentemente reportados como metabolitos producidos por hongos (Kaminski y col., 1974; Ito y col., 1990; Sunesson y col., 1995) o por levaduras (Piendl y Geiger, 1980). A ellos nos referiremos como compuestos volátiles clave.

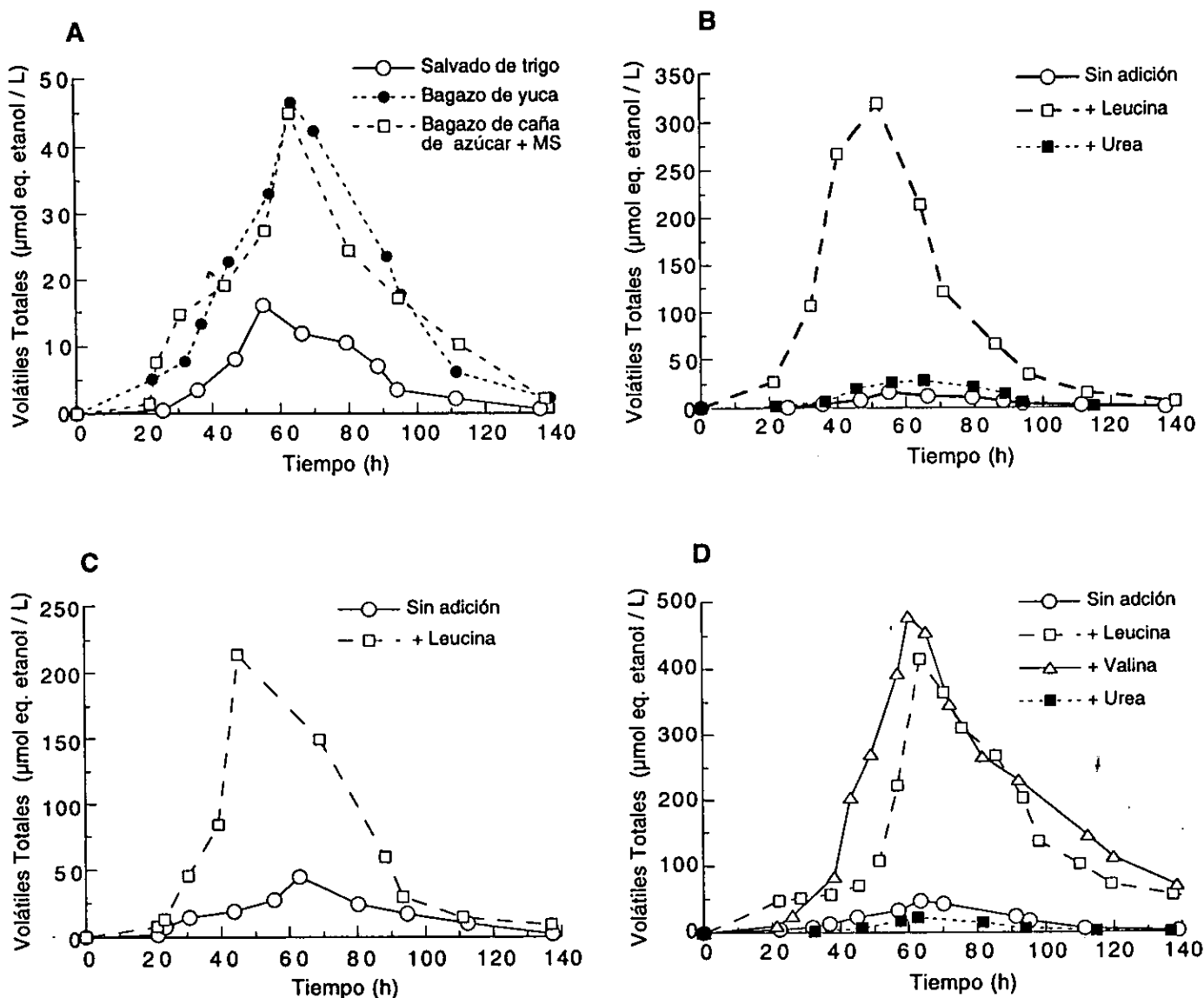


Figura 9.- Evolución de los compuestos volátiles totales en los cultivos en matraces de *Ceratocystis fimbriata*. **A:** comparación de los 3 substratos sin adición, **B:** salvado de trigo, **C:** bagazo de caña de azúcar + medio sintético, **D:** bagazo de yuca.

Por otra parte, estos compuestos fueron generados en la mayoría de los experimentos reportados aquí (Tabla 9) y son bien conocidos por estar involucrados en aromas frutales en general para los primeros cuatro, y particularmente, en el aroma a plátano los otros dos.

VI.1.9.1.- Salvado de trigo (corridas: 1 a 3).

Cuando hubo crecimiento sin suplemento de nitrógeno, únicamente cuatro de los seis compuestos claves fueron detectados : acetaldehído, etanol, acetato de etilo y

propionato de etilo, con valores máximos de $0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $4.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Figura 10A). Cuando se complementó con urea, el cultivo también produjo 3-metil butanol y acetato de 3-metil butilo en concentraciones de $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Figura 10B). La adición de leucina al medio, incrementó fuertemente la concentración de los seis compuestos, especialmente el acetato de etilo ($135 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y el etanol ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). En este caso, el acetato de 3-metil butilo estuvo presente ($2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y la concentración del 3-metil butanol aumento a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 11C). En los tres experimentos, las concentraciones máximas de éstos compuestos se encontraron en tiempos similares (aproximadamente a las 60 horas de fermentación).

VI.1.9.2.- Bagazo de yuca (corridas: 4 a 7).

Para este substrato, se puede observar en la Figura 12A, que los seis compuestos fueron producidos sin ningún suplemento de nitrógeno al medio. Aunque el 3-metil butanol y el acetato de 3-metil butilo fueron detectados en bajos niveles ($0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), se registró un aroma a plátano de intensidad media. Esto es, probablemente, por que en el bagazo de yuca los aminoácidos precursores de este alcohol y este éster se encuentran disponibles para el hongo (Cereda, 1994). Esto es confirmado en el experimento #5, en donde el bagazo de yuca fue complementado con leucina (Figura 12C). En este caso, el olor detectado fue mucho más fuerte (ver Tabla 8) y los seis metabolitos se produjeron en cantidades mucho más altas, alcanzando $132 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para acetato de etilo y $48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para el acetato de 3-metil butilo. Resultados similares se obtuvieron con valina (Figura 11D) y en contraste, la adición de urea al medio no promovió la biosíntesis de estos compuestos (Figura 11B).

VI.1.9.3.- Bagazo de caña de azúcar + medio sintético (corridas: 8 y 9).

De manera similar al salvado de trigo solo, no se encontró en este caso el 3-metil butanol ni su éster de acetato en el cultivo de bagazo de caña sin nitrógeno suplementado (corrida 8 y Figura 12A). Sin embargo, se detectó un aroma frutal, lo cual puede ser debido a la presencia de cantidades relativamente altas de acetato de etilo ($26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), propionato de etilo ($1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y otros compuestos tales como butirato de etilo (Figura 4B). Cuando se agregó leucina, el crecimiento sobre este medio

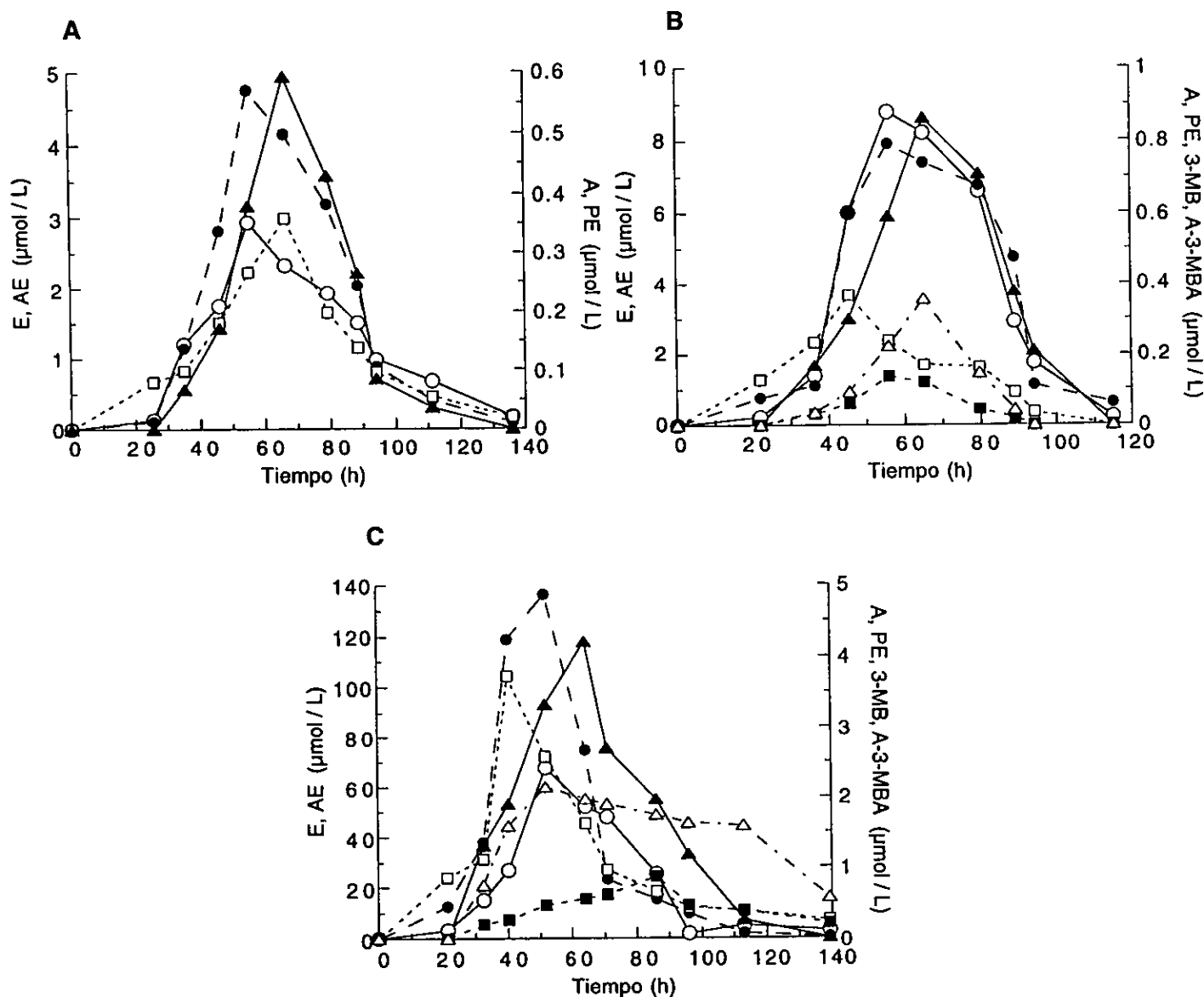


Figura 10.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos en matraces de *Ceratocystis fimbriata* crecido sobre salvado de trigo. **A:** sin adición, **B:** + urea, **C:** + leucina. (○, E) etanol, (●, AE) acetato de etilo, (□, A) acetaldehído, (▲, PE) propionato de etilo, (■, 3-MB) 3-metil butanol, (Δ, A-3-MBA) acetato de 3-metil butilo.

generó un intenso aroma a plátano debido a las altas concentraciones de acetato de etilo ($54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y acetato de 3-metil butilo ($9.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Las concentraciones máximas de los volátiles se presentaron en tiempos similares a los de los substratos: salvado de trigo y bagazo de yuca.

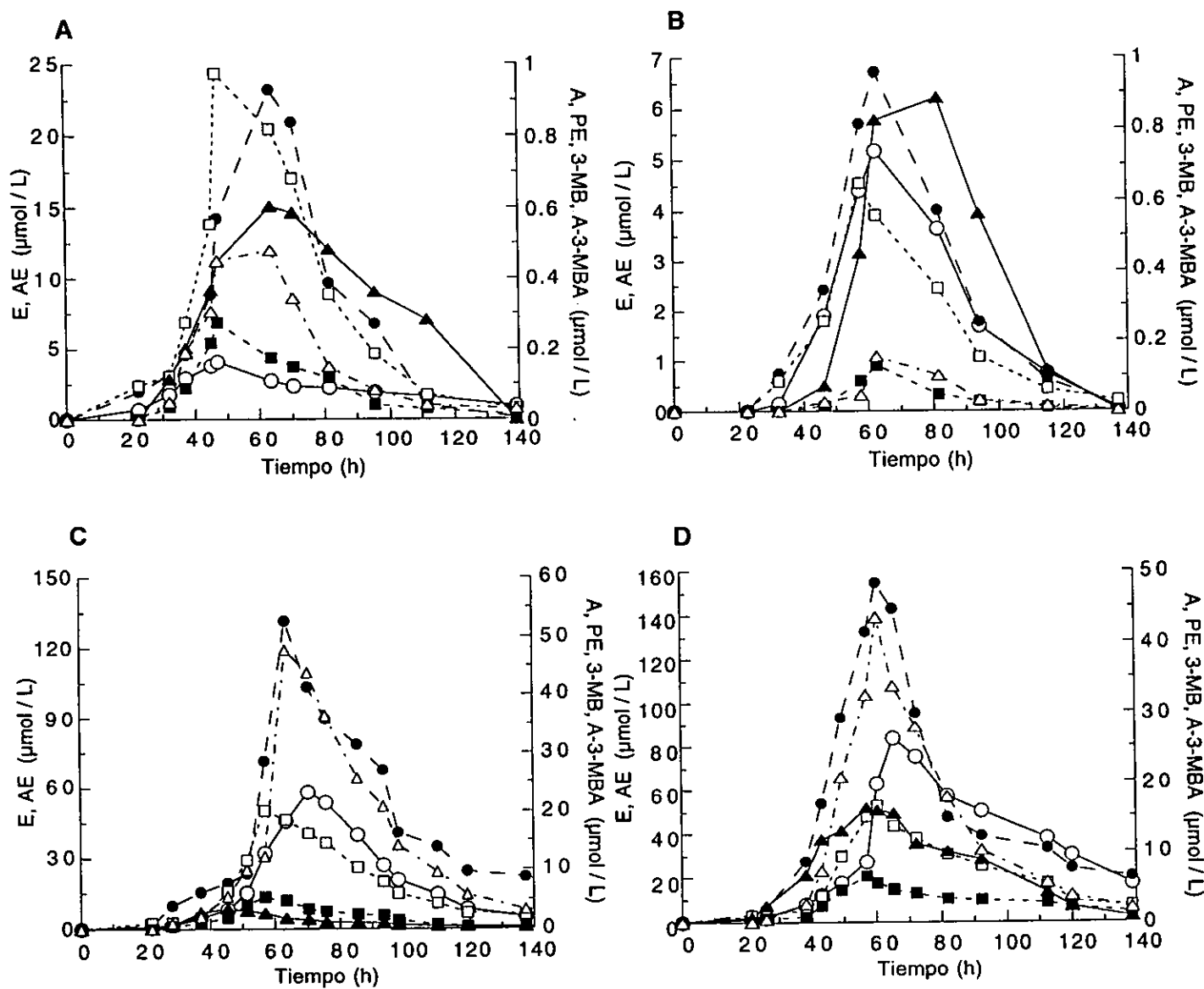


Figura 11.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos en matraces de *Ceratocystis fimbriata* crecido sobre bagazo de yuca. **A:** sin adición, **B:** + urea, **C:** + leucina, **D:** + valina. (○, E) etanol, (●, AE) acetato de etilo, (□, A) acetaldehído, (▲, PE) propionato de etilo, (■, 3-MB) 3-metil butanol, (Δ, A-3-MBA) acetato de 3-metil butilo.

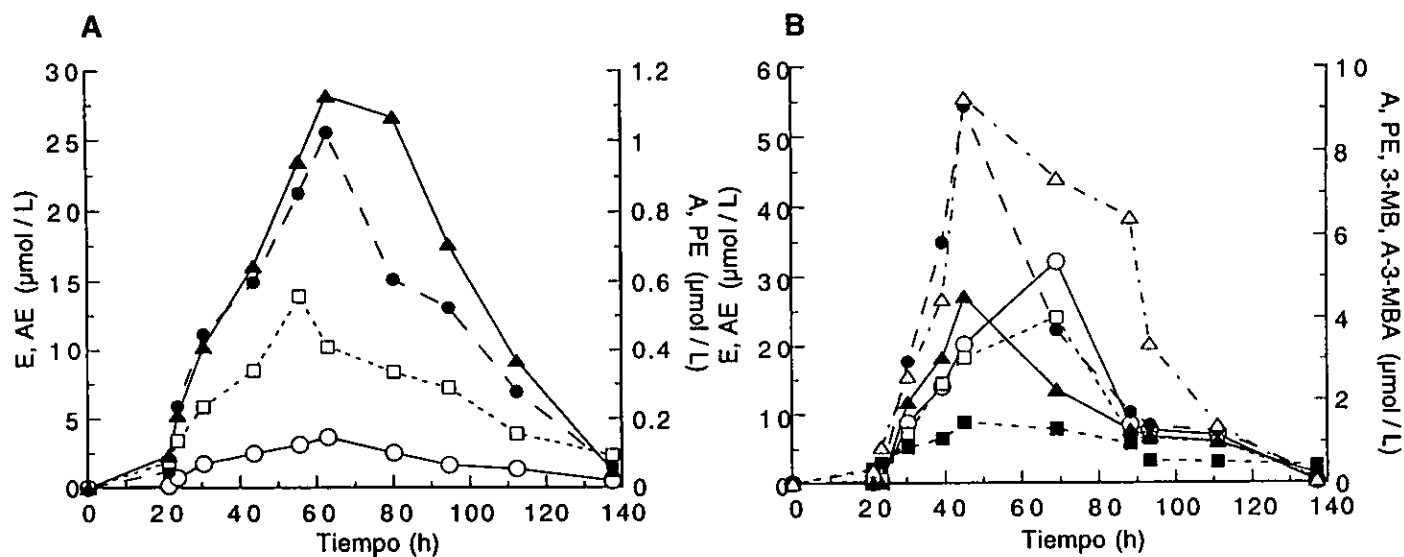


Figura 12.- Evolución de seis compuestos clave en la FG de los cultivos de *Ceratocystis fimbriata* crecido sobre bagazo de caña de azúcar. **A:** sin adición, **B:** + leucina. (○, E) etanol, (●, AE) acetato de etilo, (□, A) acetaldehído, (▲, PE) propionato de etilo, (■, 3-MB) 3-metil butanol, (Δ, A-3-MBA) acetato de 3-metil butilo.

