

66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFECTO DE LA TIAMINA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE AROMAS EN

Ceratocystis fimbriata

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q.F.B.

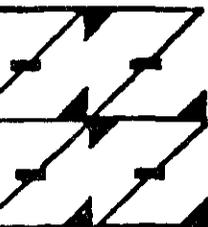
P r e s e n t a:

SORIANO LÓPEZ MIRIAM

DIRECTOR DE TESIS

M.en C. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA FIGUEROA

2023



LO HUMANO
ES
NUESTRA REFLEXION



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

Primeramente agradezco a Dios porque durante el trayecto que he recorrido Él siempre ha estado conmigo, y aunque no ha sido fácil por las circunstancias que se han presentado, ahora me permite terminar una etapa de mi vida e iniciar con otra. Sé que lo que falta tampoco será fácil, pero tengo fe en que "Todo lo puedo en Cristo que me fortalece".

A mis Padres:

Agradezco a mis Padres, Teresa López Quiroz y Ricardo Soriano Camargo por todo su amor, apoyo, comprensión, consejos y el ejemplo que me han brindado, durante todos estos años.

A mis hermanas:

Nancy Edith y Atzayaly por estar conmigo y por ser mis mejores amigas.

A mis amigos:

Jorge Huerta Gómez por todos sus consejos y el apoyo moral que me ha brindado desde que lo conozco.

Lilia Tequianes B., Miriam Hinojosa, Marco Antonio Cora, Enrique Tequianes B., Enrique Gutiérrez A., Asalia Gómez, Marcela Ramírez C. David Gómez L., gracias por ser mis amigos, por apoyarme, y escucharme cuando más lo necesité.

A la Maestra Leonora:

Gracias por ser mi Amiga, y Maestra.

A mis Sinodales:

Gracias por las enseñanzas que me dieron, por su tiempo y contribuciones que aportaron a este trabajo.

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, nombró como Sinodales del Exámen Profesional a los siguientes profesores:

PRESIDENTE M. en C. FCA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA
FIGUEROA

VOCAL Q.B.P. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

SECRETARIO ING. ABEL BLANCAS CABRERA

SUPLENTE Q.F.B. MA. DEL ROCÍO BRECEDA HERNÁNDEZ

SUPLENTE I.B.Q. SUSANA MÉNDEZ VÁZQUEZ

Efecto de la tiamina sobre el crecimiento
y la producción de aromas en

Ceratocystis fimbriata

Tabla de contenido

Introducción	1
Fundamentación teórica	3
Planteamiento del problema	25
Objetivos	26
Hipótesis	27
Material y métodos	28
Resultados	40
Análisis de resultados	57
Conclusiones	68
Recomendaciones	69
Anexos	
Anexo 1	
Cinéticas de crecimiento con esporas T+ y T-	71
Anexo 2	
Regresión polinomial de acetato de isobutilo (ejemplo)	73
Referencias bibliográficas	75

INTRODUCCIÓN

Inicialmente, la preparación de aromas estuvo orientada a la combinación de los ingredientes aromáticos. Este desarrollo ocurrió casi exclusivamente en el sector de las bebidas alcohólicas, sin embargo, cuando los químicos fueron capaces de aislar y sintetizar otras variedades interesantes, se dio inicio a la imitación de aromas frutales.⁽¹⁾

Cada ingrediente del aroma confiere un olor característico, pero los productos capaces de conferir el olor y sabor al alimento se encuentran en combinaciones de varios ingredientes. La naturaleza sigue los mismos patrones, por ejemplo, en las frutas, el aroma es en casi todos los casos una mezcla de ingredientes químicos definidos.^(1, 2)

Actualmente, la industria de los aromas ha evolucionado, pero continúa persiguiendo nuevas metas, entre las que pueden mencionarse las siguientes:

1. Identificar y sintetizar los ingredientes de los aromas que se encuentran en la naturaleza, así como la creación de nuevas moléculas.
2. Presentar a los consumidores aromas convencionales y no convencionales que sean aceptables.
3. Considerando que un gran número de alimentos, adquieren sus sabores y aromas durante su preparación, la industria de los alimentos necesita adicionar al alimento, los aromas y saborizantes, cuando por alguna razón no se dupliquen las condiciones de preparación convencionales.⁽¹⁾

La industria de los alimentos ha extendido sus horizontes y en estos tiempos la biotecnología ha tenido un gran impacto en diversos sectores tecnológicos como son: alimentos, agricultura, farmacia, diagnóstico, químico, energético, ambiental, etc. Sin embargo, actualmente, este impacto parece apuntar a favor del sector alimentario, ya que éste último es, en términos de mercado, el mayor usuario de los procesos biotecnológicos.^(1, 2, 3)

Aunque son diversas las áreas de la industria alimentaria en las que la biotecnología ha incursionado, el campo de los aromas, es uno de los más importantes tanto en el aspecto económico como en el tecnológico.⁽¹⁾

En el aspecto económico las ventajas son varias: 1) se reducen los costos, 2) se estandariza la calidad y 3) se termina con la dependencia de factores especulativos tales como la disponibilidad de materias primas. Las ventajas técnicas son 1) la posibilidad de tener a la mano los constituyentes de un olor determinado, 2) las formas de dosificación permiten adicionarlo al alimento de forma que antes era imposible preparar al utilizar ingredientes aromáticos obtenidos de fuentes naturales.⁽¹⁾

En conclusión, el conocimiento y la disponibilidad de los constituyentes esenciales de un aroma permiten, el uso único de aquellas sustancias que son directamente las responsables de conferir el aroma y eliminar aquellos que interfieren con la actividad o estabilidad del alimento.⁽¹⁾

Considerando las ventajas que ofrece a la industria de los alimentos la manipulación de las sustancias responsables de conferir aroma, sabor y potenciar un sabor específico, la biotecnología se ha

servido de microorganismos que son capaces de generar compuestos naturales. En especial, los hongos filamentosos pueden producir aromas y enzimas relacionados con el aroma y sabor. (2,4,5)

Ceratocystis fimbriata es un hongo filamentosos del cual se ha reportado que puede producir aromas frutales (principalmente aroma a plátano), dependiendo de los sustratos que se encuentren en el medio de cultivo, sin embargo se ha encontrado que es necesario adicionar tiamina al medio de cultivo donde se desarrolle *Ceratocystis fimbriata* para obtener un crecimiento óptimo. (4-10)

Algunos de los productos que se obtienen de su fermentación son el acetato de etilo, acetaldehído, propionato de etilo, acetato de isobutilo, entre otros más, los cuales son de gran importancia en la industria de los alimentos, donde se utilizan como saborizantes que mejoran las propiedades organolépticas. (7,8)

Con los resultados obtenidos en este trabajo se ha demostrado que la adición de tiamina al medio de cultivo líquido, favorece la producción de ésteres y algunos alcoholes, más que la adición de tiamina al medio sólido. Así mismo, se ha demostrado que la adición de tiamina en el medio líquido, favorece la producción de algunos de los compuestos volátiles que forma *Ceratocystis fimbriata*, especialmente se incrementa la producción de acetato de etilo.

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La biotecnología es la aplicación controlada y deliberada de agentes biológicos sencillos (células vivas o muertas) o componentes celulares, en operaciones técnicamente beneficiosas, bien sea de fabricación de productos u operaciones de servicios.^(11, 12)

La biotecnología microbiana, a veces llamada microbiología industrial es un antiguo campo que ha sido retomado en los últimos años debido a la adición de técnicas de ingeniería genética. La microbiología industrial originalmente empezó con los procesos de fermentación alcohólica, tal es el caso de la fabricación de cerveza y de vino. Posteriormente se desarrollaron los procesos microbianos para la producción de agentes farmacéuticos, y para la producción de aditivos alimentarios y aminoácidos, entre otros.^(11, 12) En la tabla 1, se resumen algunos ejemplos de producción de aromas por microorganismos.^(13,14)

Microorganismo	Aroma	Compuestos
<i>Ascoidea hylacoeti</i>	Afrutado: rosa	2- feniletol, furan 2-carboxilato
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	Afrutado: plátano, Durazno, pera, rosa	3-Metil butiril acetato, gama y delta decalactona, geranio, citronelol, nerol linalol, geranil acetato
<i>Ceratocystis variispora</i>	Fragante: geranio	Citronelol, citroneil, acetato geranial, geraniol, nerol, linalol, geranil acetato
<i>Ceratocystis virescens</i>	Afrutado: rosa	Éster metílico del ácido cinámico
<i>Inocybe cordalina</i>	Afrutado: jazmín	Éster metílico del ácido cinámico
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Afrutado: rosa	Citronelol, linalo, geranio
<i>Mycocaccinia uda</i>	Afrutado: almendras, pasto	p-metilacetofenona, p-tolil-1-etanol p-tolil-aldehído
<i>Penicillium decumbens</i>	Pino, rosa, manzana, hongo	Thujopseno, 3-octenona, 1-octen 3-ol, 2-feniletanol, nerodiol
<i>Phellinus sp.</i>	Afrutado: rosa	Metil benzoato, metil salicilato, 2-feniletanol, gama-decalactona
<i>Sporobolomyces odorifer</i>	Durazno	Trans-1-10-dimetil trans
<i>Streptomyces odorifer</i>	Tierra, alcanfor	9-decalol 2-exo-hidroxi-2-dimetilborato
<i>Trametes odorata</i>	Afrutado miel, rosa, anís	Metil fenil acetato, Geraniol, nerol, citronelol
<i>Trichoderma viride</i>	Coco	6-pentil-2-pirona

Tabla 1. Compuestos aromáticos producidos por microorganismos

Fuente: Sharpell, 1985.⁽¹⁵⁾

Este campo de los aromas y sabores se encuentra dentro de la biotecnología alimentaria, la cual puede definirse como el uso de las tecnologías biológicas para la producción, transformación y/o preservación de alimentos, o bien para la producción de materias primas, aditivos coadyuvantes empleados en la industria alimentaria. (14)

De igual manera, la biotecnología alimentaria se involucra en los procesos de transformación, como una etapa del proceso que cumple con una o varias funciones, como es, el mejoramiento de las características organolépticas, químicas, fisicoquímicas o nutricionales. Quizás el mayor impacto de la biotecnología alimentaria se ubica en la elaboración de materias primas y aditivos para la elaboración de alimentos. Por ejemplo, en el área de edulcorantes, aminoácidos, vitaminas, colorantes, biopolímeros, potenciadores de sabor, ácidos orgánicos y aromas en las propiedades organolépticas, etc. Los productos más importantes en esta categoría son los aminoácidos, varios de los cuales se producen económicamente en grandes cantidades vía procesos microbianos. (12,13)

Ahora bien, ya que el microorganismo utilizado en este trabajo fue *Ceratocystis fimbriata* a continuación se mencionan algunos aspectos de este hongo, iniciando con una breve descripción de las dificultades taxonómicas y de nomenclatura que ha ocasionado

Ceratocystis fimbriata es económicamente importante ya que es la causa de la podredumbre de las papas. La enfermedad se describió por primera vez por Halsted en 1890, quien dió al hongo el nombre de *Ceratocystis fimbriatum*. En ese tiempo el peritecio fue considerado como picnidio y el género *Ceratocystis* fue establecido con *Ceratocystis fimbriata*. Dos años después, Saccardo transfirió el hongo de la podredumbre negra al género *Sphaeronaema* como *S. fimbriatum*. En 1929, Beeley nombró a un patógeno del árbol del caucho como *Sphaeronaema* sp. el cual después fue conocido como *S. fimbriatum*. (16, 17)

En 1900, Zimmerman describió a *Rostrella coffea*, como hongo del café con cuerpos frutales similares al picnidio de *S. fimbriatum* pero las relaciones de este hongo con las especies causantes de la podredumbre negra de las papas no fueron evidentes hasta 1951 cuando Pontis comparó aislamientos del café con los de las papas. En 1923 Elliot descubrió que el picnidio del patógeno de las papas era lo que actualmente se conoce como peritecio, con asci evanescente y a este hongo se le llamó *Ceratostomella fimbriata*. El hongo después fue transferido a *Ophiostoma* en 1934 y a *Endoconidiophora* en 1935. En 1950, Bakshi revivió el nombre genérico, *Ceratocystis*. Esta posición fue mantenida por Hunt quien consideró a *Ceratocystis*, *Rostrella*, *Endoconidiophora*, y *Ophiostoma* como sinónimos.

(17-20)

El género *Ceratocystis* se caracteriza por ascómatas solos o agregados, superficiales o inmersos en el sustrato, ostiolares o no ostiolares, globosos o subglobosos de color hialino a café obscuro o negro; generalmente presentan cuellos ostiolares usualmente largos y cilíndricos, a menudo con un anillo de hifa alrededor del ostiolo. El centro contiene células parenquimatosas. El asci es de globoso a subgloboso, y produce ocho esporas en diferentes niveles en el centro del peritecio que evanescen en la madurez. Las ascosporas hialinas, ya sea con o sin la vaina gelatinosa tienen formas variables, curvadas, lunadas, reniformes, o de forma de sombrero (figura 1). En otras palabras, el género se caracteriza por peritecio de color oscuro con largos cuellos negros y un centro peritecial plectascáseo, posee ocho esporas, el asci es evanescente dispuesto de forma irregular: las ascosporas son unicelulares, hialinas, y exudados del ostiolo en una matriz pegajosa.