VI.2.- Experimentos de columnas empacadas con aereación forzada.

VI.2.1.- Influencia de la tasa de aereación sobre la producción de aroma y crecimiento del microorganismo.

Todos los soportes substrato (naturales) y la amberlita (sintético) permitieron el crecimiento de *C. fimbriata*, más no así la producción de aroma en condiciones aereadas.

De los resultados presentados en la Tabla 10, se puede observar que a la más alta velocidad de aereación probada (50 mL/h.gMS, en las corridas: 10, 13, 25 y 27), ninguno o un ligero aroma fue detectado. Lo cual puede ser debido a que ocurre de alguna manera un arrastre de los volátiles producidos o que las condiciones de oxigenación reducen la síntesis de tales moléculas. Esto es, por que cuando se uso después una tasa muy baja de aereación (5 mL/h.gMS), se registraron todos los aromas (dulce, frutal, manzana/pera, piña, plátano) a una intensidad mayor (mediana y fuerte). En particular, esto fue mostrado claramente en los ensayos con amaranto, amaranto + bagazo de yuca (corridas: 16 y 18) y cuando el precursor del aroma a plátano (leucina o valina) fue adicionado al medio (corridas: 17, 19, 23, 25, 26 y 29).

Tabla 10.- Resultados de producción de aromas en cultivos con aereación forzada.

Corrida	Aroma e intensidad *	Tmax (h) #	CDPR max ($\mu\text{mol/h}\cdot\text{gMS}$)	Vol. Tot. max (nmol eq. etanol / h·gMS) §	a _w final	pH final
10	-	-	2.58	-	0.996	6.76
11	pera/manzana +	67	0.95	-	0.973	3.05
12	-	-	0.89	-	0.990	2.65
13	-	-	-	-	0.924	7.37
14	-	-	0.38	-	0.946	7.92
15	-	-	0.19	-	0.938	7.72
16	plátano +++ piña +++ frutal ácido +++	24	8.70	864.9	0.986	6.33
17	plátano +++ piña +++ frutal dulce +++	29	11.31	995.7	0.977	3.88
18	plátano +++ piña fermentada +++ frutal dulce +++	29	12.41	452.1	0.977	5.97
19	plátano +++ piña fermentada +++ frutal dulce +++	29	11.33	962.7	0.998	4.69
20	frutal ++	30	5.04	-	0.993	2.71
21	pera / manzana ++, frutal ++	68	4.20	-	0.998	6.24
22	plátano +	48	11.64	9.84	0.996	3.31
23	plátano +++ melón +++	48	15.07	647.5	0.998	3.15
24	pera / manzana + frutal dulce +	48	1.93	12.7	0.997	8.64
25	plátano +	42	10.08	-	0.998	8.95
26	plátano +++	47	4.32	-	0.989	9.03
27	pera / manzana +	42	2.45	-	0.983	8.76
28	pera / manzana ++	39	1.84	-	0.985	8.95
29	plátano +++ frutal dulce ++	48	11.86	45.7	0.997	8.72

* : - nulo, + débil, ++ medio, +++ fuerte. # T max: tiempo de máxima percepción de aroma.

§ : nmol equivalentes de etanol / h · gMS

Los olores frutales aparecieron muy rápidamente en todos los casos (entre 24 y 68 hr) siendo éstos tiempos muy similares a los de los experimentos en matraces sin aereación forzada. Cuando no fue usado el precursor, se encontró un aroma a manzana/pera, según se observa en la Tabla 10 (corridas: 20, 21, 24, 27 y 28).

VI.2.2.- Efecto de la naturaleza del soporte y del medio nutritivo sobre la producción de aroma y crecimiento del hongo.

En términos de la evaluación del soporte; el amaranto, el bagazo de yuca y su combinación (suplementados o no), y el bagazo de caña de azúcar complementado con medio sintético dieron mejores resultados que el salvado de trigo y amberlita, mientras que en anillos de vidrio poroso no se encontró crecimiento del hongo. En todos los casos a excepción de los anillos de vidrio poroso, la actividad de agua (a_w) se mantuvo en niveles satisfactorios, pero algunas veces el pH al final de la fermentación fue ácido para amaranto, bagazo de yuca y de caña de azúcar y otras alcalino para salvado de trigo.

La percepción máxima de aroma fue detectada, justo a pocas horas antes o después de la máxima velocidad de producción de CO_2 , encontrando de esta manera que la producción de aroma está relacionada al crecimiento de *C. fimbriata*.

VI.2.2.1.- Estudios de crecimiento.

En todos los casos, la máxima actividad respiratoria, representada por la CDPR (velocidad de producción de dióxido de carbono), fue observada entre las 24 y 68 horas de fermentación. La evolución de este parámetro en todas las corridas fue similar y su comportamiento muy semejante al encontrado en los experimentos en matraces (Figura 8). En la Tabla 10, se puede observar que el CDPR max fue más alto para el cultivo sobre amaranto + bagazo de yuca que para cada uno de ellos usados solos. En salvado de trigo solo el crecimiento observado fue mínimo. La adición de una fuente de nitrógeno como la leucina o valina en la mayoría de los casos (corridas: 17, 23, 26 y 29) mejoró la producción de CO_2 , debido probablemente a limitaciones de nitrógeno en estos medios. La urea probada en el salvado de trigo no manifestó el efecto anterior, lo cual podría implicar una limitación en fuentes de carbono de fácil asimilación. En la Tabla 11 se presentan los parámetros de modelamiento de los datos integrados de producción de CO_2 expresados como CDPR. El modelo describe adecuadamente el comportamiento de los datos en todos los casos, como lo demuestran los valores de los coeficientes de correlación (R^2) mayores de 0.970. Los valores de P_{max} ($CDPR_{max}$)

confirmaron la influencia del tipo de sustrato y de la adición de un aminoácido precursor de aroma como la valina. Por ejemplo, se puede observar que la producción de CO₂ fue más baja sobre salvado de trigo (ST) que en bagazo de yuca (BY) y amaranto (Am), mientras que la combinación amaranto + bagazo de yuca (Am + BY) favoreció el mayor crecimiento del hongo, alcanzando una producción de CO₂ de más de 10 veces de la registrada en ST (corridas: 16, 18, 22 y 24). La adición de una fuente de nitrógeno como la valina en la mayoría de los casos (exceptuando la mezcla Am + BY) mejoró la producción de CO₂ y en particular en ST (más de seis veces; corrida: 29; Tabla 10). Los valores de las velocidades de producción (k , Tabla 11) fueron comparables, estando todos entre 0.011 h⁻¹ y 0.026 h⁻¹ pero no se pudo observar una tendencia clara en relación al medio empleado en cada caso. No existe una relación aparente entre este parámetro y la cantidad de CO₂ producido caracterizado por $CDPR_{max}$. Los valores de t_{max} calculados son muy cercanos a los observados experimentalmente. Estos valores se encuentran entre 49.7 y 104 h y parecen ser influenciados por el medio usado.

Tabla 11.- Constantes cinéticas para la producción de CO₂ de acuerdo al modelo de Gompertz.

Corrida*	$CDPR_{max}$ ($\mu\text{mol/gMS}$)	b	k (h ⁻¹)	t_{max} (h)	R ²
16 : Am	1018.9	3.68	0.023	56.6	0.997
17 : Am+Val	965.3	3.16	0.019	60.5	0.980
18 : Am+BY	1817.5	3.68	0.015	86.8	0.995
19 : Am+BY+Val	1505.9	3.14	0.011	104.0	0.993
22 : BY	955.9	2.85	0.015	69.8	0.972
23 : BY+Val	1117.6	3.64	0.026	49.7	0.995
24 : ST	177.1	2.68	0.011	89.6	0.981
29 : ST+Val	471.3	4.54	0.024	63.0	0.987

* : Am : amaranto; BY : bagazo de yuca; ST: salvado de trigo.
aeración : 5 mL/h.gMS

VI.2.2.2.- Producción de aroma.

Los aromas detectados por olfatometría también están representados en la Tabla 10. Los periodos de mayor percepción (t_{max}) se encontraron en la mayoría de los casos a pocas horas después del tiempo de máximo crecimiento calculado con el modelo de Gompertz (Tabla 11). Cuando el ST o BY fueron usados sin fuente de

nitrógeno adicionada (corrida: 22 y 24), se percibieron notas débiles a manzana/pera y plátano, respectivamente mientras que en Am y en Am+BY (corrida: 16 y 18) se registraron diversos aromas intensos (plátano, piña y frutal). La adición de valina como fuente de nitrógeno al medio mejoró notablemente como en los experimentos en matraces la producción de aromas, no así la suplementación del soporte con urea. La adición de este precursor a los soportes Am y Am+BY no incrementó el aroma de manera evidente (corridas: 17 y 19), posiblemente por la saturación de las papilas olfativas. Sin embargo, estas observaciones sensoriales y el efecto de este precursor fue bien correlacionado con las concentraciones máximas de los compuestos volátiles totales detectados por CG (Tabla 12). Las cantidades más altas de estos compuestos fueron encontrados cuando se complementaron los medios con valina (corridas: 17, 19, 23 y 29). La urea no promovió la producción de aromas frutales ni de metabolitos volátiles (corridas: 27 y 28), dando el mismo efecto que en el sistema de matraces.

VI.2.2.3.- Compuestos volátiles producidos.

En los cromatogramas de los cultivos, de manera similar a los ensayos en matraces, se encontró un total de 24 compuestos diferentes en las corridas en las cuales se utilizó la taza de aereación de 5 mL/h.gMS (16 a 19, 22, 23, 24 y 29), mientras que en la taza de 50 mL/h.gMS no se pudo determinar ningún compuesto, debido probablemente a un arrastre excesivo de estos compuestos o que bajo estas condiciones de oxigenación se interfirió con la síntesis de los correspondientes metabolitos. Veinte de éstos fueron identificados por CG (8 alcoholes, 1 aldehído, 7 ésteres y 4 cetonas) y están enlistados en la Tabla 12.

Los principales grupos de compuestos encontrados fueron alcoholes, ésteres y en menor cantidad, cetonas. De la Tabla 12, podemos observar que varios compuestos (1, 6, 10, 12, 14 y 20) fueron detectados en todas las corridas. La presencia de los diferentes compuestos en la FG depende de su concentración en el medio sólido, de su presión de vapor y de la velocidad de aereación en el sistema pues como ya se mencionó previamente, en los experimentos con aereación alta (50 mL/h.gMS) no se pudo detectar ningún compuesto, por un posible arrastre de éstos metabolitos. La concentración de los compuestos 1, 2, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 17 y 19 fue incrementada con la adición de valina. Además, las corridas que contenían este precursor (corridas: 17, 19, 23 y 29) presentaron más compuestos volátiles y en concentraciones superiores a las encontradas en el plátano maduro (control).

Tabla 12.- Compuestos volátiles identificados en la FG de los cultivos de 2 días de fermentación de *C. fimbriata* suplementados con valina y con una aereación de 5 mL/h·gMS).

Grupo	Compuesto	Pico N°	N° de Corrida *								P (plátano)
			16	17	18	19	22	23	24	29	
Aldehído	Acetaldehído	1	M	M	M	M	B	M	-	B	M
Alcoholes	Etanol	2	A	A	A	A	B	A	B	M	A
	2-propanol	4	B	-	M	B	-	M	-	B	-
	1-propanol	5	B	M	-	B	-	B	-	-	B
	2-metil-1-propanol	7	B	M	B	M	B	M	-	-	-
	1-butanol	8	-	-	-	B	-	B	-	-	B
	3-metil-1-butanol	11	M	M	B	M	-	-	-	-	B
	2-hexanol	13	-	-	M	-	-	-	-	-	-
	2-heptanol	20	-	B	-	M	-	M	B	-	-
2-octanol	23	-	-	-	-	-	-	-	-	B	
Cetonas	Acetona	3	B	-	B	M	-	-	-	-	-
	2-hexanona	12	B	A	M	A	B	A	B	B	-
	2-heptanona	17	M	M	B	M	-	M	B	B	-
	2-octanona	22	-	-	-	B	-	-	-	-	-
Esteres	Acetato de etilo	6	A	A	A	A	B	A	M	M	A
	Propionato de etilo	10	M	A	M	A	B	A	B	M	B
	Acetato de 2-metil propilo	14	M	M	B	M	B	A	B	M	M
	Butirato de etilo	16	B	M	B	M	-	B	-	B	B
	Acetato de 3-metil butilo	19	B	M	B	M	B	A	-	B	A
	Pentanoato de etilo	21	B	B	B	M	B	A	B	B	-
	Hexanoato de etilo	24	B	B	B	-	-	B	-	B	-

* : 16 : amaranto; 17 : amaranto+Val; 18 : amaranto+bagazo de yuca;
 19 : amaranto+bagazo de yuca+Val; 22 : bagazo de yuca; 23 : bagazo de yuca+Val;
 24 : salvado de trigo; 29 : salvado de trigo+Val.

A: alto (concentración > 40 nmol eq. etanol · hgMS⁻¹), M: medio (40 nmol eq. etanol · hgMS⁻¹ < concentración < 4 nmol eq. etanol · hgMS⁻¹), B: bajo (concentración < 4 nmol eq. etanol · hgMS⁻¹), -: límite de detección inferior. P: plátano (control).

VI.2.2.4.- Producción de compuestos volátiles totales.

La producción de compuestos volátiles fue similar al crecimiento, representado por el CDPR, la cual fue en amaranto 3, 114 y 116 veces mayor que la alcanzada en amaranto + bagazo de yuca, bagazo de yuca y salvado de trigo respectivamente (Tabla 13). La máxima fue alcanzada entre las 46 y 113 horas de fermentación (79 h en promedio) en tanto que la máxima percepción de aroma por olfatometría se detectó en promedio a las 46 h (Tabla 10). Este ligero desfaseamiento, pudo deberse a que no todos los metabolitos volátiles cuantificados e incluidos en los volátiles totales contribuyen de la misma forma en el aroma registrado. De hecho, algunos de ellos no tienen un olor o nota característica (inodoros) mientras que otros presentan un umbral de reconocimiento muy bajo.

Los parámetros del modelamiento de la producción de volátiles totales están reportados en la Tabla 13. El modelo también fue adecuado para describir los datos integrados de la producción de compuestos volátiles, como puede apreciarse en los coeficientes R^2 . El soporte más adecuado para la producción de Vol. tot. max fue amaranto solo (corrida: 16, Tabla 13), logrando alcanzar 3, 114 y 116 veces más que el obtenido en Am+BY (corrida: 18), BY (corrida: 22) y ST (corrida: 24), respectivamente. La adición de valina a los diferentes medios (corridas: 17, 19, 23 y 29) incrementó de manera importante en la mayoría de los casos la producción de volátiles totales expresada como Vol. tot. max, alcanzando valores hasta de 14 veces más respecto al mismo substrato utilizado como control (corridas: 16, 18, 22 y 24). La constante de velocidad de producción (k) varió de 0.014 a 0.109, sin poderse observar una tendencia clara de acuerdo al medio empleado. Los parámetros de t_{max} son muy similares a los observados experimentalmente.

VI.2.2.5.- Tipo de metabolitos volátiles producidos.

VI.2.2.5.1.- Alcoholes.

Dependiendo del tipo de substrato se logró una cierta cantidad de esta clase de compuestos. Se alcanzó la mayor producción de alcoholes (Alcoholes *max*, Tabla 14) en amaranto (corrida: 16), representando este valor, 16, 385 y 334 veces más del valor obtenido en amaranto+bagazo de yuca, bagazo de yuca y salvado de trigo (corrida: 18, 22 y 24) respectivamente. En el caso de amaranto, el valor máximo de alcoholes correspondió a un 80% de los volátiles totales mientras que en el resto de los casos varió entre 16 y 28 %. La adición de valina al medio en todos los cultivos incrementó la

producción de alcoholes; encontrándose de manera más notoria en amaranto+bagazo de yuca (11 veces más, corrida: 19) y en bagazo de yuca (6.5 veces más, corrida: 23). Esto puede justificarse en términos de la composición de nutrientes de los distintos soportes. Por ejemplo, el amaranto es un substrato muy rico en nutrientes (Tabla 2), principalmente en proteínas de una calidad importante (básicamente por contener de manera importante los aminoácidos ramificados: leucina y valina y a precursores de alcoholes superiores), por lo cual induce un crecimiento significativo de *C. fimbriata*, alcanzando casi la máxima producción de alcoholes en este medio. La adición de valina al cultivo mejora muy ligeramente la producción de este grupo de compuestos. Por el otro lado, en salvado de trigo como se encontró en los cultivos estáticos (sistema de matraces), parece existir limitaciones en fuente de carbono, por lo cual la mayoría de la valina adicionada la ocupa para suprimir esta limitación y crecer, más que para la producción de volátiles totales y en especial de alcoholes. Por ésto solo se observa un ligero aumento (1.44 veces más) en la cantidad de este tipo de metabolitos cuando se adiciona valina al cultivo (corrida: 29). En el caso de los experimentos Am+BY+Val (corrida: 19) y BY+Val (corrida: 23) se detectó el incremento más importante en alcoholes. El soporte/substrato por su adecuada composición satisface principalmente los requerimientos nutricionales para el crecimiento del hongo, y además provee compuestos precursores (aminoácidos, azúcares, etc.) para la generación de metabolitos volátiles como los alcoholes. En términos generales, al cubrir el soporte las necesidades nutricionales del hongo requeridas para su crecimiento (Tabla 11), el suplemento del medio con valina, básicamente es orientado hacia la producción de intermediarios o precursores de metabolitos volátiles como los alcoholes. Los alcoholes que se detectaron frecuentemente fueron el etanol, 2-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol, los cuales se produjeron en cantidades importantes (Tabla 12). Estos compuestos son comúnmente producidos por microorganismos, tales como los hongos y levaduras, cuando son crecidos sobre diferentes substratos (Janssens y col., 1992) y algunos de ellos como el 3-metil-1-butanol y el 3-metil-furano pueden ser buenos indicadores del crecimiento de hongos en cereales almacenados (Börjesson, 1989). La biosíntesis de alcoholes superiores fue ya discutida en el punto VI.1.7.