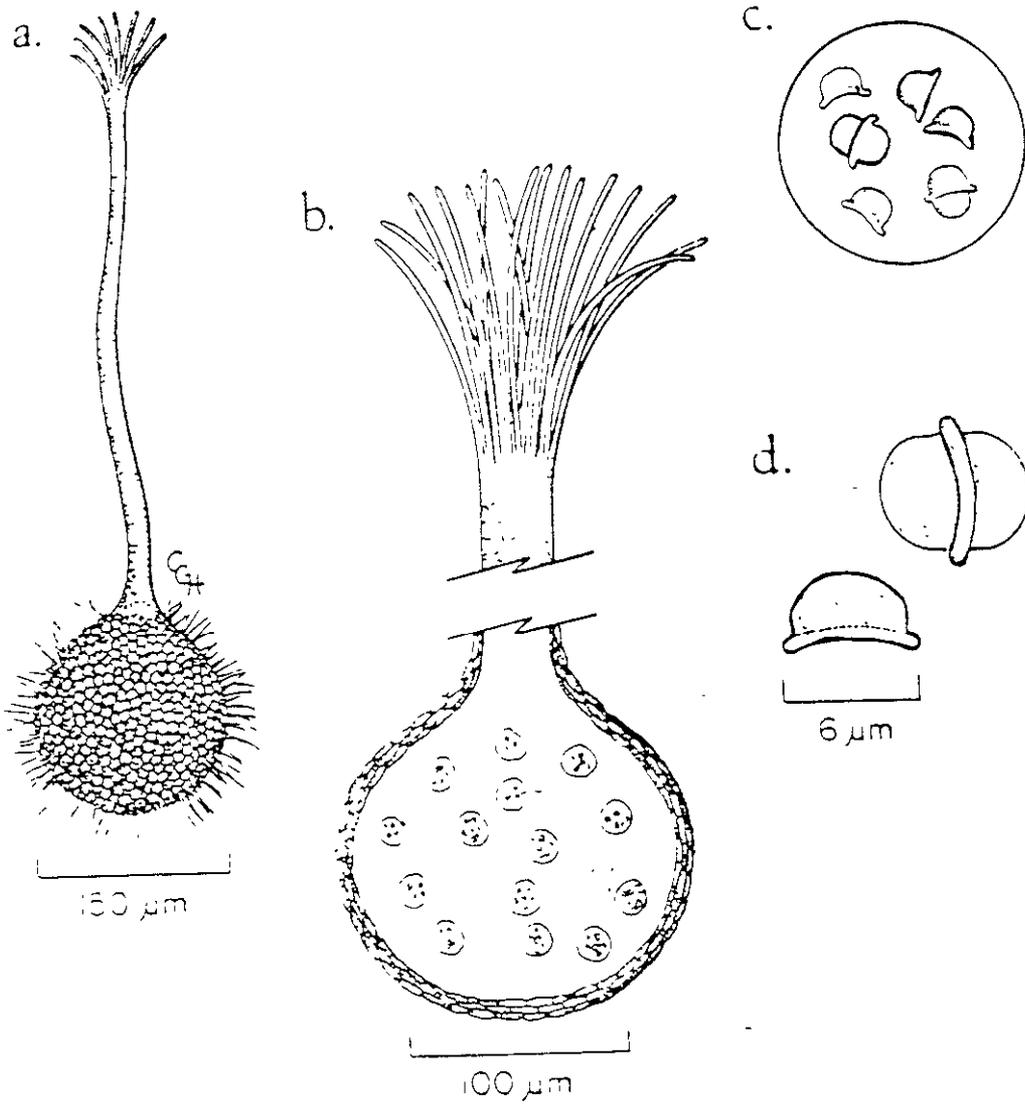


Figura 1 *Ceratocystis fimbriata*. A. Ascoma madura. B. Botón, ascus globoso; en la parte de arriba se observa el ápice del cuello ostiolar. C. Ascus con ascosporas. D. Ascosporas.

En trabajos posteriores se ha ampliado el concepto genérico para incluir especies con dos ascosporas, especies con peritecio hialino y especies en la cual la base del peritecio es de diferente color al del cuello.^(18, 19)

Debido a que se han encontrado diversos aislados de hongos con morfologías muy similares a la de la podredumbre negra en diversas localizaciones geográficas sobre una gran variedad de huéspedes, incluyendo el café, árbol del caucho, cacao, árbol del plátano, crotalaria, roble, álamo y varias especies de frutas con hueso, en muchos casos se vaciló en identificar al patógeno como *Ceratocystis fimbriata* porque los aislamientos no fueron patógenos para las papas ó porque la morfología ó dimensiones de las estructuras reproductivas no coincidieron con las características reportadas del hongo. Considerando esto, Webster y Butler intentaron redefinir al hongo *Ceratocystis fimbriata* sobre bases morfológicas y biológicas, para lo cual incluyeron aislamientos de numerosos huéspedes y de áreas geográficas muy separadas. Compararon la morfología y fisiología en el mismo ambiente y debido a que la fertilización cruzada se muestra en forma natural, también realizaron estudios de hibridación. En ese trabajo se estudiaron más de 45 aislamientos de 11 diferentes huéspedes y diversas áreas geográficas. Los cultivos crecieron sobre Agar Extracto de Malta (MEA).⁽²⁰⁾

Las colonias de *Ceratocystis fimbriata* producidas sobre agar extracto de malta fueron organizadas en tres grupos generales en base a su color, y distribución del peritecio. El primer grupo en el cual el peritecio se distribuyó uniformemente sobre la superficie de la colonia, incluyó aislamientos de café, árbol de plátano y roble. Las colonias de este grupo fueron hialinas de color café olivo claro. El segundo grupo incluyó aislamientos de álamo y de frutas con hueso. En este grupo los peritecios fueron producidos en grupos o en anillos concéntricos. Las colonias fueron de color café a oliva oscuro. Los aislamientos de cacao y de papas formaron el tercer grupo. Los peritecios producidos crecieron solos o en pequeños grupos y las colonias presentaron una coloración gris humeante a verde oliva oscuro.⁽²¹⁾

Aunque las colonias producidas por los aislamientos de un huésped particular pueden parecer idénticas, se observaron variaciones considerables entre las colonias de los otros huéspedes. Es evidente en esas observaciones, que aunque hay similitudes básicas entre las colonias dentro de los grupos, no hay una morfología colonial particular la cual sea característica de las especies, así como tampoco hay una morfología uniforme de los peritecios y ascosporas. Debido a esto, los intentos por identificar los aislados que se sospechaba eran *Ceratocystis fimbriata* por comparación de las colonias que producen los aislamientos obtenidos de las papas son de poca confianza.⁽²¹⁾ En base a lo anterior se concluyó que, aunque se debe tomar en cuenta la morfología colonial y las características de los estados conidiales, solo el estado perfecto del hongo es taxonómicamente confiable.⁽²¹⁾

Por otra parte, respecto a la morfología microscópica de *Ceratocystis fimbriata*, se encontró que presenta dos tipos de esporas: sexuales y asexuales. Las esporas sexuales que se pueden observar en *Ceratocystis fimbriata* son ascosporas, y las esporas asexuales se pueden subdividir en endoconidias cilíndricas, endoconidias doliformes y conidias de pared gruesa.⁽²¹⁾

Es interesante notar que la forma de sombrero de las ascosporas no se mencionó en las primeras descripciones de *Ceratocystis fimbriata*, pero después son mencionadas como ascosporas con forma de sombrero con una vaina gelatinosa en el borde (figura 2). Las ascosporas salen de tubos germinativos después de 24 horas sobre agar extracto de malta, los cuales emergen del área de la espóra rodeada por el borde. Figura 2 B. Generalmente la producción de un tubo germinativo es pronto seguido por otro.⁽²¹⁾

Por lo que se refiere a las esporas asexuales se observaron tres formas distintas, las cuales fueron identificadas en todas las cepas listadas en la Tabla 2. Los endoconidióforos con forma de matraz (Fig.16, A, B, C,) característicos de este tipo son hialinos y subhialinos, septadas y pueden originar hifas aéreas o subterráneas solas o en grupos. Los endoconidios cilíndricos (Figura 3,D) son truncados y han sido observados en cadenas de más de 20 esporas largas. (21)

Huésped	Localización
Papas, <i>Ipomoea papas</i>	Louisiana Virginia
Cacao, <i>Theobroma cacao</i>	Ecuador Turrialba, Costa Rica Mayacea, Costa Rica
Café, <i>Cofea arabica</i>	Turrialba, Costa Rica Mississippi Washington
Álamo, <i>Populus tremuloides</i>	Pensilvania
Álamo "Tembloroso"	Minnesota
Álamo	Nuevo México
Roble, <i>Quercus ellipsoidalis</i>	Minnesota
Albaricoque, <i>Prunus armeniaca</i>	California
Melocotón, <i>Prunus persica</i>	California
Almendro, <i>Prunus amygdalus</i>	California

Tabla 2 Fuentes de los cultivo de *Ceratocystis fimbriata*

Las endoconidias doliformes difieren de las precedentes en forma y tamaño (Figura 4, A-H). Los endoconidióforos son más anchos y más cortos en la punta, en contraste a los estrechos endoconidióforos de forma de matraz que producen las endoconidias cilíndricas. Las endoconidias doliformes son al principio hialinas, y se vuelven de subhialinas a café claro con la edad. Estas pueden producirse por separado, pero tienden a agruparse (Figura 4, E), particularmente alrededor del peritecio. Los endoconidios doliformes han sido observados en cepas de *Ceratocystis fimbriata* de álamo, roble, árbol de plátano y frutas con hueso pero no en cepas aisladas de papas, café y cacao. (21)

Las conidias de pared gruesa se encontraron en todas las cepas estudiadas por Webster, aunque no fueron tan numerosas en cepas de café, árbol de plátano y álamo como en las cepas de otros huéspedes. En la naturaleza están usualmente fijadas en el tejido del huésped mientras que los endoconidios son producidos sobre la superficie del huésped. La forma de las conidias de pared gruesa varía de ovales a subglobosas con paredes lisas o rugosas. Ellas se forman aisladas o en cadenas cortas (Figura 5, A, B, C, D) sobre conidióforos simples o ramificados y son de color café pálido a café oliva. En agar extracto de malta germinan a las 48 horas a 25 °C. La germinación puede también ocurrir *in situ* en cultivos de 8-10 días de edad (Figura 5 H,I) . (21)



Figura 2 Esporas de *Ceratocystis fimbriata* con su característica forma de sombrero. A. Ascosporas vistas con aceite de inmersión en un microscopio compuesto. B. Ascosporas germinando. C. Micrografía electrónica de una ascospora mostrando la pared más externa alrededor de la espora y el borde. D. Un par de ascosporas en un ascus joven.

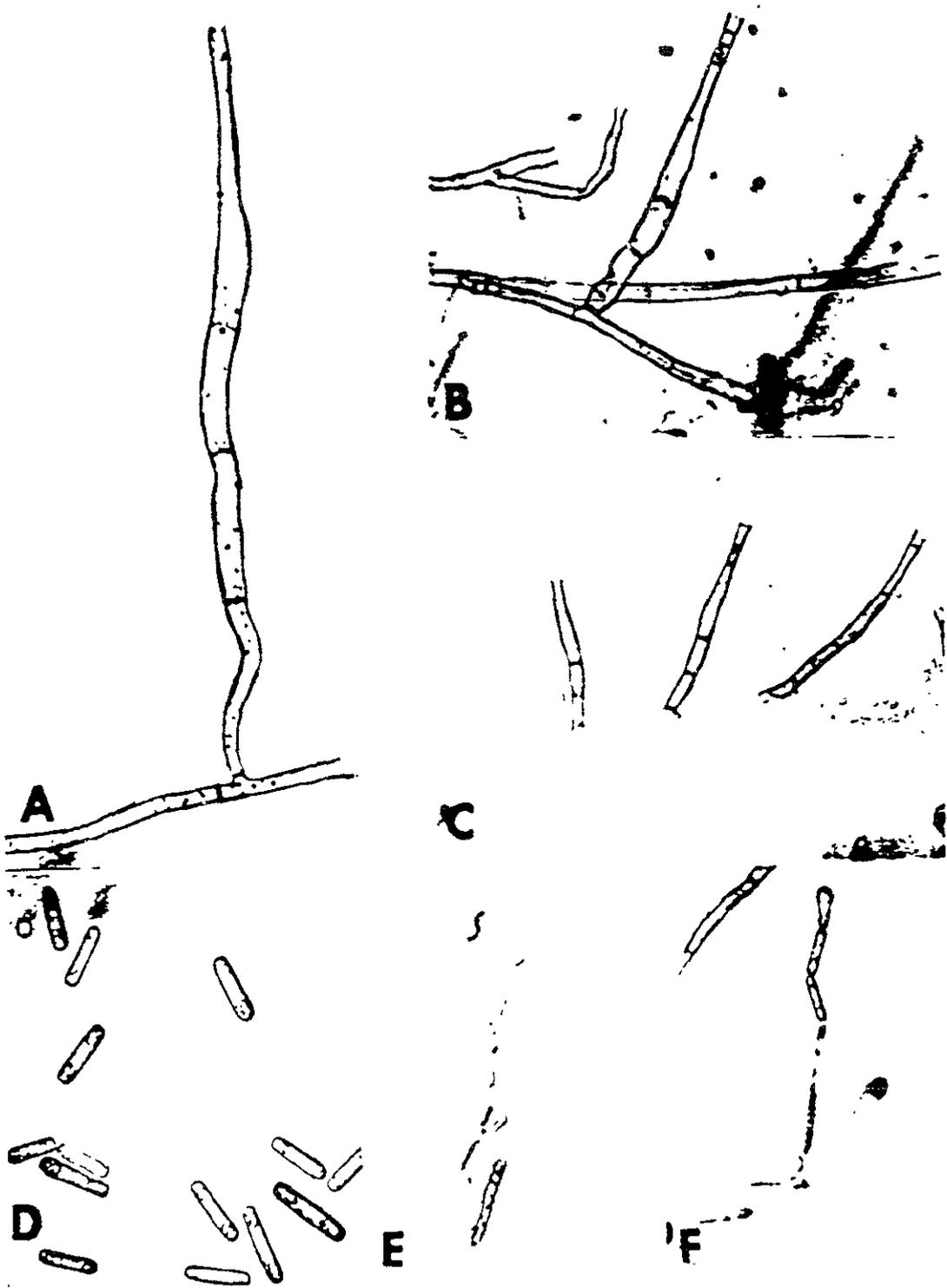


Figura 3 Conidióforos y endoconidios cilíndricos de *Ceratocystis fimbriata*. A y B. Conidióforos con forma de matraz. C. Tres conidióforos originándose de una hifa del micelio. D. Endoconidias truncadas. E y F. Endoconidias cilíndricas germinando de tubos germinativos que se transforman en conidióforos.