Tabla 13.- Constantes cinéticas para la producción de volátiles totales de acuerdo al modelo de Gompertz.

Corrida*	Vol. Tot. max ($\mu\text{mol/gMS}$)	<i>b</i>	<i>k</i> (h^{-1})	<i>t max</i> (h)	R ²
16 : Am	116	5.50	0.014	121.7	0.996
17 : Am+Val	138	5.19	0.018	91.4	0.998
18 : Am+BY	34.2	8.62	0.030	71.8	0.995
19 : Am+BY+Val	134	5.01	0.017	94.8	0.999
22 : BY	1.01	6.13	0.019	95.4	0.999
23 : BY+Val	14.2	72.9	0.109	39.3	0.999
24 : ST	0.99	6.21	0.022	83.0	0.997
29 : ST+Val	2.24	10.2	0.023	100.9	0.989

* : Am : amaranto; BY : bagazo de yuca; ST: salvado de trigo.
aereación : 5 mL/h.gMS

Tabla 14.- Constantes cinéticas para la producción de alcoholes totales de acuerdo al modelo de Gompertz.

Corrida*	Alcoholes max ($\mu\text{mol/gMS}$)	<i>b</i>	<i>k</i> (h^{-1})	<i>t max</i> (h)	R ²
16 : Am	93.2	6.55	0.013	143.9	0.997
17 : Am+Val	94.9	6.23	0.018	98.7	0.999
18 : Am+BY	5.52	10.26	0.029	80.4	0.987
19 : Am+BY+Val	64.7	7.43	0.019	103.6	0.999
22 : BY	0.24	6.76	0.016	115.0	0.997
23 : BY+Val	1.57	40.4	0.114	32.38	0.991
24 : ST	0.27	8.24	0.018	116.4	0.999
29 : ST+Val	0.40	10.7	0.019	123.8	0.996

* : Am : amaranto; BY : bagazo de yuca; ST: salvado de trigo.
aereación : 5 mL/h.gMS

VI.2.2.5.2.-Esteres.

Se identificó un total de 7 ésteres diferentes (Tabla 12), siendo este grupo de compuestos el más amplio junto con los alcoholes, pero los producidos en cantidades más altas, a excepción de los cultivos en amaranto solo y con valina (corrida: 16 y 17,

Tabla 15). Este grupo de compuestos alcanzaron hasta un 47% de los volátiles totales, en el caso de Am+BY (corrida: 18). De los soportes substratos probados, la combinación Am+BY (1:1) generó la más alta cantidad de ésteres (16.2 $\mu\text{mol/gMS}$), siendo una producción de 1.2, 49 y 46 veces más que la registrada en Am (corrida 16), BY (corrida: 22) y ST (corrida: 24), respectivamente. El suplemento de los cultivos con valina también estimuló notoriamente la producción de los ésteres en general, y especialmente en el caso de BY+Val (corrida: 23) en donde se logró un incremento de 17 veces más respecto al medio solo (corrida: 22).

Los acetatos fueron los ésteres encontrados con mayor frecuencia. Es bien conocido que en hongos estos compuestos se forman a partir de acetyl-CoA (principal donador de grupos acilo) que deriva del metabolismo de carbohidratos, especialmente de la glucosa (Berry, 1988). Los ésteres producidos en concentraciones altas por la Val fueron: el acetato de etilo, el propionato de etilo, el acetato de 3-metil butilo y el pentanoato de etilo; mientras que por la Leu sólo el acetato de etilo y el acetato de 3-metil butilo. La biosíntesis de los ésteres frutales (acetato de 2-metil propilo y 3-metil butilo) puede ser a través de la alcoholisis de los compuestos acil-CoA o por esterificación directa de un ácido orgánico (en este caso ácido acético) y el alcohol correspondiente (2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol, respectivamente), ruta más común en hongos (Welsh y col., 1989). La importancia del papel del piruvato, la Leu y la Val como promotores de la síntesis de ésteres de alquil metil-ramificados (acetato de 3-metil butilo), de alcoholes metil-ramificados (3-metil-1-butanol) y de otros compuestos, así como del mejoramiento del aroma a plátano, ha sido demostrado también en el plátano (Myers y col., 1970; Drawert y Berger, 1981). El butirato de etilo se encontró en ambos casos en concentraciones relativamente bajas, en tanto que el hexanoato de etilo y el acetato de 2-metil propilo sólo se manifestó en Leu y Val respectivamente. Estos metabolitos son bien conocidos por conferir notas frutales y han sido reportados que son producidos por algunos hongos, por ejemplo del género *Penicillium* (Kaminski y col., 1974).

VI.2.2.5.3.- Cetonas.

Las cetonas variaron entre el 0.5 y 9% de los volátiles totales producidos. La cantidad máxima fue encontrada en amaranto (corrida: 16, Tabla 16) la cual correspondió a 1.4, 8.5 y 6.7 veces más a la alcanzada en Am+BY (corrida: 18), BY (corrida: 22) y ST (corrida: 24), respectivamente. Este resultado en amaranto es congruente debido a que su composición es más rica en grasas (6%, Tabla 2) que el resto de substratos. Estas son utilizadas por el microorganismo durante su

crecimiento, mediante la β -oxidación dando lugar al grupo de compuestos en cuestión. Esto explica por que la adición de valina en la mayoría de los casos al incrementar el crecimiento (producción de CO_2 : C DPR, Tabla 10) incrementó de manera importante la producción de cetonas, especialmente en BY+Val (corrida: 23) donde se alcanzó un aumento de 38 veces más respecto al soporte solo (corrida: 22). La acetona y las metilcetonas (2-hexanona y 2-heptanona) fueron las cetonas que se encontraron en la mayoría de los cultivos ejemplificados en la Tabla 16, en cantidades considerables. En tanto la 2-octanona se detectó únicamente en la corrida 19 (Am+BY+Val) y en concentración baja. La 2-hexanona y la 2-heptanona están biosintéticamente relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos. Estas cetonas pueden ser producidas durante el anabolismo de ácidos grasos (Wurzenberger y col., 1982) a partir de acetyl-CoA (derivado preferencial de carbohidratos) y también en el catabolismo de ácidos grasos (β -oxidación). Este último mecanismo es empleado por los microorganismos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y mantenimiento. *P. roqueforti* (Gallois y col., 1990) y *P. ducumbens* (Yagi y col., 1990) son productores de las cetonas mencionadas y de alcoholes cuando son crecidos en substratos que contienen compuestos grasos tales como aceite de soya, de ricino y especialmente en queso. Este grupo de cetonas están relacionadas con aromas a queso (p.e. la 2-heptanona, le confiere el olor característico al queso roqueforti) pero también es bien sabido que dependiendo de la proporción en que se encuentren y de su concentración, pueden impartir y resaltar notas frutales (como a piña, etc.).

Tabla 15.- Constantes cinéticas para la producción de ésteres totales de acuerdo al modelo de Gompertz.

Corrida*	Esteres max ($\mu\text{mol/gMS}$)	<i>b</i>	<i>k</i> (h^{-1})	<i>t max</i> (h)	R^2
16 : Am	13.2	8.81	0.030	71.07	0.999
17 : Am+Val	21.9	4.71	0.023	66.44	0.995
18 : Am+BY	16.2	8.98	0.032	68.81	0.996
19 : Am+BY+Val	33.8	4.69	0.020	76.60	0.996
22 : BY	0.33	6.39	0.020	91.95	0.998
23 : BY+Val	5.65	63.9	0.108	38.28	0.999
24 : ST	0.35	6.60	0.024	77.42	0.997
29 : ST+Val	0.82	21.0	0.031	97.56	0.985

* : Am : amaranto; BY : bagazo de yuca; ST: salvado de trigo.
aeración : 5 mL/h.gMS

Tabla 16.- Constantes cinéticas para la producción de cetonas totales de acuerdo al modelo de Gompertz.

Corrida*	Cetonas max ($\mu\text{mol/gMS}$)	<i>b</i>	<i>k</i> (h^{-1})	<i>t max</i> (h)	R ²
16 : Am	0.60	4.39	0.016	40.15	0.996
17 : Am+Val	2.92	4.74	0.028	24.13	0.996
18 : Am+BY	0.42	7.94	0.029	31.03	0.997
19 : Am+BY+Val	5.13	5.70	0.041	18.44	0.992
22 : BY	0.07	6.96	0.028	30.09	0.997
23 : BY+Val	2.68	78.3	0.123	15.40	0.999
24 : ST	0.09	9.06	0.035	27.35	0.997
29 : ST+Val	0.16	12.0	0.028	38.54	0.995

* : Am : amaranto; BY : bagazo de yuca; ST: salvado de trigo.
aereación : 5 mL/h.gMS

VII.- Conclusiones.

- 1) El amaranto, el bagazo de yuca y el bagazo de caña de azúcar fueron los mejores soportes para la producción de aromas por *Ceratocystis fimbriata*.
- 2) En los cultivos de salvado de trigo y de bagazo de yuca se produjo un olor ligero a manzana/pera y a plátano respectivamente, mientras que en los cultivos de bagazo de caña de azúcar+ MS o medio natural (caldo de papa) y de amaranto se registró un aroma fuerte a fruta y a plátano/piña, respectivamente.
- 3) Se encontró que la producción de aroma por *C. fimbriata* está asociada al crecimiento. La valina o la leucina promovió la actividad respiratoria y en mayor grado la producción de compuestos volátiles (más de diez veces en varios de los casos, de los experimentos en matraces) principalmente de los alcoholes de C₄-C₅ y particularmente de sus correspondientes ésteres de acetato, los cuales imparten fuertes aromas frutales y están presentes en plátano (acetato de 3-metil butilo). Otras fuentes de nitrógeno usadas como la urea, no dieron el mismo efecto.
- 4) En los cultivos en los que se detectó aroma a plátano, un total de 24 compuestos fueron separados por cromatografía de gases e identificados 20 de ellos (8 alcoholes, 1 aldehído, 7 ésteres y 4 cetonas), mientras que en la fruta correspondiente un número menor de éstos y en menor concentración fueron encontrados, aún cuando los aromas detectados fueron similares en términos de calidad e intensidad. El acetaldehído, el acetato de etilo, el etanol, el propionato de etilo, el 3-metil-1-butanol y el acetato de 3-metil butilo, se produjeron en cantidades significativas.
- 5) La relación entre el CO₂, volátiles producidos y la concentración de aminoácido puede ser descrita satisfactoriamente por un modelo simple de saturación, mostrando que la producción de volátiles fue proporcional a la cantidad de CO₂ producida.
- 6) La evolución de la producción de CO₂ y volátiles totales fue descrita adecuadamente con el modelo logístico sigmoidal de Gompertz, encontrando que los parámetros

obtenidos, especialmente la cantidad total de CO₂ o volátiles (P_{max}) fueron dependientes del medio usado.

7) A muy baja velocidad de aeración (5 mL/h.gMS) o por difusión pasiva (experimentos en matraces) se favoreció la producción de aromas.

8) Se demostró claramente que el perfil cromatográfico de cada cultivo depende del substrato usado y del precursor adicionado.

9) Los resultados fueron altamente mejorados en estas condiciones, en comparación con los obtenidos por Christen y col. (1994) a tasas altas de aeración.

10) La FES puede ser una alternativa biotecnológica para aprovechar residuos agroindustriales y producir aromas frutales de alto valor agregado.

11) Perspectivas de investigación :

- Estudios básicos sobre la fisiología y bioquímica del microorganismo (mayor conocimiento de las vías de biosíntesis de los metabolitos volátiles y precursores).
- Mejoramiento genético de la cepa (hiperproducción).
- Ingeniería del proceso de fermentación (optimización de las condiciones ambientales y medios de cultivo, etc.).

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo un convenio de investigación de entre la UAM (México) y ORSTOM (Francia). J.C. Meza fue apoyado económicamente por CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

VIII.- Bibliografía.

- Aidoo K.E., Henry, R. and Wood, J.B. (1982). Solid Substrate Fermentations. *Advances Applied Microbiology* 28: 201-237.
- Auria R., Hernandez, S., Raimbault, M., Revah S. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques* 4 (6): 391-396.
- Barrios-Gonzales, J., Castillo, T.E. and Mejia, A.. (1993). Development og high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnology Advances* 11: 525-537.
- Berry, D.R. (1988). Products of primary metabolic pathways in Physiology of Industrial Fungi (ed. D.R. Berry), pp.130-160. Blackwell Scientific Publications: Edinburgh.
- Blanc, P.J., Loret, M.O. and Goma, G. (1995). Production of citrinin by various species of monascus. *Biotechnology Letters* 17 (3): 291-294.
- Berovic, M. and Ostroversnik, H. (1997). Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology* 53: 47-53.
- Börjesson T., Stöllman U., Schnürer J. (1990). Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Applied Environmental and Microbiology* 56 (11): 3705-3710
- Cannel E. and Moo Young M. (1980). Solid-state fermentation broths in an airlift fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 30 (10): 746-753.
- Cannel E. and Moo Young M. (1980). Solid-state fermentation Systems. *Process Biochemistry* , June/July: 26
- Cereda M.P. (1994). Caracterização dos residuos da industrialização da mandioca. In *Industrialização da mandioca no Brasil*, ed M.P. Cereda, pp 11-50. São Paulo: Paulicéia.
- Christen P. and Raimbault M. (1991). Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters* 30 (10): 746-753.
- Christen, P., Auria, R., Vega, C., Villegas, E., Revah, S. (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances* 11: 549-557.
- 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., Angeles, N., Corzo, G., Farres, A., Revah S. (1995). Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechnology Techniques* 9 (8): 597-600.

- Christen P., Meza J.C., 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.
- Collins R.P. and Morgan M.E. (1961). Identity of Fruit like aroma substances synthesized by endocondial forming fungus. *Phytopathology* 52: 407-409.
- Desgranges, C., Georges, M., Vergoignan, C., Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. II. On-line measurements. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 206-209.
- Doelle H.W., Mitchell D. A., Rolz C. E. (1992). Solid substrate cultivation. 466 Pp., Elsevier Applied Science, London, UK.
- Drawert, F., Berger, R. (1981). Possibilities of the biotechnological production of aroma substances by plant tissue cultures. In: Schreier P. (ed.), *Flavour'81*, 509-527, W. de Gruyter & Co., West Germany.
- Durand, A., Chereau, D. (1988). A new pilot reactor for solid state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 476-486.
- Durand, A., Grajek, W. and Gervais, P. (1991). The INRA-Dijon Process for the single cell protein production on sugar beet pulp with *Trichoderma viride* TS. in Food, Feed and Fuel (Chahal. D.S., ed.). pp. 123-152, Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, India.
- El-Naghy, M.A., Mazen, M.B. and Fadl-Al. (1991). Production of aflatoxin B2 by *Aspergillus flavus* isolated from stored cotton seedes with different substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnolgy* 7: 67-71.
- Fabre C.E., Blanc P.J., Goma G. (1996). Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Science Des Aliments* 16: 61-68.
- Fincham, J.R.S., Day, P.R., Radford, A. (1979). Fungal genetics. 285 Pp., Univ. California Press, Los Angeles, USA.
- Gatfield, I. (1988). Production of Flavour and aroma compounds by biotechnology. *Food Technology* 42 (10): 110-122.
- Gallois, A., Gross, B., Langlois, D., Spinnler, H.E., Brunierie, P. (1990). *Mycological Research* 94: 494-504.
- Gatfield, I. L., Güntert, M., Sommer, H., Werkhoff, P. (1993). Some aspects of the microbiological reduction of flavor-active lactones with particular reference to γ -decalactone. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* 15 (5/6): 165-170.
- Gervais, P., Sarrette, M. (1990). *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69 (1): 46-50.
- Hanssen H.P and Sprecher E. (1981). In: "Flavour '81". P. Schereier Ed., pp.547-586, Munich:Walter de Gruyter Co.
- Hesseltine C.W. (1977). Solid State Fermentation Part 2. *Process Biochemistry* November: 28-32.
- Hesseltine, C.W. (1977). Solid State Fermentations. *Biochemistry and Bioengineering* 25: 517-532.