Figura 4 Endoconidias doliformes y sus endoconidióforos. A y B. Hifa aérea terminada como un endoconidióforo. C. Endoconidióforo, y la manera en que las conidias se forman dentro del endoconidióforo. D. Endoconidióforos doliformes y cadena de conidias doliformes. E. Agregación de endoconidióforos doliformes y cadenas de conidias. F. Ramificación típica de una hifa sumergida de *Ceratocystis fimbriata*. G. Hifa mostrando anastomosis. H. Porción de una base peritecial con hifas no diferenciadas.

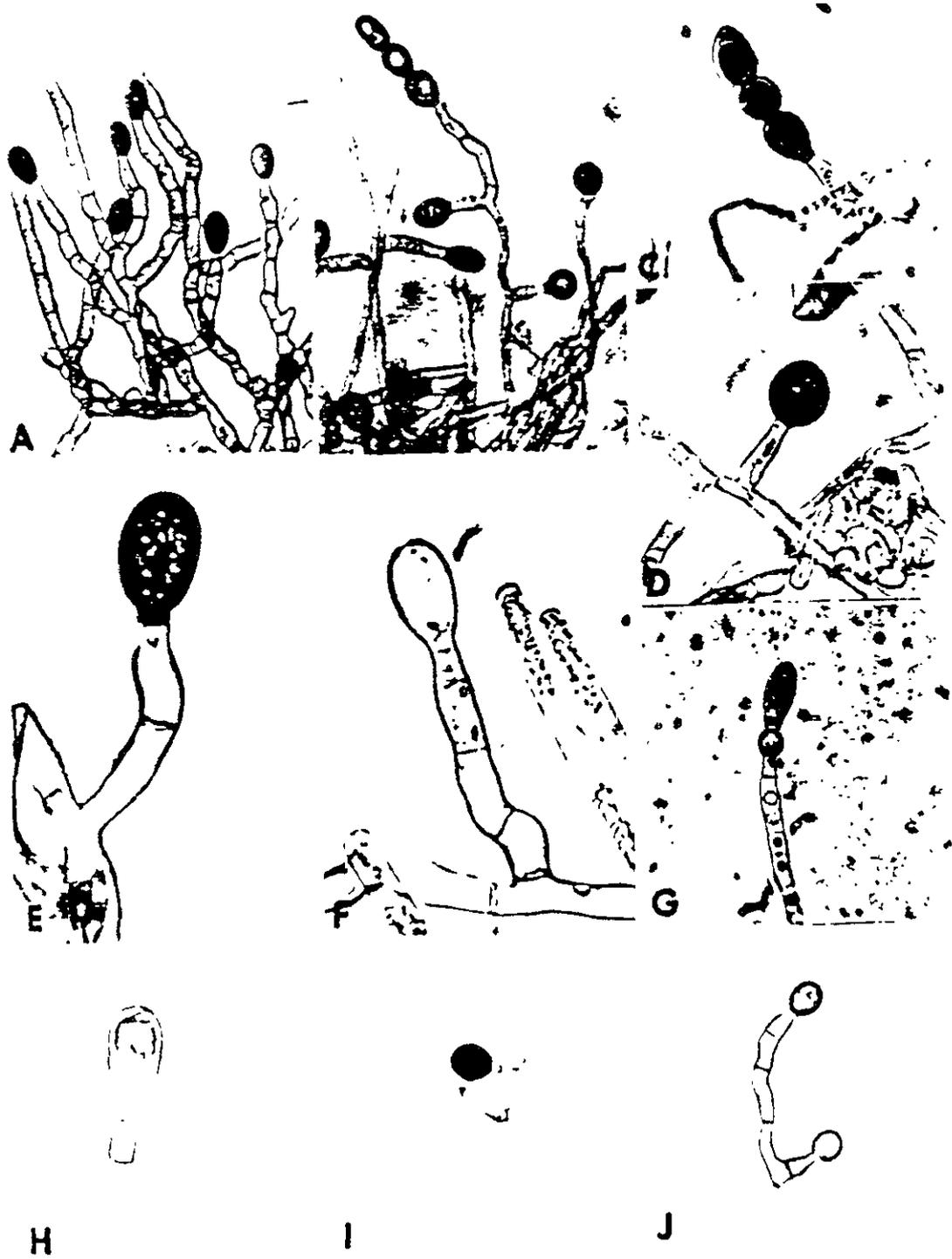


Figura 5 Conidias de pared gruesa, producidas por *Ceratocystis fimbriata*

En la literatura han surgido algunos desacuerdos como el modo de formación de estas esporas en *Ceratocystis fimbriata*. Las observaciones realizadas en este trabajo permitieron concluir que los conidios de pared gruesa se forman como salientes del ápice del conidióforo (Figura 5 F, G, J). La pared más externa de las esporas está seguida de la pared más externa del conidióforo (Figura 5 C, E, F). En el caso de endosporas la pared más externa del conidióforo no contribuye a la formación de la espora. (21)

Por otra parte, se ha establecido que muchos hongos son incapaces de sintetizar ciertas vitaminas, o son capaces de sintetizar solo algunas, y para obtener un crecimiento vegetativo normal, esas vitaminas deben ser proporcionadas al medio en el cual el hongo crece. (9, 10, 22, 23)

Algunos hongos sufren una mayor deficiencia vitamínica, esto es, que ellos no crecen a menos que sean proporcionadas las vitaminas, otros sufren de una deficiencia menor o parcial, pero crecen mucho más rápidamente si las vitaminas están presentes en el medio. (9, 10, 22, 23)

El género *Ceratocystis* es particularmente interesante porque ilustra todas las generalidades expresadas arriba, cuando se estudia la relación de alguna de sus especies para la tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆), y biotina (vitamina H). (23)

En experimentos realizados por Barnett y Lilly se evaluó el efecto de la tiamina sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Ceratocystis fimbriata*, aisladas de distintas fuentes. Se utilizaron concentraciones de tiamina entre 0.8-100 ug de tiamina por litro, obteniéndose mayor crecimiento en forma proporcional, al incrementarse la concentración de tiamina, arriba de 25 ug/L. Según los resultados reportados, al trabajar con 100 ug/L de tiamina, se obtuvieron 111 mg de micelio, en un periodo de once días que duró la fermentación en medio líquido. Por otra parte, al trabajar con combinaciones de tiamina, biotina, piridoxina e inositol, se encontró que hubo crecimiento en todos los medios con tiamina, pero en aquellos en que la tiamina no se proporcionó, el crecimiento fue escaso. (9, 10, 22, 23)

Ceratocystis fimbriata crece muy poco en el medio basal y la adición de piridoxina o de biotina solas o juntas tienen poco efecto sobre el crecimiento. Cuando la tiamina se adicionó, el crecimiento fue satisfactorio, pero el desarrollo fue más rápido cuando los medios fueron suplementados con tiamina y piridoxina, tiamina y biotina, o con las tres vitaminas. En base a esto se puede decir que *Ceratocystis fimbriata* tiene una completa deficiencia de tiamina y una deficiencia parcial para la piridoxina y la biotina. (9, 10, 22, 23)

Barnett y Lilly encontraron que el hongo *Ceratocystis fimbriata* aislado a partir de las papas mostró el requerimiento de tiamina para la producción de peritecio. (9, 10, 22, 23)

Se llegó a la conclusión de que el peritecio no se produjo cuando la tiamina fue omitida en el medio de cultivo y en los aislamientos autofecundos se observó la producción de peritecio cuando la tiamina fue incluida en el medio de cultivo. El crecimiento vegetativo fue muy escaso en la ausencia de tiamina. Estos resultados indican que el requerimiento de tiamina para la producción de peritecio es una característica de todos los aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* sin importar su huésped u origen geográfico. (9, 10, 22, 23)

Robbins y Ma, también realizaron experimentos en los que concluyeron que *Ceratocystis fimbriata* creció en un medio suplementado con tiamina y que es capaz de sintetizar biotina y piridoxina a partir de azúcar, minerales y asparagina. (9, 10, 22, 23)

Como se puede observar con todo lo mencionado anteriormente, la naturaleza de las vitaminas proporcionadas influye en la producción de pigmentos y en el crecimiento. *Ceratocystis fimbriata* desarrolla sobre agar, un micelio algodonoso blanco cuando se le proporciona tiamina, pero con tiamina y biotina, con tiamina y piridoxina, o con las tres vitaminas el micelio crece húmedo con una escarcha blanca. (9, 10, 22, 23)

Respecto a la fuente de carbono, cuando en el medio de cultivo se encuentra la fructosa y la glucosa, *Ceratocystis fimbriata* utiliza preferencialmente la glucosa, no utiliza lactosa o rafinosa y no sintetiza cantidades detectables de oligosacáridos con maltosa o sucrosa, sin embargo, puede utilizar la sucrosa para su crecimiento. (24)

Wilson y Lilly también observaron que la proporción de crecimiento y el peso seco del micelio producido fue menor cuando el medio fue esterilizado por filtración que cuando el medio fue esterilizado por autoclave. La utilización de azúcares autoclaveados fue igual, o mejor que los azúcares esterilizados por filtración. (24)

Ahora bien, considerando que la variable independiente que se manejó en este trabajo, fue la concentración de tiamina, es esencial mencionar la importancia de las vitaminas y en particular la de la B₁, en el metabolismo productor de aromas.

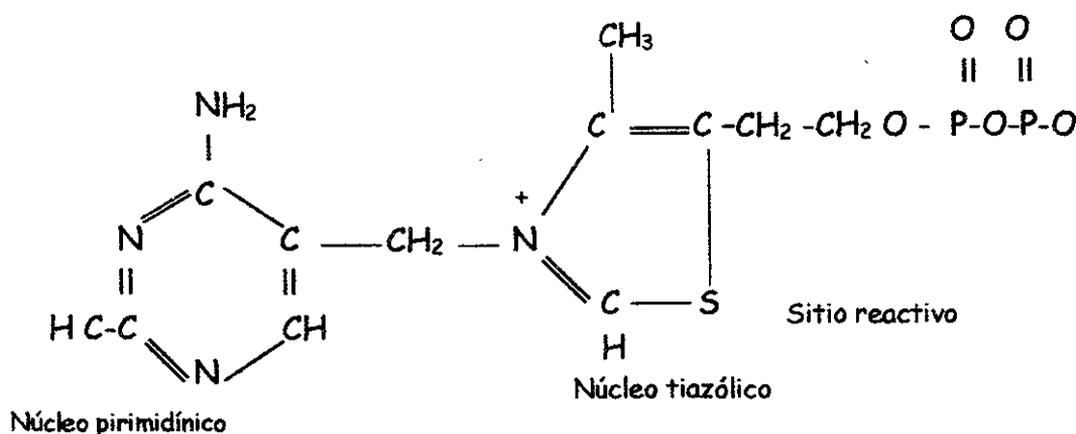
Muchas vitaminas son precursores de coenzimas, y por ello las vitaminas deben ser proporcionadas a los organismos. Las vitaminas son los factores de crecimiento generalmente más necesarios y se definen como compuestos orgánicos requeridos en cantidades pequeñas para crecer y funcionar, que no sirven ni como fuente de energía, ni como ladrillos para la construcción de macromoléculas. (25, 26, 27)

La forma activa de la vitamina B₁ o tiamina es el pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa y actúa como coenzima de diversos sistemas enzimáticos. La tiamina tiene un importantísimo papel en el metabolismo y puede introducirse a la célula fácilmente ya que es una molécula relativamente pequeña y además hidrosoluble. (24-26) Una vez que se ha introducido a la célula, es rápidamente fosforilada y se impide su salida de la célula. Esta forma fosforilada de la tiamina actúa como coenzima y se le conoce como Pirofosfato de tiamina (TPP). El pirofosfato de tiamina también puede actuar como grupo prostético. (28, 29)

La ruta para la formación de Acetil-CoA es un ejemplo de una de las rutas en que participa el Pirofosfato de tiamina, y esta ruta es esencial en el metabolismo de cualquier organismo, ya que el Acetil-CoA es un producto de degradación de carbohidratos, ácidos grasos, y aminoácidos, pero también es una molécula a partir de la cual se forman macromoléculas que son indispensables para el crecimiento y duplicación de las células. (30, 31)

La formación de Acetil-CoA es a partir del piruvato, el cual, después de una serie de reacciones catalizadas por la piruvato deshidrogenasa da lugar a la formación del producto mencionado. La piruvato deshidrogenasa, es un complejo multienzimático que requiere de la coenzima TPP en la primera etapa de reacciones, para transformar el piruvato a Acetil-CoA. (32, 33, 34)

Otro de los procesos metabólicos donde la tiamina, en su forma de coenzima, muestra su mayor actividad, es en la descarboxilación u oxidación de ciertos cetoácidos, entre ellos el piruvato y el α -acetoglutarato. (33, 34)



PIROFOSFATO DE TIAMINA

Muchos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos microorganismos no son capaces de hacerlo y hay que proporcionarles éstas vitaminas. (35, 36) En estudios realizados anteriormente se ha encontrado que *Ceratocystis fimbriata* presenta una deficiencia total de vitamina B₁, por lo tanto se debe proporcionar a su medio de cultivo para optimizar su crecimiento. La concentración de cualquier micronutriente que se recomienda adicionar al medio de cultivo, ya sean vitaminas o minerales, es de concentraciones menores a 10⁻⁴ mol/L. (9, 10, 37)

En la fermentación alcohólica, el pirofosfato de tiamina (TPP) participa como coenzima de la piruvato descarboxilasa. La coenzima se necesita debido a que la descarboxilación de un α-oxoácido como el piruvato requiere la acumulación de carga negativa en el carbono carbonílico en el estado de transición, lo que es definitivamente una situación inestable. Este estado de transición puede ser estabilizado por la deslocalización de la carga negativa en un "sumidero de electrones" adecuado. Mientras que los fragmentos carbonados de los restos de aminoácidos de las proteínas no cumplen bien este papel, el TPP lo puede realizar fácilmente. (34)