- Hesseltine, C.W. (1987). Solid State Fermentation-An overview. *International Biodeterioracion* 23: 78-89.
- Horton, H.W. (1987). Consumer reaction to flavor innovation. *Food Technology* 41 (6): 80.
- Humphrey, M., Pearce, S., Skill, B. (1990). Biotransformation of coconut fat to methyl ketones. A commercial scale solid-state fermentation. In: *Abstracts of the Symposium on bioformation of flavours*. London.
- Ikasari L., Mitchell D.A. 1994. Protease production dy *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 320-324.
- Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T., 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., Vandamme, E.J. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* 27: 195-215.
- Kaminski, E., Stawicki, S., Wasowicz, E. (1974). Volatile flavor compunds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *fungi imperfecti*. *Applied Microbiology* 27 (6): 1001-1004.
- Lanza E. and Palmer L. (1976). Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 24 (6): 1247-1250.
- Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiartman S. and Ramakrishna S.V. (1985). Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology* 7 (6): 258-263.
- Manzur, A., Cuamatzi, F., Favela, E. (1997). Effect of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* in a blend of low density polyethylene and sugar cane bagasse. *Journal of Applied Polymer Science* 66: 105-111.
- Meraz, M., Shirai, K., Larralde, P., Revah, S. (1992). Studies on the bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60: 457-463.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annal Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Mitchell D.A. (1992). Biomass determination in solid-state cultivation. In *Solid substrate cultivation*, eds H.W. Doelle, D.A. Mitchell, C.E. Rolz, pp 53-63, London: Elsevier Applied Science Pub.
- Moo Young M., Moreira, A.R. and Tengendy, R.P. (1983). Principles of Solid-Substrate Fermentation .In: *The Filamentous Fungi*.Vol. IV. Fungal Technology.Smith, J.E., Berry, D.R and Kristiansen, B.(Eds.) Great Britain. 117-143.
- Myers, M.J., Issenberg, P., Wick, E.L. (1970). *Phytochemistry* 9: 1693-1700.
- Nigam, P. and Singh, D. (1994). Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal Basic of Microbiology* 6: 405-423.
- Omeliansky, J.L. (1923). Aroma-Producing Microorganism. *Journal of Bacteriology* 8: 393-396

- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 27: 109-117.
- Piendl, A., Geiger, E. (1980). Technological factors in the formation of esters during fermentation. *The Brewer's Digest* 55 (5): 26-35.
- Poggy-Varaldo, H.M., Rodríguez-Velázquez, R., Fernández-Villagómez, G., Rinderknech-Seijas, N., Oleszkiewicz, J., Sparling, R. (1996). Research and development on solid substrate anaerobic digestion of municipal and industrial waste in Mexico. In: Piccinini N, De Lorento R (eds) Proceedings 2nd European Meeting of the Chemical Industry Environment EMCHIE 96, vol. 1, pp 201-212. Politecnico di Torino, Torino, Italy.
- Poggy-Varaldo, H.M., Rodríguez-Velázquez, R., Fernández-Villagómez, G., Esparza-García, F. (1997). Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 284-291.
- Pylar E.J. (1973). Baking Science and Technology. Vol. 1. 584 pp. Chicago: Siebel Pub. Comp.
- Raimbault, M., and Alazard, A. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9:199-209.
- Revah, S. and Lebeault, J.M. (1989). Accelerated production of blue cheese flavors by fermentation on granular curds with lipase addition. *Lait* 69: 281-289.
- Riba, G., Goussard, J., Durand, A. and Desgranges, C. (1989). Compositions pesticides à base de microorganismes, leur procédé de préparation et leur application en Agronomié. European Patent 0406103 A1.
- Rivard C.J., Rodríguez, J.B., Nagle, N.J., Self, J.R., Kay, B.D., Soltanpour, P.N., Nieves, R.A. (1995). anaerobic digestion of municipal solid wastes: utility of process residues as a solid amendment. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52: 125-135.
- Roche, N., Desgranges, C. and Durand, A. (1994). Study on the solid-state production of a Thermostable α L Arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. *Journal of Biotechnology* 38: 43-50.
- Roche, N. and Durand, A. (1996). Kinetics of *Thermoascus aurantiacus* solid-state fermentation on sugar-beet-polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 584-588.
- Saucedo, C.G., González, P.B., Revah, S., Viniegra, G.G., Raimbault, M. (1990). Effect of *Lactobacilli* inoculation on cassava (*Manihot esculenta*) silage: Fermentation pattern and kinetic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 50: 467-477.
- Senemaud, C., Mangeot, G., Gongora, B., Gouin, G., Belin, J.M. (1988). Process for preparation of microbial secondary metabolites and new microbial strains used. French-Patent N° FR 2603048 A1.
- Shankaranand, V.S. and Lonsane, B.K. (1994). Cofee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 165-168.

- Schreier, P. (1988). Biotechnology and Flavour production. En: Durand, G., Bobichon, L. y Florent, J (Eds.). Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium. Societé Francaise de Microbiologie, Paris.
- Shcindler, J., and Schmid, R.D. (1982). Fragrance or aroma chemicals-microbial synthesis and enzymatic transformation-a review. *Process Biochemistry* 17 (5): 2-8.
- Shcindler, J., and Bruns, K. (1980). Monoterpene-containing aroma compounds by fermentation. German Federal Republic Patent 2 840 143.
- Shuler, M.L., Kargi, F. (1992). Bioprocess engineering: basic concepts. 479 Pp., Prentice- Hall, Englewood Cliffs, USA.
- Spinnler, H.E., Djian, A. (1985). Bioconversion of amino acids into flavouring alcohols and esters by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 264-269.
- Sprecher E. and Hanssen H. P. (1983). Distribution an strain-dependent formation of volatile metabolites in the genus *Ceratocystis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 493-499.
- Sunesson, A.L., Vaes, W.H.J., Nilsson, C.A., Blomquist, G., Andersson, B., Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 2911-2918.
- Teutonico R.A., Knorr D. (1985). Amaranth: composition, properties and application of a rediscovered food crop. *Food Technology* 39 (4): 49-60.
- Unger, M. (1989). Perfumer & Flavorist, june .
- Villegas, E., Aubague, S., Alcantara, L., Auria, R and Revah, S. (1993). Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biochemistry Advances* 11: 387-397.
- Viniegra, G. (1988). Perspectives and limitations of solid fermentation in Mexico, Symposium Montpellier 25-27 July (France), Solid state fermentation in bioconversion on agroindustrial raw materials, Ed. Maurice Raimbault, Pub. ORSTOM, 67-69.
- Welsh, F.W., Murray, W.D., Williams, R.E. (1989). Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology* 9 (2): 105-169.
- Wurzenberger, M., Grosch, W. (1992). *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuhung und Forschung* 175: 186-190.
- Yagi, T., Kawaguchi, Hatano, T., Fukui, F., Fukui, S. (1990). *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70: 94-99.
- Yamauchi, H., Akita, O., Obata, T., Amachi, T., Hara, S., Yoshizawa, K. (1989). Production and application of a fruity odor in a solid-state culture of *Neurospora* sp. using pregelatinized polish rice. *Agricultural and Biological Chemistry* 53 (11): 2881-2886.

Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors

P. CHRISTEN^{1,2}, J. C. MEZA¹ AND S. REVAH¹

¹ Department of Chemical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-534, CP 09340, Mexico City, Mexico

² ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération), Cicerón 609, CP 11530, Mexico City, Mexico

Wheat bran, cassava bagasse and sugar cane bagasse were shown to be adequate substrates for the growth and aroma production by the mould *Ceratocystis fimbriata*. Among the nutritive media tested, sugar cane bagasse complemented with a synthetic medium containing glucose (200 g l⁻¹) gave a fruity aroma while the leucine or valine-containing medium gave a strong banana aroma. Aroma production was dependent on growth and the maximum aroma intensity was detected at about the time of the maximum respirometric activity. Twenty-four compounds have been separated by GC headspace analysis and 20 were identified, among them: 1 aldehyde, 7 alcohols, 4 ketones and 8 esters. It was clearly demonstrated that the chromatographic profile of the headspace of the culture was dependent on the substrate used and on the eventual precursor added. When leucine or valine was added to the substrate, the production of total volatiles in the headspace reached values up to tenfold higher than that for ripe bananas. The Gompertz model, a logistic-like equation, was used to fit the integrated CO₂ and volatiles production data.

Micro-organisms play an important role in the generation of natural compounds, particularly in the field of food aromas. Extensive reviews dealing with flavour generation by micro-organisms have appeared in the past few years (Welsh, Murray & Williams, 1989; Janssens *et al.*, 1992; Berger, 1995). As pointed out by Bigelis (1992), filamentous fungi are interesting because they are able to produce flavouring compounds and flavour-related enzymes.

Solid substrate fermentation (SSF) is a method to cultivate microbial cells that has been extensively studied for many micro-organisms and their products (Doelle, Mitchell & Rolz, 1992), especially for moulds which are well adapted to this type of culture. SSF is also an interesting alternative for the utilization of agroindustrial solid wastes. Some recent papers have reported the production of aromas in SSF. Yamauchi *et al.* (1989) produced a fruity odour by growing a *Neurospora* strain on pregelatinized rice, while Pastore, Park & Min (1994) obtained similar results with various *Neurospora* strains from beiju, a traditional Brazilian fermented beverage. Gervais & Sarrette (1990) studied the production of coconut aroma by *Trichoderma viride* on agar and Humphrey, Pierce & Skill (1990) patented a process in which an *Aspergillus* strain, grown on cellulose fibres, produced methyl ketones from coconut oil. In koji fermentation, Ito *et al.* (1990) found that production of volatile compounds by *Aspergillus oryzae* was improved under oxygen limiting conditions. Sugawara *et al.* (1994) demonstrated the importance of the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in the generation of a furanone, characteristic of the aroma of miso, a traditional oriental fermented food. These studies have shown the importance of the media in the specific development of a defined aroma.

Moreover, the capacity of some *Ceratocystis* spp. to produce fruit-like aromas has already been reported (Lanza, Ko & Palmer, 1976; Senemaud, 1988; Christen, Villegas & Revah, 1994; Christen *et al.*, 1995). In this work, the ability of *Ceratocystis fimbriata* to produce aromas in SSF was explored. It involved the study of the influence of the substrates used and the addition of precursors on growth and aroma production.

MATERIALS AND METHODS

Organism and culture media

Ceratocystis fimbriata Ellis & Halst. CBS 374-83 was used. It was periodically transferred onto Potato Dextrose Agar (PDA) slants and stored at 4 °C. Three media were used: wheat bran and cassava bagasse (donated by Pr. C. Soccol.

Table 1. Culture media used for aroma production by *C. fimbriata*

Run	Substrate/Nutritive medium	Complement
1	Wheat bran	—
2	Wheat bran	Leucine
3	Wheat bran	Urea
4	Cassava bagasse	—
5	Cassava bagasse	Leucine
6	Cassava bagasse	Urea
7	Cassava bagasse	Valine
8	Sugar cane bagasse + SM*	—
9	Sugar cane bagasse + SM*	Leucine

* SM refers to the synthetic medium optimized by Christen & Raimbault (1991).

UFPR, Brazil) which can be regarded as substrates – containing carbon and nitrogen sources – and sugar cane bagasse, which is basically a support and needs to be complemented with a synthetic medium (SM) containing the carbon and nitrogen sources. Wheat bran and cassava bagasse were milled and sieved through – 20 + 40 mesh screens to obtain particles of 0.42–0.82 mm diam. The sugar cane bagasse had been previously washed in order to eliminate residual sugars and prepared in the same manner as the wheat bran and the cassava bagasse. Each substrate was then sterilized at 103 kN m⁻² for 15 min.

Fermentation procedure

Experiments were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks covered with six layers of gauze, without forced aeration (surface culture). These were filled with 7.5 g Initial Dry Matter (IDM) for wheat bran, and 5.25 g IDM for cassava and sugar cane bagasses. For all experiments, initial conditions were as follows: temperature, 30°; pH, 6.0; inoculum size, 1×10^7 spores g⁻¹ IDM. Initial water content was calculated according to the maximum absorption capacity of each support (wheat bran, 50% (w/w); sugar cane bagasse, 63% (w/w) and cassava bagasse, 65% (w/w)). The wheat bran and cassava bagasse were complemented with an oligoelement solution with the following composition: Fe(NO₃)₃ nonahydrate, 723.8 mg l⁻¹; ZnSO₄ heptahydrate, 439.8 mg l⁻¹; MnSO₄ tetrahydrate, 203 mg l⁻¹. Sugar cane bagasse was imbibed with a synthetic medium previously optimized for submerged cultures (Christen & Raimbault, 1991). This medium had the following composition: glucose, 200 g l⁻¹; urea, 7.6 g l⁻¹; (NH₄)₂SO₄, 18 g l⁻¹; KH₂PO₄, 4 g l⁻¹; Ca(NO₃)₂, 4 g l⁻¹; MgSO₄ heptahydrate; 3 g l⁻¹, oligoelement solution, 8 ml l⁻¹. Urea, leucine and valine were added at a concentration of 167 mmol l⁻¹. The different combinations tested are given in Table 1.

For each experiment two flasks were used. They were monitored periodically for sensory evaluation. One of these was also used to assay CO₂ and volatile compounds production by headspace chromatographic analysis at different fermentation times. One experiment (run 4) was reproduced on three different occasions within a 4 month period to evaluate repeatability of the process.

Analytical procedures

The odours of the cultures were determined by evaluation with a non-trained panel consisting of six members, with no restriction in descriptive terms.

As reported previously by Desgranges *et al.* (1991) and Mitchell (1992), CO₂ production in the headspace above the culture is a good growth indicator. CO₂ concentration was measured by gas chromatography according to Christen *et al.* (1993) and expressed as % ml CO₂ 100 ml⁻¹ headspace. The detection limit was 0.05% CO₂.

Volatile compounds produced were characterized by injecting 2.0 ml from the headspace of the culture to a Hewlett-Packard 5890 GC equipped with a 5 metre Megabore HP-1 column and with a flame ionization detector. The

temperature of the injector and detector blocks was 210°. The oven temperature program was 40° for 2 min followed by a temperature rise of 10 °C min⁻¹ up to 150°. This final temperature was maintained for 2 min. The nitrogen gas flow rate was 1.5 ml min⁻¹ and split ratio was 1:32. Total volatiles (TV) produced were expressed as µmol ethanol equivalent per litre of headspace (µmol l⁻¹ eq. ethanol). Some compounds were also determined individually and their concentration in the headspace was expressed from standard curves as µmol l⁻¹. The headspace analysis of a ripe banana was performed as control. For this, 20 g of sliced ripe banana were equilibrated for 1 h at 30°.

Data analysis

In order to analyse the kinetic behaviour of the culture, the raw CO₂ and volatile production data, which represent an accumulation term between production and transfer from the flask to the exterior, were integrated with respect to time and fitted to the Gompertz model, previously used by Meraz *et al.* (1992) for the bacterial lactic acid production on cassava. This sigmoidal shaped model describes the evolution of a production P (CO₂ or TV in this case) with respect to time as follows:

$$P = P_{\max} \exp\{-b \exp(-kt)\},$$

where P_{\max} (CO₂ max or TV max), is the maximum integrated value for the production (when $t \rightarrow \infty$) expressed as % (ml CO₂ 100 ml⁻¹ headspace) for CO₂ and µmol l⁻¹ for the volatiles respectively. k (h⁻¹) represents a production rate constant and b can be used to obtain the time of maximum production rate from $t_{\max} = (\ln b)/k$. Data integration and non-linear regression of the Gompertz model to obtain P_{\max} , b and k values were made with the KaleidaGraph Program (Abelbeck Software, U.S.A.).

RESULTS AND DISCUSSION

Repeatability studies

From Fig. 1, it can be seen that the experimental data obtained from the system using cassava bagasse were reproducible for three independent experiments for both CO₂ production (Fig. 1a) and TV production (Fig. 1c). These raw data were then integrated and the Gompertz model was applied (Fig. 1b, d). Fitted parameters and correlation coefficient (R^2) are reported in Table 2. It can be seen that a good correlation of the time series data of the kinetic evolution may be obtained with the model for each experiment. Fitting the model to all the experimental points gives R^2 values above 0.96 (Exp. 1 + 2 + 3, Table 2). Hence, it may be concluded that the experimental set-up and the analytical methods used for both CO₂ and volatile determination were repeatable and adequate.

Growth studies

Carbon dioxide was chosen as a growth indicator and its evolution is reported in Fig. 2. For all runs, the evolution of this parameter was similar. After a short lag period (no more than 20 h), the CO₂ production drastically increased to reach

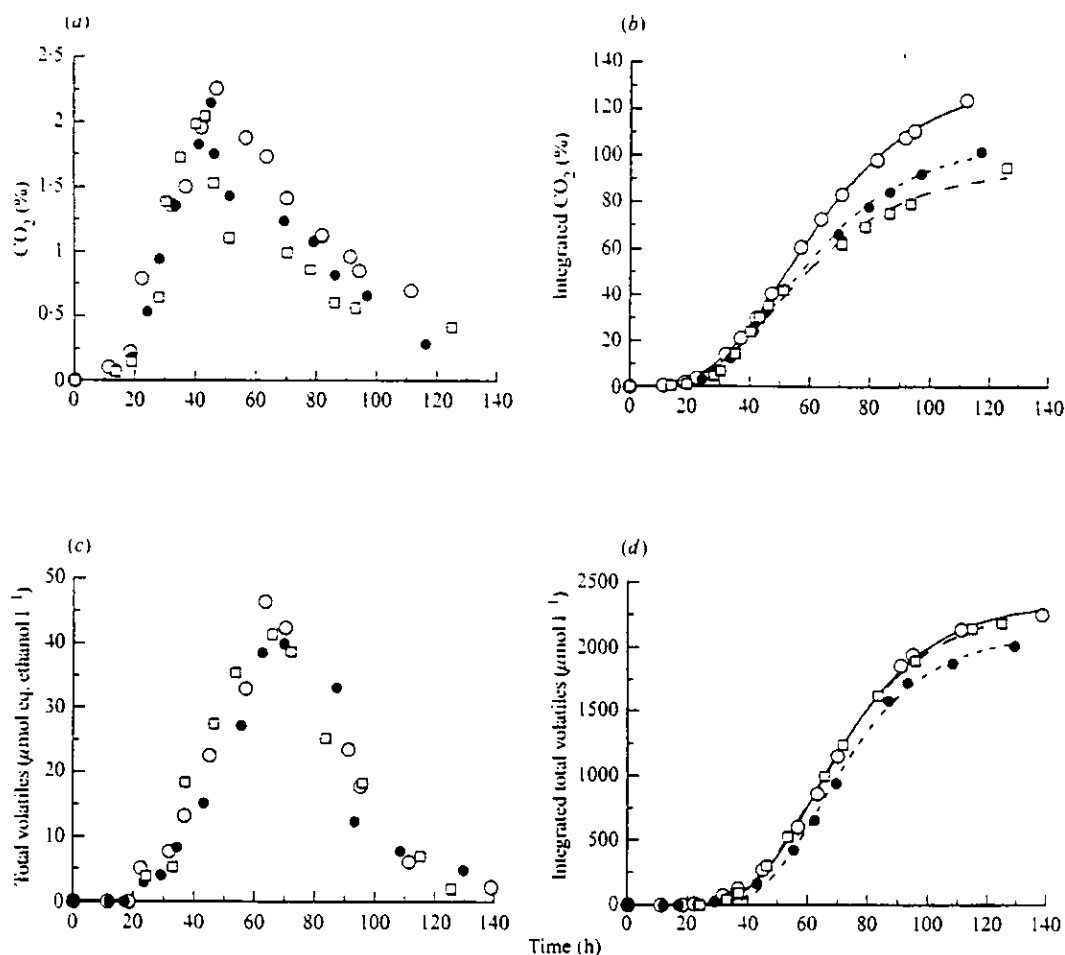


Fig. 1. Evolution of the raw data (a, c) and integrated data (b, d) for carbon dioxide and total volatile production for three independent experiments on cassava bagasse (run 4). In (b) and (d) symbols represent experimental data and curves represent the Gompertz model. ○, Exp. 1; ●, exp. 2; □, exp. 3.

Table 2. Kinetic constants for CO₂ and total volatile production of *Ceratocystis timbriata* grown on cassava bagasse in three independent experiments

		k (h ⁻¹)	t_{max} (h)	R^2
CO ₂	CO _{2,max} (%)			
Exp. 1	132.6	0.041	51.4	0.998
Exp. 2	105.6	0.043	50.0	0.998
Exp. 3	94.0	0.043	48.2	0.993
Exp. 1+2+3	108.8	0.045	49.3	0.963
Total volatiles	TV _{max} (µmol l ⁻¹)			
Exp. 1	2344.8	0.048	62.6	0.998
Exp. 2	2100.5	0.052	64.4	0.998
Exp. 3	2300.3	0.047	61.7	0.999
Exp. 1+2+3	2265	0.048	62.8	0.992

its maximum between 40 and 60 h, and then decreased below detectable levels after the 5th day. In Fig. 2a, it can be seen that the maximum of CO₂ is higher for the culture on sugar cane bagasse with added synthetic medium than that on wheat bran or cassava bagasse when used alone. The addition of a nitrogen source enhanced CO₂ production for sugar cane and cassava bagasses probably due to nitrogen limitations in these unamended media (Fig. 2c-d). For wheat bran (Fig. 2b),

improvement in CO₂ production was found with leucine, but not with urea, which may imply limitation of readily assimilable carbon sources.

In Table 3, modelling parameters of the integrated CO₂ data are presented. The model proved to describe the data adequately, since all the R^2 coefficients were above 0.990. The P_{max} values confirmed the influence of the substrate. For example, it can be seen that CO₂ production was lower on wheat bran than on cassava and sugar cane bagasses (runs 1, 4 and 8). The addition of a nitrogen source (particularly leucine and valine) greatly enhanced this production (more than fivefold). The production rate (k) values were comparable, all being between 0.031 and 0.064 h⁻¹, though no clear tendency can be seen in relation to the medium. There is no apparent relationship between this parameter and the amount of CO₂ produced characterized by CO_{2,max}. The t_{max} values calculated are close to those observed experimentally (Fig. 2). These values are between 42.9 and 66.3 h and do not seem to be influenced by the medium used.

Aroma production

The aromas detected by olfactometry are presented in Table 4. The periods of strongest perception (t_{max}) were a few hours

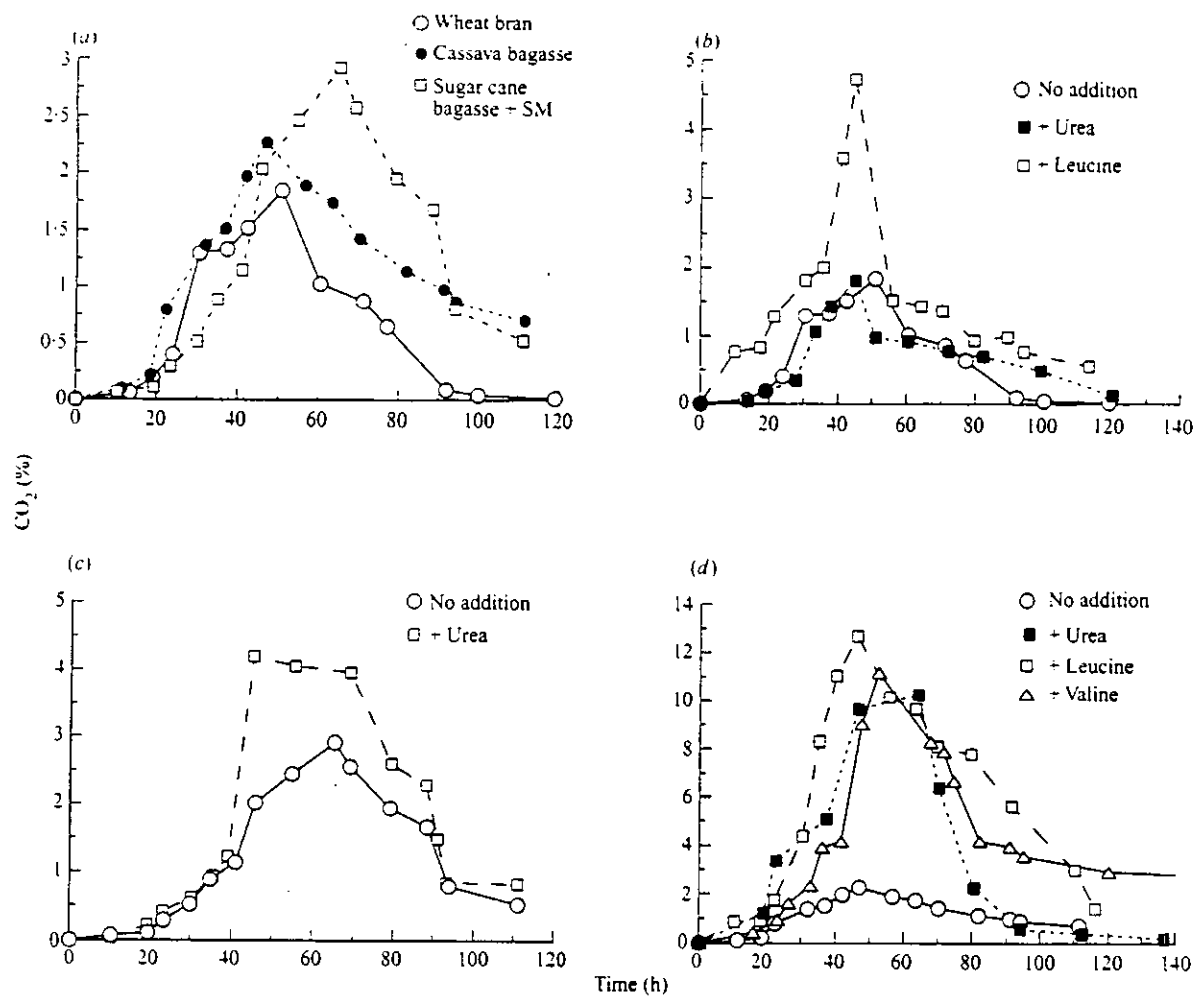


Fig. 2. Carbon dioxide evolution in the headspace of cultures of *Ceratocystis fimbriata*. (a) Comparison of the three substrates with no addition; (b) wheat bran; (c) sugar cane bagasse + synthetic medium; (d) cassava bagasse.

Table 3. Kinetic constants for the CO₂ production

Run*	CO _{2,max} (%)	k(h ⁻¹)	t _{max} (h)	R ²
1	75.2	0.061	44.3	0.999
2	163.2	0.046	42.9	0.997
3	76.5	0.045	50.5	0.997
4	132.6	0.041	51.6	0.999
5	733.1	0.042	53.8	0.999
6	459.6	0.064	47.2	0.997
7	709.7	0.031	66.3	0.991
8	152.9	0.047	59.9	0.999
9	220.0	0.053	58.3	0.999

* As in Table 1.

after the time of maximum growth calculated with the Gompertz model (Table 3). When wheat bran or cassava bagasse was used without added nitrogen (runs 1 and 4), no or slight aroma was detected. In the other cases, medium or strong banana aroma was released except for wheat bran + urea (run 3), where it was rather a weak apple/pear aroma. These sensorial observations were well correlated with the maxima of total volatile compounds detected by GC (Table 5). The highest amounts were found when leucine or valine were

Table 4. Comparison between *C. fimbriata* cultures and the ripe banana (control) for aroma and volatile compounds production

Run*	Aroma and intensity†	t _{max} (h)‡	Total volatiles max (μmol eq. ethanol ⁻¹)§
1	—	—	16.1
2	Banana +++	51	319.2
3	Apple/pear +	65	27.8
4	Banana ++	63	46.5
5	Banana +++	58	414.3
6	Banana +	63	22.4
7	Banana +++	56	478.5
8	Fruity ++	63	44.9
9	Banana +++	45	213.6
Banana	Banana +++	—	48.4

* As in Table 1.

† —none, + weak, ++ medium, +++ strong.

‡ t_{max}: time of maximum perception of the aroma.

§ Experimental values.

added to the substrate (runs 2, 5, 7, 9). On the contrary, urea did not promote fruity aromas nor volatile production (runs 3, 6). It was observed that, in spite of the strong aroma of the banana, the total volatile compounds obtained in this case

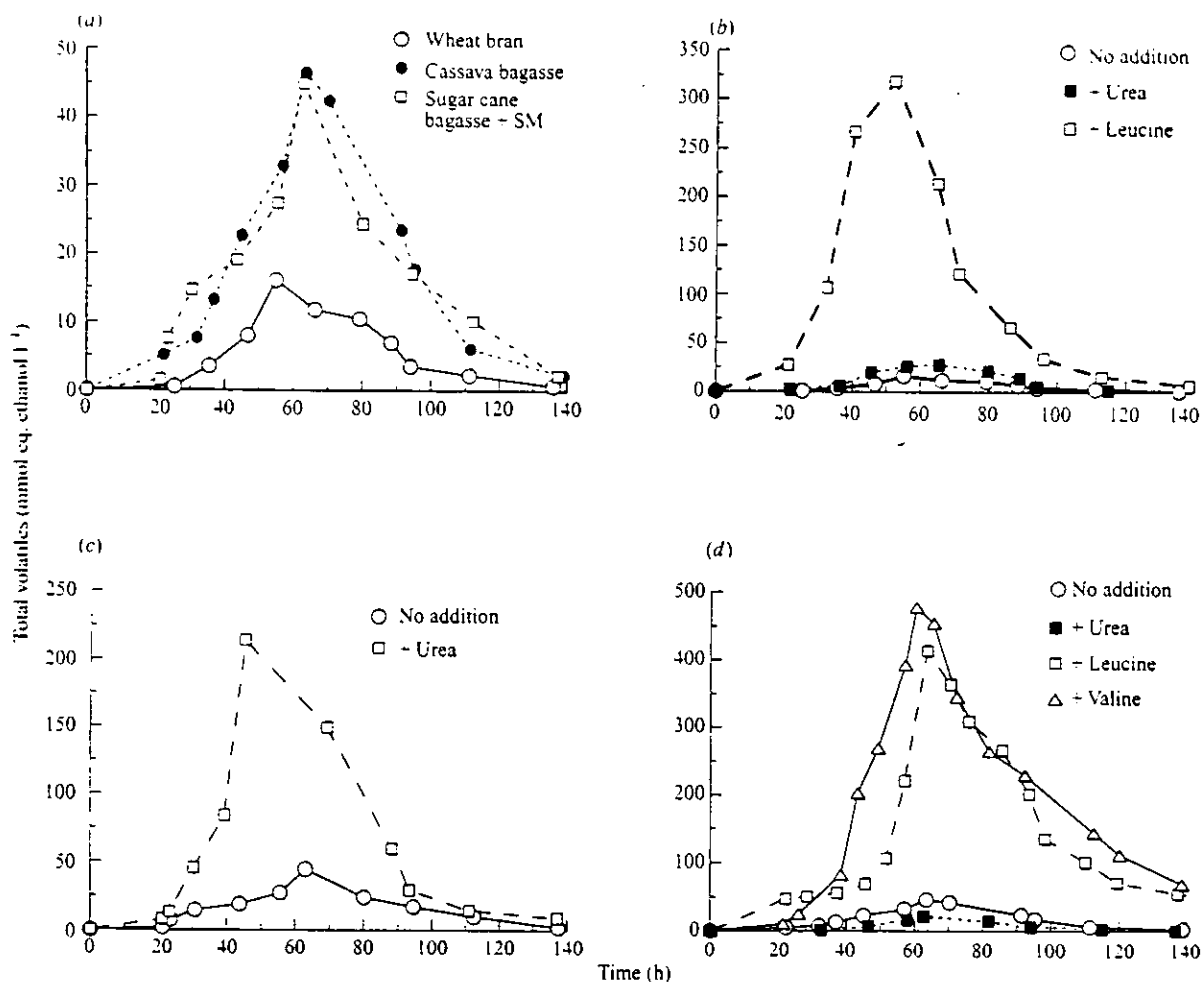


Fig. 4. Total volatile compound evolution in the headspace of cultures of *Ceratocystis fimbriata*. (a) Comparison of the three substrates with no addition; (b) wheat bran; (c) sugar cane bagasse + synthetic medium; (d) cassava bagasse.

higher concentrations than in the headspace of a ripe banana. The strong aroma detected in those cases may be due, in spite of the low total volatiles produced ($48.4 \mu\text{mol l}^{-1}$), to the high concentration of 3-methylbutyl acetate and to the presence of ethyl acetate, acetaldehyde and 3-methyl butanol.

Total volatile compounds production

Similar total volatile compound production was found for growth on cassava bagasse and sugar cane bagasse + SM, which were higher than that for wheat bran (Fig. 4a). The maxima were attained between 48 and 68 h, which coincided with maximum perception by olfactometry. In Figs 4b-d and Table 4, it is shown that for the three substrates the addition of leucine or valine, in addition to promoting growth, greatly enhanced the total production of volatiles. The maxima reached in these cases were between four and tenfold greater than that of the fruit.

The parameters of the model are reported in Table 6. The model was also found to be adequate to describe the integrated data of TV production, as can be seen from the R^2 coefficients. As observed for CO_2 production, the addition of leucine or valine (runs 2, 5, 7 and 9) increased TV_{max} from four to tenfold in comparison to use of the same substrate as a

control (runs 1, 4 and 8). The production rate constant (k) varied between 0.039 and 0.063 h^{-1} , independently of the medium used. The t_{max} parameters coincide with those observed for the maximum perception of aroma (Table 4) and in most cases correspond to those observed experimentally (Fig. 4).

Key volatile compounds production

The evolution of the headspace concentration was evaluated for: acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate, ethyl propionate, 3-methyl butanol and 3-methylbutyl acetate. These six compounds were chosen because they have often been reported as fungal (Kaminski, Stawicki & Wasowicz, 1974; Ito *et al.*, 1990; Sunesson *et al.*, 1995) or yeast (Piendl & Geiger, 1980) metabolites. Moreover, these compounds were produced in most of the experiments reported here (Table 3) and are known to be involved in fruity aromas in general for the first four compounds (acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate, ethyl propionate), and more particularly, banana aroma for the other two compounds (3-methyl butanol and 3-methylbutyl acetate).

Wheat bran (runs 1-3). When grown without a nitrogen supplement, only 4 of the 6 key compounds were detected in

Table 5. Volatile compounds identified in the headspace of 2-d cultures of *C. fimbriata* and in the headspace of a ripe banana (B)

Group	Compound	Peak no.	Run*									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	B
Aldehyde	Acetaldehyde	1	L	M	L	M	H	L	H	L	M	M
Alcohols	Ethanol	2	M	H	H	M	H	M	H	M	H	H
	2-propanol	4	—	L	L	M	M	L	L	L	—	—
	1-propanol	5	—	L	L	—	—	L	L	—	L	L
	2-methyl propanol	7	—	—	—	—	—	—	M	—	—	—
	1-butanol	8	—	—	—	—	M	—	—	—	—	L
	3-methyl butanol	11	—	M	L	L	H	L	H	—	M	L
	2-hexanol	13	L	M	L	M	M	L	H	M	L	—
	2-octanol	22	—	—	—	—	—	—	—	—	L	L
	Ketones	Acetone	3	—	—	—	—	H	—	—	—	L
2-hexanone		12	—	M	L	L	M	L	H	L	M	—
2-heptanone		17	—	—	—	—	M	—	H	—	L	—
2-octanone		21	—	—	—	—	L	—	—	—	—	—
Esters	Ethyl acetate	6	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	Ethyl propionate	10	M	M	M	M	M	M	H	M	M	L
	2-methylpropyl acetate	14	—	—	—	—	—	—	L	—	L	M
	Ethyl butyrate	16	—	L	—	L	L	—	M	L	L	L
	3-methylbutyl acetate	19	—	M	—	M	H	L	H	—	H	H
	Ethyl pentanoate	20	—	—	M	—	—	—	H	—	—	—
	Ethyl hexanoate	23	—	—	—	—	L	—	—	—	L	—

* Refers to the runs listed in Table 1. H: high (concentration > 0.8 $\mu\text{mol eq. ethanol l}^{-1}$), M: medium (0.08 $\mu\text{mol eq. ethanol l}^{-1}$ < concentration < 0.8 $\mu\text{mol eq. ethanol l}^{-1}$), L: low (concentration < 0.08 $\mu\text{mol eq. ethanol l}^{-1}$), —, not detected.

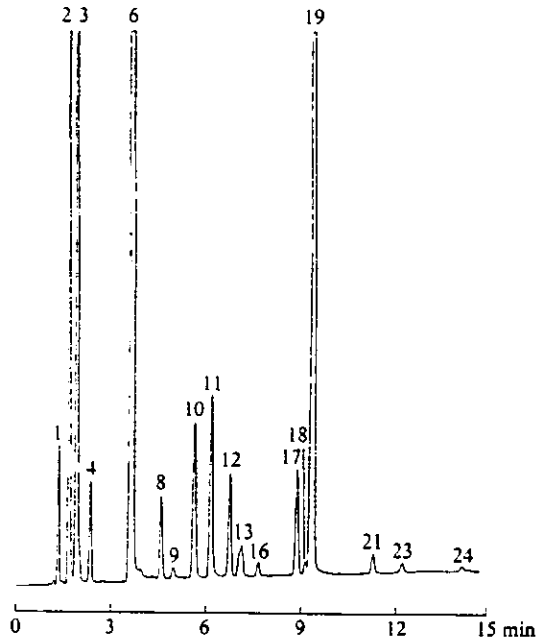


Fig. 3. Headspace chromatogram of a 2-d culture of *Ceratocystis fimbriata* grown on cassava bagasse + leucine. The numbers of the peaks correspond to those given in Table 5.

were inferior to those observed for media modified with leucine or valine.

Volatile compounds produced

Gas chromatograms of the headspace from the cultures showed a total of 24 different compounds. Of those, 20 were identified by their retention times and are listed in Table 5. As

an example, Fig. 3 shows the analysis of the run made with cassava bagasse complemented with leucine (run 7).