El pirofosfato de tiamina también actúa como coenzima en las reacciones transcetolasa-TTP, reacciona con el cetozúcar apropiado para romper el enlace C2-C3 para formar el intermediario TTP-glicolaldehído (glicolaldehído activo) el cual es transferido a un aldehído aceptor adecuado de la ruta de las pentosas o hexosas monofosfato para la oxidación de la glucosa. (32, 33, 34) Esta ruta metabólica es una alternativa importante para la ruta glucólisis-ciclo de Krebs, aunque no tan importante para la producción de energía como para la producción de pentosas que se requieren para la síntesis de RNA, DNA y NADPH para la biosíntesis de ácidos grasos y otros productos. Esta ruta también puede proporcionar azúcares intermediarios para la glucólisis. (34)

Resumiendo, las funciones de la tiamina se realizan en forma de Pirofosfato de tiamina (TPP) en las células. El TPP funciona como coenzima en varios sistemas enzimáticos en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos, las enzimas en las que actúa como coenzima son la piruvato deshidrogenasa, piruvato oxidasa, piruvato deshidrogenasa, 2-oxoisovalerato deshidrogenasa, transcetolasa, piruvato descarboxilasa, benzoilformato descarboxilasa, oxalil-CoA descarboxilasa, tartronato semialdehído sintasa, acetolactato sintasa y sulfoacetaldehído liasa. (29)

A pesar de que existen diferencias estructurales y de organización en las células procarióticas y eucarióticas, todos los organismos muestran una gran similitud a nivel celular. De hecho, varios rasgos a parte de los estructurales y de organización, tales como la replicación y el material genético son muy similares en las bacterias, plantas y animales pero las semejanzas se acentúan más cuando se comparan los procesos metabólicos.⁽¹²⁾

Debido a que no se han estudiado las rutas metabólicas de *Ceratocystis fimbriata* a nivel laboratorio, a continuación se presentan algunas propuestas de las posibles rutas que puede seguir *Ceratocystis fimbriata* para la elaboración de sus productos con aroma. Las rutas que aquí se proponen se tomaron de la literatura, y cabe mencionar, que la mayoría concuerda con los productos formados por las levaduras que fermentan el mosto.

En previas investigaciones se ha identificado que los productos que forma *Ceratocystis fimbriata* son los siguientes:

Clasificación en base a su grupo funcional	Productos volátiles formados por <i>Ceratocystis fimbriata</i>
Aldehídos	Acetaldehído
Alcoholes	Etanol Butanol Isobutanol Isopropanol
Ésteres	Acetato de etilo Acetato de isoamilo Acetato de isobutilo Butirato de etilo Propionato de etilo
Cetonas	Acetona Diacetilo

Tabla 3 Clasificación de productos volátiles formados por *Ceratocystis fimbriata*, de acuerdo a su grupo funcional

En la tabla 3 se muestran los productos que se obtienen en una fermentación con *Ceratocystis fimbriata*. De éstos productos, el acetaldehído, el etanol, acetato de etilo y propionato de etilo, son los que participan en el aroma a frutas; y más particularmente, en el aroma a plátano, se encuentran el isobutanol y el acetato de isobutilo.

Ahora bien, considerando la importancia de éstas moléculas, a continuación se presentan las posibles rutas metabólicas que sigue *Ceratocystis fimbriata* para la elaboración de sus productos, iniciando con la formación de acetaldehído y etanol, posteriormente con la formación de ésteres, para lo cual, sólo se detalla la formación del acetato de etilo ya que el mecanismo para la formación de los otros ésteres es similar, después se habla de la formación de alcoholes fusel (alcohol isoamílico, isobutílico y amílico), y finalmente se habla un poco de la acetona, isopropanol, n-butanol y del diacetilo, los cuales, aunque no participan en el aroma a frutas y a plátano, se incluyeron en este apartado de rutas metabólicas, ya que son importantes en la industria de los alimentos.

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA ACETALDEHÍDO Y ETANOL

La glucólisis es la vía por la que la glucosa se transforma a través del intermediario fructosa 1,6-bisfosfato, a piruvato, con la producción de 2 moles de ATP/mol de glucosa. El piruvato, en condiciones anaeróbicas sufre una primera reacción de descarboxilación y forma el acetaldehído y CO_2 . Esta reacción es catalizada por la piruvato descarboxilasa que necesita de la coenzima pirofosfato de tiamina (TPP), la cual se encuentra fuertemente unida al enzima de forma no covalente. (38, 39, 40)

El acetaldehído formado por descarboxilación del piruvato se reduce a etanol por el NADH, y ésta última reacción es catalizada por la alcohol deshidrogenasa (ADH).

La función de la fermentación alcohólica es la regeneración anaeróbica de NAD^+ para poder continuar la glucólisis. A su vez, la glucólisis se utiliza para la producción rápida de ATP, el cual es un nucleótido de alta energía que todos los organismos necesitan generar para crecer y mantenerse. (34, 35)

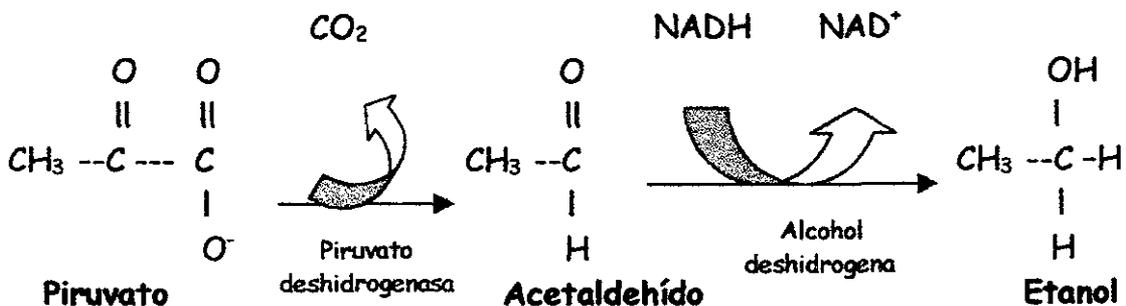


Figura 6 Reacciones de la fermentación alcohólica: (1) la descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído, seguida de (2) su reducción a etanol por el NADH.

FORMACIÓN DE ÉSTERES ACETATO DE ETILO

En trabajos realizados por Nordstrom existe evidencia de que el CoA participa en la formación anaeróbica de acetato de etilo. Se observó que cuando las reacciones que involucran la formación de CoA y Acetil-CoA, son inhibidas, se incrementó la formación de ácido acético y disminuyó el rendimiento de acetato de etilo. (36)

Al parecer, la formación de ácidos parece competir con la formación de ésteres. Sin embargo, la formación del éster requiere energía aportada a través de la participación de CoA. El siguiente esquema (figura 7) del metabolismo del Acetil-CoA en levaduras, predice el efecto sobre la formación de ésteres y como se puede observar, la restricción de biotina podría limitar el consumo de CoA para la síntesis de lípidos vía malonil-CoA y el aporte de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, los cuales son importantes como bioprecursores de ácidos nucleicos y para la síntesis de proteínas en condiciones

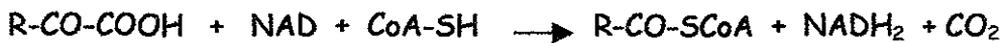
anaeróbicas, por lo tanto, la falta de biotina en el medio facilita que haya una cantidad mayor de Acetil-CoA disponible para la formación de más ésteres. De acuerdo a la figura 7 si el consumo de Acetil-CoA en el crecimiento fuera restringido (reacciones IVC, VA y Vb), una mayor cantidad de acetil-CoA (formado por la vía de la reacción II) podría estar disponible para la síntesis de ésteres (reacción II). (36)

Se considera que la descarboxilación oxidativa del piruvato es importante en la formación anaeróbica de acetil-CoA. La formación de ésteres se estimula cuando otras reacciones acetil-CoA son inhibidas.