The major volatile compounds found in the headspace were alcohols, esters and, to a lesser extent, ketones. Alcohols do not play a predominant role in flavours but are known to contribute to the overall flavour quality and are precursors of fruit-like flavouring esters. In micro-organisms, such as yeasts, all alcohols, except ethanol, are formed by the reduction of α -keto acids which are derived from amino acid metabolism (Fincham, Day & Radford, 1979; Welsh *et al.*, 1989). For this reason leucine and valine, which are synthesized from pyruvate and α -ketoisovaleric acid (Shuler & Kargi, 1992), promote the synthesis of the corresponding alcohols (2-methyl propanol and 3-methyl butanol). These, in turn, can be esterified with acetic acid to form 2-methylpropyl and 3-methylbutyl acetates. The role of pyruvate or leucine was also demonstrated for the banana (Drawert & Berger, 1981). Amino acids derived from other metabolic pathways, such as lysine, asparagine, cysteine, tryptophan, tyrosine and phenyl alanine, were found not to enhance the banana aroma (data not shown).

From Table 5, it can be seen that some compounds (1, 2, 6, 10 and 13) were detected in the headspace of all the runs. The presence of the different compounds in the headspace depends on the concentration in the solid medium, its vapour pressure and the transfer through the cover of the flask. In this sense, the headspace analysis is biased against the less volatile substances. Nevertheless, some consistent patterns were found: 2-hexanol and 2-hexanone were found in similar concentrations in runs 2–9. Also, the headspace concentration of compounds 11, 16 and 19 was increased with the addition of leucine or valine. Moreover, for the runs containing these precursors, more volatile compounds were found and in

Table 6. Kinetic constants for the total volatile production according to the Compertz model

Run*	T_{max} ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	k (h^{-1})	t_{max} (h)	R^2
1	700	0.054	60.3	0.999
2	12937	0.063	47.9	0.999
3	1416	0.055	53.3	0.998
4	2421	0.045	61.5	0.997
5	20270	0.042	63.3	0.997
6	95*	0.057	64.2	0.999
7	20068	0.039	67.1	0.998
8	2280	0.041	60.8	0.999
9	9123	0.059	53.5	0.999

* As in Table 1.

the headspace: acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate and ethyl propionate with maxima values of $0.35 \mu\text{mol l}^{-1}$, $3 \mu\text{mol l}^{-1}$, $4.7 \mu\text{mol l}^{-1}$ and $0.6 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively (Fig. 5a). When complemented with urea, the culture also produced 3-methyl butanol and 3-methylbutyl acetate with concentrations of 0.1 and $0.35 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively (Fig. 5b). The first four compounds found were also present, with the N-supplement,

but only at slightly higher concentrations than without urea. When leucine was added to the medium, a large increase in the concentrations of the six compounds was observed, particularly ethyl acetate ($135 \mu\text{mol l}^{-1}$) and ethanol ($70 \mu\text{mol l}^{-1}$). In this case, 3-methylbutyl acetate was present ($2.1 \mu\text{mol l}^{-1}$) and the 3-methyl butanol concentration was increased to $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Fig. 5c). For the three experiments, maximum concentrations of these compounds were found at approx. the same times.

Cassava bagasse (runs 4–7). For this substrate, it may be observed in Fig. 6a, that the six compounds were produced without any N-supplement added to the medium. Although 3-methyl butanol and 3-methylbutyl acetate were found at low levels (0.25 and $0.45 \mu\text{mol l}^{-1}$), a medium banana-like aroma was detected in the headspace. This probably indicates that in the cassava bagasse, the amino acid precursors of the alcohol and the ester are more accessible to the mould than in wheat bran. This is confirmed by the next experiment (run 5) where cassava bagasse was complemented with leucine (Fig. 6c). In this case, the odour detected was much stronger (Table 2) and

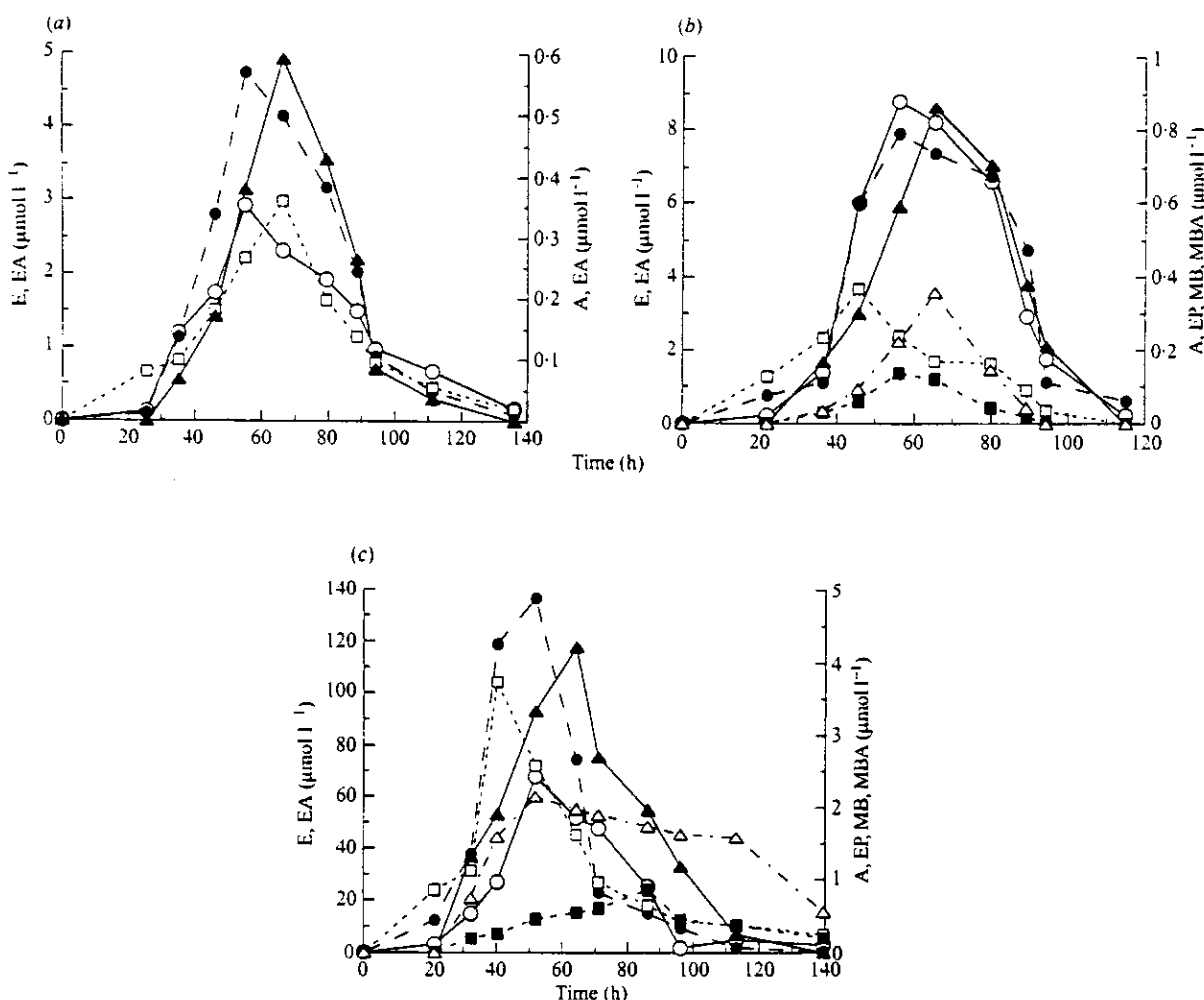


Fig. 5. Evolution of six key compounds in the headspace of cultures of *Ceratocystis fimbriata* grown on wheat bran. (a) No addition; (b) + urea; (c) + leucine. (○, E), Ethanol; (●, EA), ethyl acetate; (□, A), acetaldehyde; (▲, EP), ethyl propionate; (■, MB), 3-methyl butanol; (△, MBA), 3-methylbutyl acetate.

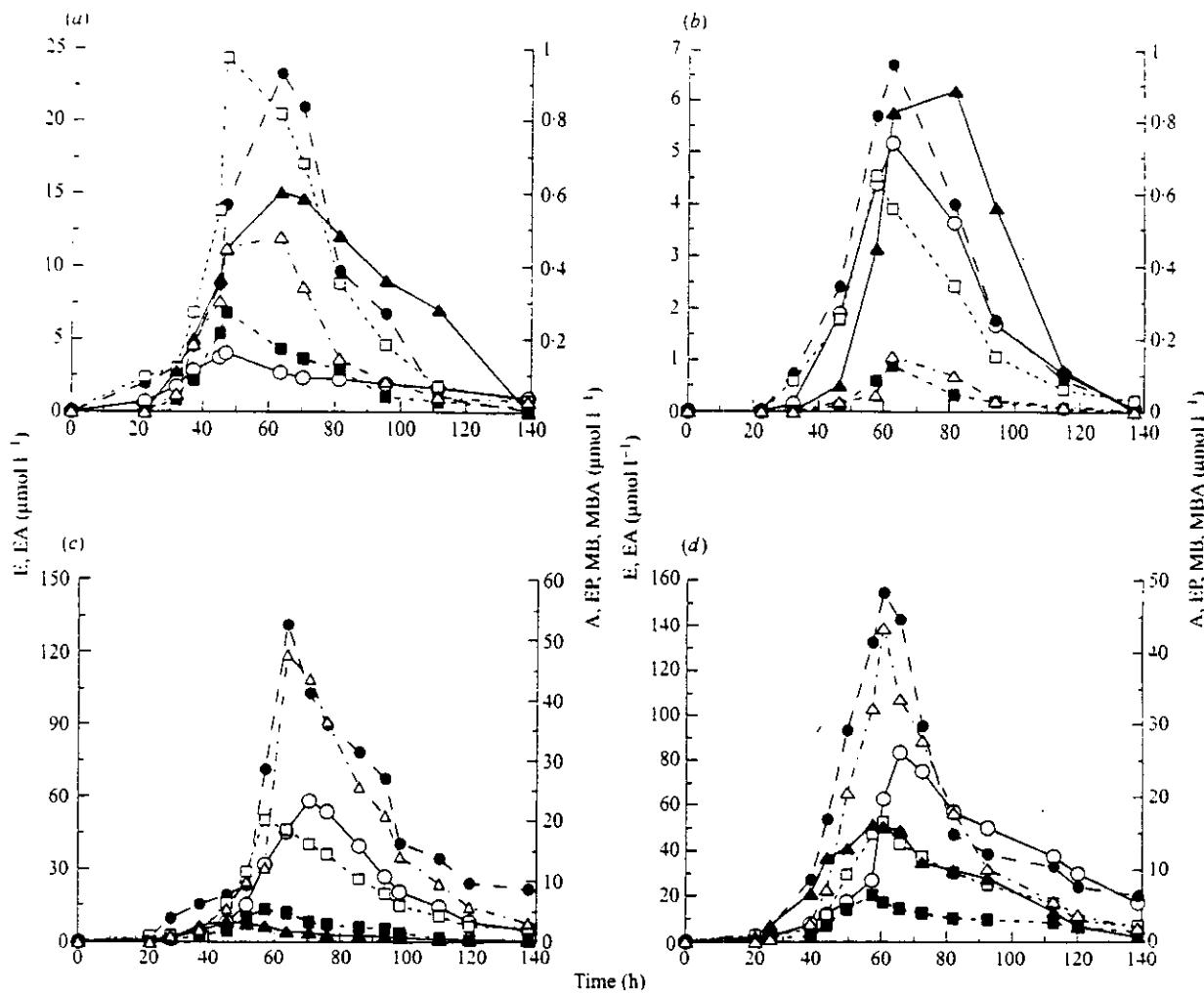


Fig. 6. Evolution of six key compounds in the headspace of cultures of *Ceratocystis fimbriata* grown on cassava bagasse. (a) No addition; (b) + urea; (c) + leucine; (d) + valine. (○, E), Ethanol; (●, EA), ethyl acetate; (□, A), acetaldehyde; (▲, EP), ethyl propionate; (■, MB), 3-methyl butanol; (△, MBA), 3-methylbutyl acetate.

the six metabolites were produced in higher amounts, attaining $132 \mu\text{mol l}^{-1}$ for ethyl acetate and $48 \mu\text{mol l}^{-1}$ for 3-methylbutyl acetate. Similar results were found when valine was added to the cassava bagasse (Fig. 6d). In contrast, the addition of urea to the medium did not promote the biosynthesis of these compounds (Fig. 6b).

Sugar cane bagasse + synthetic medium (runs 8 and 9). As in the case of wheat bran alone, no 3-methyl butanol nor its acetate ester were detected when this medium was used without any N-supplement (run 8 and Fig. 7a). However, the medium fruity odour detected may be due to the relatively high concentrations of ethyl acetate ($26 \mu\text{mol l}^{-1}$), ethyl propionate ($1.1 \mu\text{mol l}^{-1}$) and other compounds such as ethyl butyrate (Fig. 3). When leucine was added, growth on this medium gave a strong banana-like aroma due to the higher concentrations of ethyl acetate ($54 \mu\text{mol l}^{-1}$) and 3-methylbutyl acetate ($9.5 \mu\text{mol l}^{-1}$). Maximum concentrations of the volatiles were found at similar times to those for wheat bran and cassava bagasse substrates.

Wheat bran, cassava bagasse and sugar cane bagasse complemented with a synthetic medium are adequate sub-

strates for the growth of *Ceratocystis fimbriata*. Few volatiles were produced when each of the three substrates was used alone without supplement. Moreover, wheat bran culture exhibited no odour, cassava bagasse culture produced a weak banana odour while sugar cane bagasse + SM culture had a weak fruity odour. Aroma production for *C. fimbriata* was found to be growth associated. The production of volatile metabolites in general and of esters with fruity notes in particular was greatly enhanced (more than tenfold in some cases) by the addition of leucine or valine. Urea, when used as a supplementary nitrogen source, did not have the same effect. The production of 3-methylbutyl acetate and 3-methyl butanol was associated with the banana aroma which in turn increased in intensity as these compounds were overproduced under leucine or valine supplementation. In those cases, more volatile compounds, and these in larger amounts, were found in the culture headspace than when a banana was used as control, even though the aromas detected were similar in terms of quality and intensity. Integrated data were used to describe the accumulated production of CO_2 and TV. These data well fitted the logistic shaped Gompertz model. For both CO_2 and TV production, the parameters showed that total amounts (P_{max}) were dependent on the medium used.

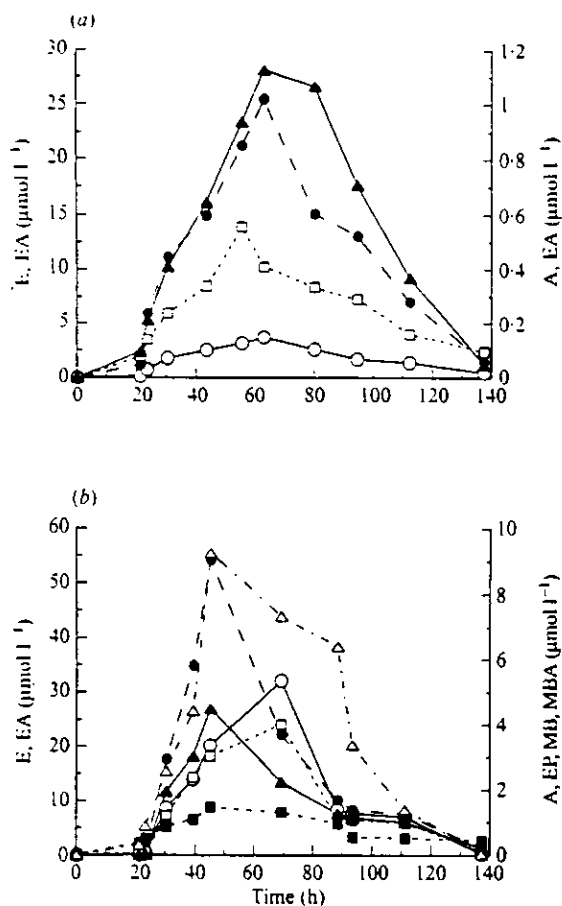


Fig. 7. Evolution of six key compounds in the headspace of cultures of *Ceratocystis fimbriata* grown on sugar cane bagasse + SM. (a) No addition; (b) + leucine. (○, E), Ethanol; (●, EA), ethyl acetate; (□, A), acetaldehyde; (▲, EP), ethyl propionate; (■, MB), 3-methyl butanol; (△, MBA), 3-methylbutyl acetate.

REFERENCES

- Berger, R. G. (1995). *Aroma Biotechnology*. Springer Verlag: Berlin.
- Bigelis, R. (1992). Flavor metabolites and enzymes from filamentous fungi. *Food Technology* **46**, 151-161.
- Christen, P., Auriá, R., Vega, C., Villegas, E. & Revah, S. (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances* **11**, 549-557.
- Christen, P. & Raimbault, M. (1991). Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters* **13**, 521-526.
- Christen, P., Raimbault, M., Meza, J. C., Villegas, E. & Revah, S. (1995). Production of fruit-like flavours by the fungus *Ceratocystis fimbriata*. In *Bioilavour '95* (ed. P. Etiévant & P. Schreier), pp. 279-282. INRA Editions: France.
- Christen, P., Villegas, E. & Revah, S. (1994). Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnology Letters* **16**, 1183-1188.
- Desgranges, C., Georges, M., Vergoignan, C. & Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. II. On-line measurements. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**, 206-209.
- Doelle, H. W., Mitchell, D. A. & Rolz, C. E. (1992). *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science: London, U.K.
- Drawert, F. & Berger, R. (1981). Possibilities of the biotechnological production of aroma substances by plant tissue cultures. In *Flavour '81* (ed. P. Schreier), pp. 509-527. W. de Gruyter & Co.: West Germany.
- Fincham, J. R. S., Day, P. R. & Radford, A. (1979). *Fungal Genetics*. University of California Press: Los Angeles, U.S.A.
- Gervais, P. & Sarrette, M. (1990). Influence of age of mycelium and water activity on aroma production by *Trichoderma viride*. *Journal of Fermentation Bioengineering* **69**, 46-50.
- Humphrey, M., Pearce, S. & Skill, B. (1990). Biotransformation of coconut fat to methyl ketones. A commercial scale solid-state fermentation. In *Abstracts of the Symposium on Bioformation of Flavours*. London.
- Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T. & Kobayashi, S. (1990). Volatile compounds produced by the fungus *Aspergillus oryzae* in rice koji and their changes during cultivation. *Journal of Fermentation Bioengineering* **70**, 169-172.
- Janssens, L., de Pooter, H. L., Schamp, N. M. & Vandamme, E. J. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* **27**, 195-215.
- Kaminski, E., Stawicki, S. & Wasowicz, E. (1974). Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and fungi imperfecti. *Applied Microbiology* **27**, 1001-1004.
- Lanza, E., Ko, K. H. & Palmer, J. K. (1976). Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 1247-1250.
- Meraz, M., Shirai, K., Larralde, P. & Revah, S. (1992). Studies on the bacterial acidification process of cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60**, 457-463.
- Mitchell, D. A. (1992). Biomass determination in solid-state cultivation. In *Solid substrate cultivation* (ed. H. W. Doelle, D. A. Mitchell & C. E. Rolz) pp. 53-63. Elsevier Applied Science: London, U.K.
- Pastore, G. M., Park, Y. K. & Min, D. B. (1994). Production of a fruity aroma by *Neurospora* from beiju. *Mycological Research* **98**, 1300-1302.
- Piendl, A. & Geiger, E. (1980). Technological factors in the formation of esters during fermentation. *The Brewer's Digest* **55**, 26-35.
- Senemaud, C. (1988). Les champignons filamenteux producteurs d'arômes fruités. Etudes de faisabilité sur substrats agro-industriels. Ph.D. Thesis. Université de Bourgogne (France).
- Shuler, M. L. & Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, U.S.A.
- Sugawara, E., Hashimoto, S., Sakurai, Y. & Kobayashi, A. (1994). Formation by yeast of the HEMF (4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone) aroma component in Miso with aging. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**, 1134-1135.
- Sunesson, A. L., Vaes, W. H. J., Nilsson, C. A., Blomquist, G., Andersson, B. & Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2911-2918.
- Welsh, F. W., Murray, W. D. & Williams, R. E. (1989). Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology* **9**, 105-169.
- Yamauchi, H., Akita, O., Obata, T., Amachi, T., Hara, S. & Yoshizawa, K. (1989). Production and application of a fruity odor in a solid-state culture of *Neurospora* sp. using pregelatinized polish rice. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 2881-2886.

(Accepted 3 December 1996)

Increased antifungal activity of 3- and 7-hydroxyflavone against *Cladosporium herbarum* and *Penicillium glabrum* through ester formation

HEIKE MARTINI¹, MARTIN WEIDENBÖRNER^{1*}, SUSANNE ADAMS¹ AND BENNO KUNZ¹

¹ Institut für Lebensmitteltechnologie Universität Bonn, Römerstraße 164, 53117 Bonn

² Institut für Angewandte Mikrobiologie Universität Giessen, Senckenbergstr. 3, 35390 Giessen, Germany

3- and 7-hydroxyflavone and their acetic acid esters were tested against *Cladosporium herbarum* and *Penicillium glabrum* for antifungal activity. The effect of the hydroxylated flavones was relatively low whereas the ester derivatives were substantially more active.

C. herbarum and *P. glabrum* are food-contaminating moulds capable of producing mycotoxins which are potentially dangerous to consumer health (Frisvad & Thrane, 1995). Although there are various chemical preservatives which inhibit mould growth in food (Krämer, 1997) advantages are seen in finding naturally occurring substances which would be equally suitable for the preservation of foods (Weidenbömer *et al.*, 1992; Kunz *et al.*, 1995). Consequently, flavonoids and isoflavonoids, which are natural components of plants with antifungal properties (O'Neill & Mansfield, 1982; Adesanya *et al.*, 1986; Weidenbömer *et al.*, 1990a; Weidenbömer & Jha, 1993), have been investigated. Rather high concentrations of these compounds are needed, however, to control fungal growth in food (Krämer *et al.*, 1984). Consideration has been given to increasing understanding of the mode of action of these natural fungicides and of improving their effectiveness through substitutions (Van Etten, 1976; Hedin & Waage, 1986; Weidenbömer & Jha, 1994a). There is evidence that their action is linked with lipophilicity (O'Neill & Mansfield, 1982; Arnoldi & Merlini, 1990; Weidenbömer *et al.*, 1990b; Lattanzio *et al.*, 1994), suggesting it may be possible to increase fungitoxicity by replacing a hydroxy group on a flavone molecule with an acetoxy group. Although it has been reported that such substitutions do not improve the activity of certain isoflavonoids (Weidenbömer & Jha, 1994b), no comparable studies have been made with flavonoids. Therefore, the following study was conducted to examine the antifungal properties of 3- and 7-hydroxyflavone in comparison with their acetic acid esters.

MATERIALS AND METHODS

The fungi used were *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling and *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, which often occur on food (Weidenbömer & Kunz, 1994).

3- and 7-hydroxyflavone were obtained from Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Germany). Their corresponding acetic acid esters were prepared by reaction with acetic anhydride in pyridine. The mixture was refluxed for 3 h under dry conditions, poured into ice water, and subsequently acidified with 1 N HCl. Then the ester was filtered, washed with water, and dried. All flavonoids were tested for antifungal activity against *P. glabrum* and *C. herbarum* at concentrations of 0.8, 3.5 and 8.0×10^{-3} mol l⁻¹ (Table 1).

The effect of the flavonoids on mycelium growth of the test fungi was investigated on solid medium (30 g malt extract, 15 g agar, 3 g peptone l⁻¹; in distilled water) using three different methods. The autoclaved medium (20 ml) was transferred to Petri dishes (90 mm) and allowed to solidify. Then 1 ml flavonoid solution, dissolved in either ethanol (method A) or acetone (method B), was pipetted onto the agar. After evaporation of the solvent (72 h) the dishes were inoculated with a small piece of mycelium (1 mm diam.). In method C the flavonoids were dissolved in acetone and incorporated directly into the agar at 50 °C. In this case, higher flavonoid concentrations (3.5 and 8.0×10^{-3} mol l⁻¹) were chosen, because in methods A and B the flavonoids (0.8×10^{-3} mol l⁻¹) were concentrated on the agar surface. Thus, comparable conditions applied within the three methods. The dishes were incubated at 25° in the dark.

Mycelium diameters of *C. herbarum* and *P. glabrum* were measured after 7 d. Evaluation was carried out by measuring the diameter of the colonies three times at different sites. The mean value of five repetitions for each experiment was used for calculation. The data were evaluated by analysis of variance. Probability of single differences was calculated at the 5% level.

RESULTS AND DISCUSSION

The substituted acetic acid esters were more active in reducing mycelium growth of *C. herbarum* and *P. glabrum* than were the

* Corresponding author.

Muñoz, A.G. and Agosin, E. 1993. Nitrogen involvement in nitrogen control of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4317-4322.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.

Rainbault, M. and Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209.

Takahashi, N. (Ed.) 1986. *The chemistry of plant hormones*. CRC Press, Boca Raton, USA.

Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation

P. CHRISTEN¹, J.C. MEZA² AND S. REVAH²

¹ORSTOM, A.P. 57297, C.P. 06502 Mexico DF, Mexico.

²Laboratorio de Bioprocesos, IPH, UAM-Iztapalapa, A.P. 55-534, 09340 Mexico DF., Mexico.

SUMMARY

Production of fruity aroma in solid state fermentation (SSF) by the fungus *Ceratocystis fimbriata* has been studied, with respect to the nature of the support/substrate, the importance of added precursors in the medium and the aeration. The aroma were characterized by the sniffing technique and GC headspace analysis, while the growth was followed by respirometry. Wheat bran, cassava and sugarcane bagasse were adequate for growth and aroma production. The nutritive media with a higher glucose concentration (200 g/l) gave a strong apple aroma, while media containing amino acids precursors, such as leucine and valine, gave strong banana aroma. Aroma production was growth dependent and the maximum aroma intensity was detected a few hours, before or after the maximum respirometric activity (0.8 to 1.6 ml CO₂ / h. g dry matter, after 24 h). Experiments carried out under various aeration rates (5 and 50 ml/h. g dry matter) showed that this parameter was not limiting for growth, even if the exit gas was very poor in oxygen at the lower aeration rate, giving in this case the most intense aroma. For experiments carried out without forced aeration, the same aroma were also found with higher intensity. Fourteen compounds have been separated by GC headspace and 11 of these were identified. Major compounds included acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate, isoamyl acetate and isoamyl alcohol.

Keywords: Solid state fermentation, *Ceratocystis fimbriata*, fruity aroma, substrates, support, precursors, aeration, respirometry, apple aroma, banana aroma, growth dependence.

RESUME

Production d'arômes fruités par *Ceratocystis fimbriata* cultivé en fermentation solide.

CHRISTEN P., MEZA J.C. ET REVAH S.

La production d'arômes fruités en fermentation solide (FMS) par un champignon filamentueux *Ceratocystis fimbriata* a été étudiée en vue d'estimer l'influence de la nature du substrat et du support, de la présence dans le milieu de culture de précurseurs d'arômes et enfin du taux d'aération des cultures sur la qualité des arômes obtenus. Les arômes produits ont été caractérisés par la technique du «sniffing» et la croissance microbienne a été suivie par respirométrie. Le son de blé, le manioc et la bagasse de canne à sucre ont été utilisés pour la culture et la production d'arômes. Les milieux de cultures à forte concentration de glucose (200 g/l) donnent un puissant arôme de poire ou de pomme, alors que les milieux riches en acides aminés tels que la leucine et la valine favorisent la production d'arôme de banane. Il a été démontré que la production d'arôme est fonction de la croissance et l'intensité maximale a été détectée quelques heures après l'activité respirométrique maximale (elle varie entre 0,8 et 1,6 ml CO₂/h.g matière sèche après 24 heures). Des essais réalisés avec différents taux d'aération (5 et 50 ml/h.g matière sèche) ont montré que ce paramètre n'est pas limitant pour la croissance, même si pour des taux d'aération faibles, les effluents gazeux à la sortie du fermenteur sont pauvres en O₂. Dans ce dernier cas, comme pour des fermentations réalisées sans aération forcée, les mêmes arômes ont été détectés, mais à des intensités plus fortes. Quatorze composés ont été séparés par CPG parmi lesquels onze ont pu être identifiés. Les composés majoritaires ont été les suivants: acétaldéhyde, éthanol, ethyl acétate, isoamyl acétate et isoamyl alcool.

Mots clés: Fermentation en milieu solide, *Ceratocystis fimbriata*, arômes fruités, substrats, support, précurseurs, aération, respirométrie, arôme de pomme, arôme de banane, croissance limitée.

INTRODUCTION

Microorganisms play an important role in the generation of natural flavouring compounds, particularly food aroma. A number of the extensive reviews dealing

with flavour generation by microorganisms are available (Lairasse *et al.*, 1985; Welsh *et al.*, 1989; Janssens *et al.*, 1992). As pointed out recently by Bigelis (1992) and Christen (1995), filamentous fungi are especially interesting, because they are able to produce flavouring compounds or flavours-related enzymes. Recently, the production of aroma in SSF has been reported. Yamauchi *et al.* (1989) obtained a fruity odour by growing a *Neurospora* strain on pregelatinized rice. Gervais and Sarrette (1990) studied the production of coconut aroma by *Trichoderma viride* on agar, while Humphrey *et al.* (1990) patented a process, where an *Aspergillus* strain grown on cellulose fibers produced methyl ketones from coconut oil. Moreover, the capacity of some moulds from the genus *Ceratocystis* to produce fruit-like aroma has already been demonstrated (Hanssen and Sprecher, 1981; Senemaud 1988; Clunsten *et al.*, 1994). In this work, the ability of *Ceratocystis fimbriata* to produce aroma in SSF was explored. It involved the study on the influence of the substrates/supports, the aeration flow rates and the precursors, on both growth and aroma production.

MATERIAL AND METHODS

ORGANISM AND CULTURE MEDIA

Ceratocystis fimbriata CBS 374-83 was used. It was periodically transferred onto potato dextrose agar (PDA) slants and stored at 4°C. Four substrates / supports were used: wheat bran, sugarcane bagasse, cassava and an anionic resin (Amberlite IRA-900, Rohm and Haas, USA). These were prepared according to Christen *et al.* (1993). When forced aeration (packed bed) was used, the cultures were carried out in small columns placed in temperature controlled bath. Experiments without forced aeration (surface culture) were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks, covered with gauze or tight-sealed. The reactors were filled with 7.5 g initial dry matter (IDM) for wheat bran and Amberlite, and 5.25 g IDM for bagasse and cassava. For all experiments, initial conditions were: temperature, 30°C; pH, 6; and inoculum size 1x10⁷ spores/g IDM. Aeration rates were 50 or 5 ml/h.g IDM. Initial water content was calculated, according to the maximum adsorption capacity of each support (wheat bran, 50%, Amberlite, 58%; sugarcane bagasse, 63% and cassava, 65%). Culture conditions are given in tables 1 and 2; Nutritive medium SM is the synthetic medium optimized by Christen and Raimbault (1991), and contained 200 g/l of glucose. In all cases, an oligoelement solution, previously used by these authors, was added. Urea, leucine and valine (167 nmol/l) were used as a nitrogen source and/or precursor of the aroma.

ANALYTICAL PROCEDURES.

The odours of the cultures were determined by sensory evaluation by a non-trained panel, consisting of six members, with no restriction in descriptive terms. Growth was characterized by respirometry and measured by gas chromatography. For packed column experiments, this allowed the calculation of the carbon dioxide production rate, the oxygen uptake rate and the respiratory quotient (RQ) (Christen *et al.*, 1993). For surface cultures, O₂ consumption and CO₂ evolution were followed. Water activity and pH were also determined at the end of the fermentation. Volatiles produced during the fermentation were characterized by gas chromatography (Hewlett-Packard 5890, equipped with a Megabore HP-1 column (length, 5 m) and with a flame ionization detector) of headspace vapor from the cultures (only for experiments without forced aeration). Temperatures were: injector and detector, 210°C, oven held at 40°C during 2 min and then programmed at 10°C/min to 150°C. The nitrogen gas flow rate was 1.5 ml/min and split ratio 1:32.

Table 1. Culture conditions for experiments with forced aeration

Run	Substrate/Support	Nutritive media	Aeration rate (ml/h.g)
1	Amberlite	Potato broth	50
2	Amberlite	Potato broth	5
3	Amberlite	SM	5
4	Wheat bran	Urea	50
5	Wheat bran	-	5
6	Wheat bran	Urea	5
7	Wheat bran	Leucine	5
8	Wheat bran	Valine	5
9	Sugarcane bagasse	SM	5
10	Sugarcane bagasse	Potato broth+glucose	5

Table 2. Culture conditions for experiments without forced aeration. Each experiment was made in both gauze and tight-sealed flasks.

Run	Substrate/Support	Nutritive media
11	Wheat bran	-
12	Wheat bran	SM
13	Wheat bran	Leucine
14	Wheat bran	Urea
15	Cassava	-
16	Cassava	SM
17	Cassava	Leucine
18	Cassava	Urea
19	Sugarcane bagasse	SM + leucine

RESULTS AND DISCUSSION

PACKED CULTURES EXPERIMENTS WITH FORCED AERATION

At the higher aeration rate (50 ml/h.g IDM in runs 1 and 4), negligible or poor aroma was detected (Table 3). It can be assumed that the high aeration rate swept away the volatiles produced and/or oxygenated conditions reduced the synthesis of such molecules. This is why a very low aeration rate was then used (5 ml/h.g IDM). In such cases, the overall aroma detected (pear/apple and banana) were stronger. Leucine and valine, when added to the medium, served as a precursor for the development of the banana aroma (runs 7 and 8). This fruity aroma appeared very rapidly (before the first 24 h) in these cases. When no precursor was used, pear/apple aroma was also detected (runs 4, 5, 6, 9 and 10). In runs 9 and 10, two successive kinds of aroma were detected, first the pear/apple one and then at 5 days a strong peach aroma. Using this aeration rate, lower maximum CO₂ production rates were observed (less than 1.3 ml/h.g IDM), which indicated that growth was limited and volatile metabolites production was favoured in poorly aerated media. In terms of support evaluation, wheat bran (supplemented or not) and supplemented bagasse, gave a better result compared with Amberlite. In all cases, water activity was maintained at a satisfactory level, but the pH at the end of fermentation was alkaline

(for wheat bran) or acidic (for bagasse). In all cases, no compounds were detected in headspace analysis of the cultures.

Table 3. Aroma production in packed culture under forced aeration

Run	Aroma and intensity	Tmax (h) #	CDPR max (ml/h.g)	Aw final	pH final
1			2.58	0.996	6.76
2	Banana +, then pear/apple +	67 / 91	0.95	0.973	3.05
3	Banana +	91	0.89	0.990	2.65
4	Pear/apple +	42	2.45	0.983	8.76
5	Pear/apple ++	17	1.30	0.988	9.06
6	Pear/apple ++	39	1.04	0.985	8.95
7	Banana +++	17	0.72	0.989	9.03
8	Banana +++	17	0.79	0.990	9.06
9	Pear/apple +, then peach +++	20 / 91	0.84	0.993	2.71
10	Pear/apple ++, then peach ++	68 / 116	0.70	0.998	6.24

-: none, +: weak, ++: medium, +++: strong; #: T max, time of maximum aroma perception. CDPR: CO₂ production rate, ml/h.g IDM.

The maximum aroma was detected, just before or after the maximum in CO₂ production rate was attained. Interestingly aroma production was found to be related to growth.

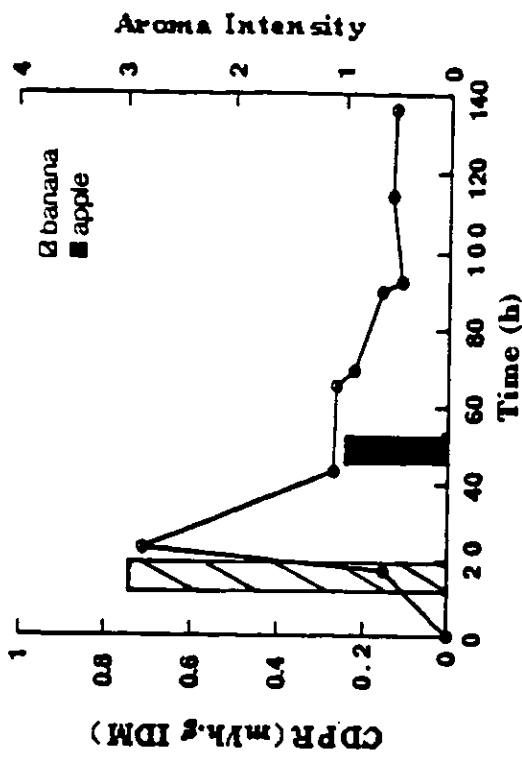


Fig. 1. CO₂ production rate and aroma production by *C. fimbriata* grown on wheat bran supplemented with leucine (aeration rate = 5 ml/h.g IDM).

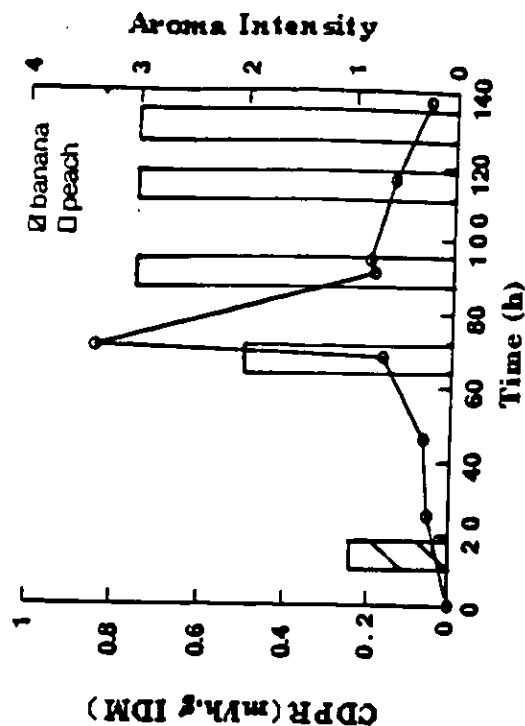


Fig. 2. CO₂ production rate and aroma production by *C. fimbriata* grown on sugarcane bagasse supplemented with synthetic medium (aeration rate = 5 ml/h.g IDM).

SURFACE CULTURES EXPERIMENTS WITHOUT FORCED AERATION

In this case, 9 combinations were tested, and in each case, experiments were carried out using a gauze cover (static culture) tightly-sealed (without aeration). Sensory evaluation was only possible in the former case. In the second case, respiration was characterized by O₂ (%) consumption and CO₂ (%) accumulation in the flask. Results are presented in Table 4.

Table 4. Results of aroma production in surface cultures without forced aeration.

Run	Aroma and intensity (1)	T max (h) #	CDPR max (ml/h.g) (1)	CO ₂ max (%) (2)
11	-	-	1.15	11.3
12	apple / pear ++	44	0.06	81.3
13	banana +++	36	0.16	31.5
14	apple / pear ++	41	1.23	22.3
15	banana ++	40	0.2	36.7
16	-	-	0.9	62.5
17	banana +++	40	0.2	29.6
18	-	-	0.45	7.3
19	banana +++	39	0.08	46.9

∴ none, +: weak, ++: medium, +++: strong. #: T max, time of maximum perception of the aroma. CDPR: CO₂ production rate in ml/hour/g IDM. 1 refers to gauze covered flask cultures and 2 to tight-sealed flask cultures.

All three substrates/support were found to allow growth and aroma production in aerated conditions. Aroma production was higher in forced aeration. The strongest aroma detected (banana) corresponded to that case where media were enriched with leucine (runs 13, 17, 19), while pear/apple aroma, of a lower intensity, was obtained in wheat bran culture with synthetic medium and urea (runs 12 and 14). These aroma had major intensity between the first and the second days. In tight-sealed flask cultures, growth was observed. As growth and substrate fermentation evolved, CO₂ was produced and the internal pressure increased. This pressure was released during sampling, which provoked the increase in CO₂ concentration up to 81%. These values of CO₂ were coupled with low O₂ (less than 2% of residual oxygen), which channelled the metabolism towards the fermentative route. No Sensory evaluation

was made for tightly-sealed flask cultures, but large amounts of volatiles were produced (Fig. 3).

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF GC DETECTED COMPOUNDS

Fig. 3 gives headspace chromatograms of gauze covered aerated and light-sealed cultures of run 19. Fourteen compounds were detected. Eleven compounds were identified through retention time comparison with a standard and could be classified according to their relative quantity (peak area). Ethanol, ethyl acetate, ethyl propionate and isoamyl acetate in major; acetaldehyde, isoamyl alcohol and isobutyl acetate in intermediate and 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol and amyl acetate in small amounts are formed. Among them, isoamyl acetate and isoamyl alcohol are known to be the major compounds in the banana aroma, while acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate are always present in fruit aroma. Other minor compounds, like ethyl propionate and isobutyl acetate are also reported to be present in fruit aroma. Some differences can be observed between gauze covered and tightly-sealed cultures. Acetaldehyde peak is bigger, ethyl propionate peak is smaller and unknown peak #13 is absent in the latter. Unfortunately, it is not possible to evaluate directly the impact of these differences on the aroma.

CONCLUSION

Wheat bran, cassava and sugarcane bagasse were found to be adequate substrates/support for aroma production by *C. fimbriata*. Amino acids, such as valine or leucine, direct banana-like aroma. Other aroma (peach, apple) were also detected in the absence of any precursor. The corresponding compounds of banana aroma (isoamyl alcohol and isoamyl acetate) were detected in the headspace of the culture at relatively high amounts. A total of 14 compounds were separated by GC, and, among them, 11 were identified (1 aldehyde, 5 alcohols and 5 esters). Work is currently continued to identify the unknown peaks and to quantify the identified compounds. Very low aeration (5 ml/h.g IDM) or passive diffusion favoured the production of strong aroma. Results were highly improved in these conditions, in comparison with those obtained by Christen *et al* (1994) at higher aeration rates. In the tightly-sealed flasks, the fungus was able to ferment the carbohydrates present in the medium (glucose in the case of bagasse, starch in the case of wheat bran and cassava). The fact that very low or no aeration is required opens interesting technological perspectives for the production of fruity aroma by *C. fimbriata*.

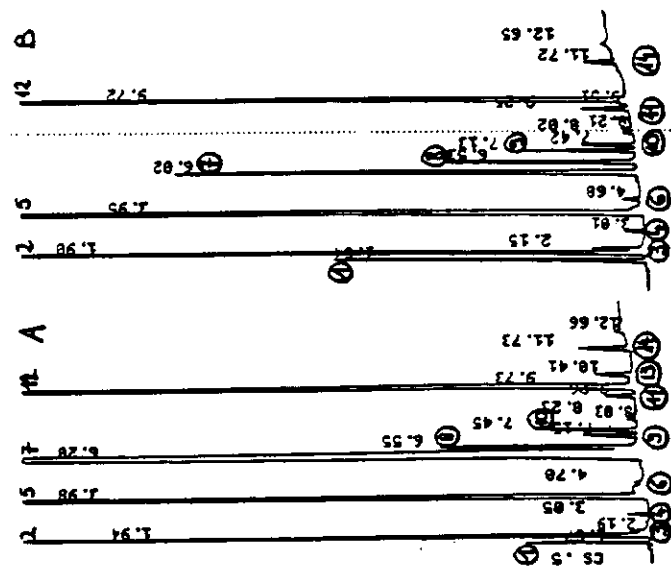


Fig. 3. Headspace chromatograms of 48 h cultures of gauze covered (A) and light-sealed (B) cultures of *C. fimbriata* grown on bagasse + synthetic medium (glucose = 200 g/l). 1: acetaldehyde, 2: ethanol, 3: 2-propanol, 4: 1-propanol, 5: ethyl acetate, 6: 1-butanol, 7: ethyl propionate, 8: isoamyl alcohol, 9: unknown, 10: isobutyl acetate, 11: unknown, 12: isoamyl acetate, 13: unknown, 14: amyl acetate.

REFERENCES

- Berger, R. G. 1995. *Aroma biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, 240 Pp
- Bigelis, R. 1992. Flavor metabolites and enzymes from filamentous fungi. *Food Technol.* 46: 151-161.
- Christen, P. and Raimbault, M. 1991. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnol. Lett.* 13: 521-526.
- Christen, P., Auria, R., Vega, C., Villegas, E. and Revah, S. 1993. Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotech. Adv.* 11: 549-557.
- Christen, P., Villegas, E. and Revah, S. 1994. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnol. Lett.* 16: 1183-1188.
- Christen, P. 1995. Producción de aromas en fermentación sólida. *Tópicos de Investigación y Docencia* 4: 102-109.
- Gervais, P. and Sarrette, M. 1990. Influence of age of mycelium and water activity on aroma production by *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* 69: 46-50
- Hanssen, H.P. and Sprecher, E. 1981. Aroma-producing fungi: Influence of strain specificity and culture conditions on aroma production. In: Schreier P. (Ed.), *Flavour '81*, W. de Gruyter and Co, West Germany, pp 547-556..
- Humphrey, M., Pearce, S. and Skill, B. 1990. Biotransformation of coconut fat to methyl ketones: A commercial scale solid-state fermentation. *Abst. Symp. Bioformation of Flavours*. London.
- Janssens, L., de Pooter, H.L., Schamp, N.M. and Vandamme, E.J. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem.* 27: 195-215.
- Latrasse, A., Degorce-Dumas, J.R. and Leveau, J.Y. 1985. Production d'arômes par les microorganismes. *Sci. Alim.* 5: 1-26.
- Senemaud, C. 1988. Les champignons filamenteux producteurs d'arômes fruités. Etudes de faisabilité sur substrats agro-industriels. *Ph. D. Thesis*, Université de Bourgogne (France), 170p.
- Welsh, F.W., Murray, W.D. and Williams, R.E. 1989. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotech.* 9: 105-169.
- Yamauchi, H., Akita, O., Obata, T., Amachi, T., Hara, S. and Yoshizawa, K. 1989. Production and application of a fruity odour in a solid-state culture of *Neurospora sp.* using pregelatinized polish rice. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2881-2886.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Advances in Soil State Fermentation

Proceedings of the 1987 International Symposium
on Soil State Fermentation

Montpellier, France



S. Roussel, B. E. Logan, M. Sambout and G. Yin

Kluwer Academic Publishers

A C.I.P. Catalogue record for this book is available from the Library of Congress

ISBN 0-7923-4732-3

Published by Kluwer Academic Publishers,
P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.

Sold and distributed in the U.S.A. and Canada
by Kluwer Academic Publishers,
101 Philip Drive, Norwell, MA 02061, U.S.A.

In all other countries, sold and distributed
by Kluwer Academic Publishers,
P.O. Box 322, 3300 AH Dordrecht, The Netherlands.

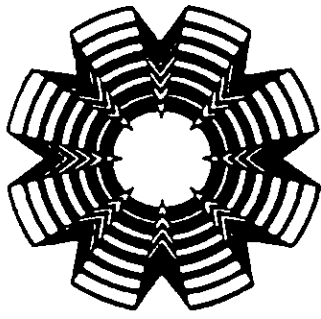
Printed on acid-free paper

All Rights Reserved

© 1997 Kluwer Academic Publishers

No part of the material protected by this copyright notice may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or by any information storage and retrieval system, without written permission from the copyright owner.

Printed in the Netherlands



**SOCIEDAD MEXICANA DE
BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA, A.C.**

Otorga la siguiente

C O N S T A N C I A

A: J.C. Meza, S. Revah, P. Christen.

Por su trabajo
titulado:

**Influencia de la aireación y condiciones de cultivo sobre el
crecimiento y la producción de aromas frutales por el hongo C.
frimbiata cultivada en fermentación sólida.**

Por su participación, en el

**VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y
II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos**

celebrado en Mazatlán, Sinaloa del 8 al 12 de Septiembre de 1997.

Dr. Enrique Galindo F.
Presidente
Comité Organizador

Dr. Mariano Gutiérrez R.
Presidente
S.M.B.B.

XI CONGRESO NACIONAL DE INGENIERIA BIOQUIMICA

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COLEGIO NACIONAL DE INGENIEROS BIOQUIMICOS, A. C.

OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

AL TRABAJO INTITULADO "FERMENTACION EN
METODO SOLIDO: UNA ALTERNATIVA PARA
LA PRODUCCION DE AROMAS FRUTALES POR
Ceratocystis fimbriata" PRESENTADO POR:

MEZA J. C.,
REVAH S.,
CHRISTEN P.

POR HABERSE CONSIDERADO POR EL COMITE EVALUADOR DEL
XI CONGRESO NACIONAL DE INGENIERIA BIOQUIMICA
COMO UNO DE LOS MEJORES PRESENTADOS
EN LA MODALIDAD DE POSTER.

México D. F., 15 de Noviembre de 1996


DR. JAVIER PEREZ VILLASEÑOR
Presidente del Congreso


M. EN C. ALICIA ORTIZ MORENO
Presidenta del Comité Científico

ABSTRACT FORM

BIOFLAVOUR 95 - DIJON, Feb. 14 - 17th, 1995

DEADLINE : September 1st, 1994

Production of fruit-like flavours by the fungus *Ceratocystis fimbriata*. P. CHRISTEN¹, M. RAIMBAULT², E. VILLEGAS, S. REVAH, Universidad Autonoma Metropolitana - Iztapalapa, Dpto IPH, Ap. Postal 55-534, CP 09340, Mexico DF, MEXICO.

¹ ORSTOM Mexico, Ciceron 609, Col. Los Morales, CP 11530, Mexico DF, MEXICO. ² ORSTOM Colombie.

The production of fruit-like aromas by *Ceratocystis fimbriata* was studied in liquid and solid cultures.

In liquid culture, the mould was able to produce fruity notes such as pear, apple, banana, pineapple, etc... according to the carbon and the nitrogen sources employed. In particular, a combination of glucose and urea/ammonium sulfate was used to produce a strong banana-like aroma. This medium was successfully optimized by a fractional factorial design. Ten compounds were separated by HPLC and among them, ethanol, acetic acid and ethyl acetate were identified.

In solid state culture, the growth of the mould was studied on wheat bran, sugarcane bagasse and a synthetic resin (Amberlite) complemented with the nutritive medium previously optimized. While growth, followed on-line by respirometry, was abundant on both natural supports, the aromas detected by sniffing were not strong as those obtained in liquid culture.

Société Française de Microbiologie

COLLOQUE :

REUNION DU RESEAU DE MYCOLOGIE

Lyon, 23-24 janvier 1997

INSTRUCTIONS

1. La totalité du résumé (y compris les noms et adresses des auteurs) doit contenir dans le cadre défini ci-contre. Tout ce qui débordera de ce cadre sera tronqué lors de l'impression.

2. Le résumé sera reproduit tel quel. Le taper avec soin. Eviter les grattages et autres corrections. Utiliser un interligne simple. Nous adresser la frappe originale.

3. Le résumé doit être riche en information, sans phraséologie inutile. Eviter "les résultats seront discutés...", "seront présentés...", "ont été étudiés"...

4. Taper le titre en majuscule en première ligne (si possible en double frappe = caractère gras). Sauter une ligne. Taper les noms des auteurs en lettres majuscules (simple frappe = caractère maigre). Aller à la ligne (sans sauter de ligne) pour taper l'adresse complète (lettres minuscules sauf initiales). Sauter une ligne et taper le texte.

5. Tableaux, figures (au trait) et bibliographie sont acceptables si l'ensemble du résumé tient dans le cadre imposé.

6. Adresser le résumé à : **la S.F.M.***

Date limite : 30 ~~juin~~ ~~1996~~

MODELE DE RESUME

PRODUCTION DE METABOLITES VOLATILS PAR DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CULTIVES SUR DES SUBSTRATS AGRO-INDUSTRIELS SOLIDES

P. CHRISTEN^{1,2}, J.C. MEZA¹, A. BRAMORSKI³, S. REVAH¹

1. Laboratoire des Bio-Procédés, Université Autonome Métropolitaine - Iztapalapa, AP 55534, CP 09340, México DF, México.

2. ORSTOM - Mexico, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, AP 57297, CP 06501 Mexico DF, Mexique.

3. Laboratoire des Procédés Biotechnologiques, Université Fédérale du Paraná, CP 19011, 81531-970, Curitiba, PR, Brésil.

Le son de blé, la bagasse de manioc et la bagasse de canne à sucre complétée avec un milieu nutritif synthétique simple sont des substrats adéquats pour la production de substances d'arômes par le champignon filamenteux *Ceratocystis fimbriata*. En Erlenmeyer, ce champignon produit en trois jours un arôme fruité intense proche de celui de la banane. Cependant, le profil chromatographique, ainsi que la qualité et l'intensité de l'odeur, dépendent du substrat utilisé. Vingt quatre composés ont été mis en évidence dans l'espace de tête de la culture et 20 ont été identifiés: 7 alcools, 1 aldéhyde, 4 cétones et 8 esters dont l'acétate de 3-méthyl butanol, responsable de l'intense arôme "banane" perçu. L'étude respirométrique a montré que la production des métabolites volatils était liée à la phase de croissance exponentielle. Par ailleurs, l'addition de certains composés comme la valine ou la leucine a permis d'augmenter plus de 10 fois la concentration totale des métabolites volatils dans l'espace de tête; en particulier celles du 2-méthyl propanol, du 3-méthyl butanol et des acétates correspondant démontrant que la biosynthèse de ces composés était liée au métabolisme de certains acides aminés. Dans ce cas là, il existe une relation de type Monod entre la concentration d'acide aminé ajouté et la quantité de volatils produits. L'addition d'autres précurseurs azotés (urée, sulfate d'ammonium, arginine, lysine, histidine, etc...) a stimulé la croissance (et l'activité respiratoire) du champignon sans pour autant améliorer la production d'arômes.

Une étude faite avec quatre souches de *Rhizopus* cultivées sur plusieurs combinaisons de substrats agro-industriels solides tels que la bagasse de manioc, la bagasse de pomme, le grain d'amarante ou de soja a montré que les meilleurs milieux pour la croissance sont ceux ayant une relation carbone/azote proche de 20. Dans tous les cas, l'activité respiratoire atteint son maximum autour des premières 24 heures. L'arôme produit est agréable bien que peu spécifique et il diffère peu d'une souche à l'autre. Peu de molécules sont présentes dans l'espace de tête de la culture: l'acétaldéhyde, l'éthanol, l'acétate et le propionate d'éthyle et le 3-méthyl butanol sont les composés rencontrés le plus souvent. Le milieu composé d'amarante additionné d'une solution de sels minéraux simple a présenté l'arôme le plus intense ainsi que la plus forte production de volatils, prouvant ainsi qu'il était possible d'améliorer sensiblement l'arôme d'aliments fermentés par *Rhizopus*.