Al parecer, hay una correlación entre el crecimiento y la formación de ésteres. Esta afirmación se refiere a que si por alguna causa se detiene la producción de ATP y de acetil-CoA, no habría forma de sintetizar las macromoléculas necesarias para el crecimiento de la célula. Por lo tanto, la formación de ésteres disminuye cuando el crecimiento cesa pues no habría formación de energía ni de acetil CoA, ya sea para la síntesis de moléculas para la duplicación o simplemente para la formación de productos de desecho mediante los cuales se obtiene energía. (36)

La formación de los ésteres a partir del acetil-CoA se da por una reacción de alcoholísis, la cual es catalizada por acción de la alcohol acetiltransferasa.

De acuerdo a esto puede suponerse que el butirato y propionato de etilo también son formados por alcoholísis. (36) Las reacciones que se proponen en la literatura son las siguientes (36):



REACTIVOS	PRODUCTO
Acetil-CoA + Etanol	Acetato de etilo
Acetil-CoA + Alcohol amílico	Acetato de isoamilo
Acetil-CoA + Isobutanol	Acetato de isobutilo
Ácido butírico + Etanol	Butirato de etilo
Propionil-CoA + Etanol	Propionato de etilo

Tabla 4 Reacciones hipotéticas mediante las cuales se obtienen los ésteres formados por *Ceratocystis fimbriata*

El Propionil-CoA puede obtenerse de la oxidación de los aminoácidos isoleucina, valina o metionina, aunque también es un producto de degradación de los ácidos grasos de cadena impar.

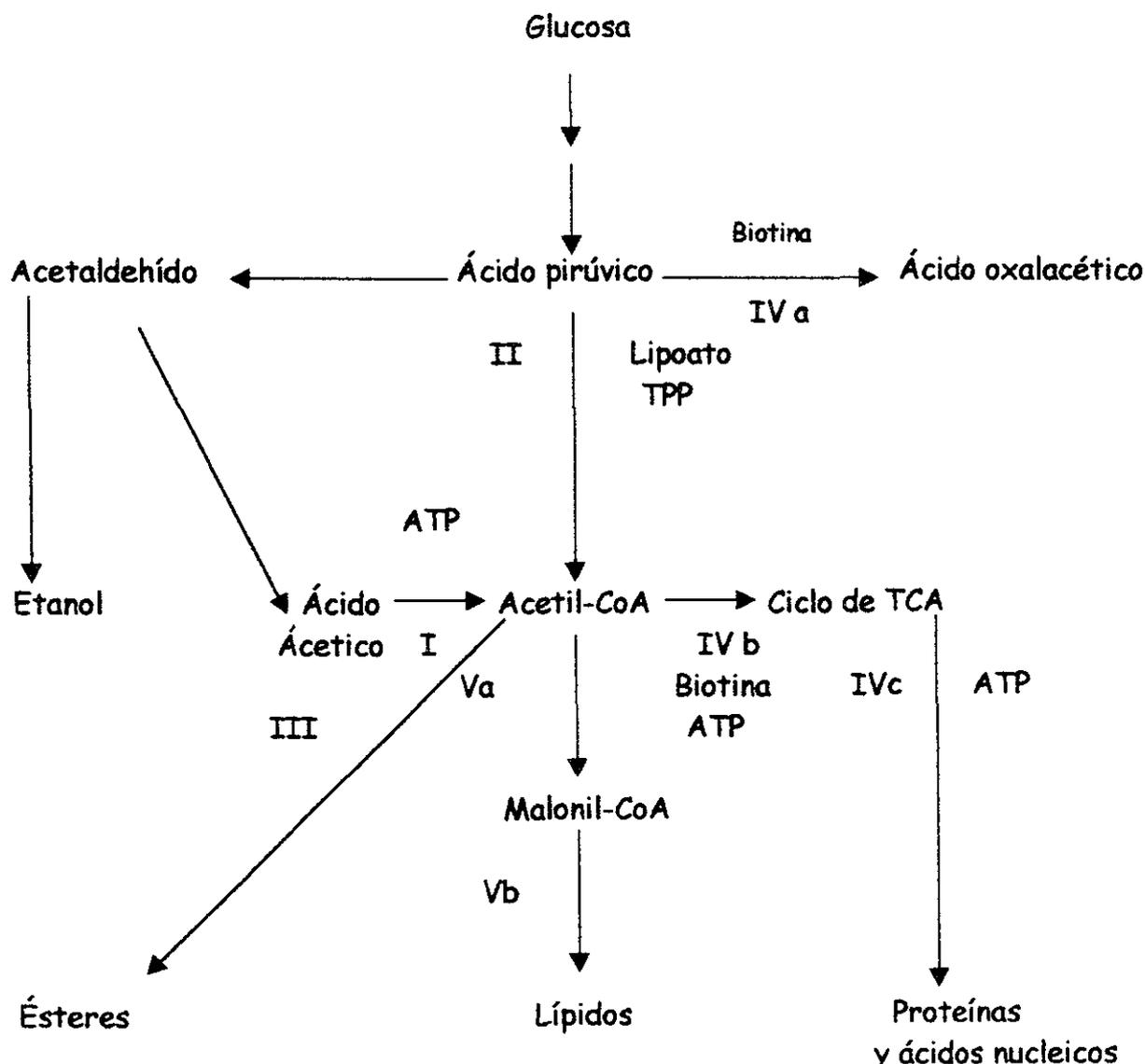


Figura 7 Esquema simplificado del metabolismo del acetil-CoA

FORMACIÓN DE ALCOHOLES FUSEL

Los alcoholes fusel se forman en medios definidos que contienen amonio como única fuente de nitrógeno, sin embargo, los esqueletos carbonados de estos alcoholes se obtienen por la desaminación de aminoácidos sintetizados intracelularmente, ya sea del pool de los oxoácidos ó directamente por descarboxilación y reducción de los oxoácidos. (36, 42, 43)

De acuerdo a la figura 8, la reserva de oxoácidos influye la formación de alcoholes fusel. Åyråpaa, observó la relación entre el nitrógeno asimilable en el medio y la formación de alcoholes fusel, después de lo cual, llegó a la conclusión de que dos factores son los que influyen:

- 1) La cantidad de nitrógeno disponible para la transaminación y aminación. (36, 44-46)

Los oxoácidos que resultan por la falta de nitrógeno son convertidos a los correspondientes alcoholes. Los oxoácidos se originan del metabolismo de carbohidratos, los cuales deben ser también la fuente de oxoácidos y de alcoholes fusel cuando las levaduras crecen sobre sales de amonio como única fuente de nitrógeno. (36, 47)

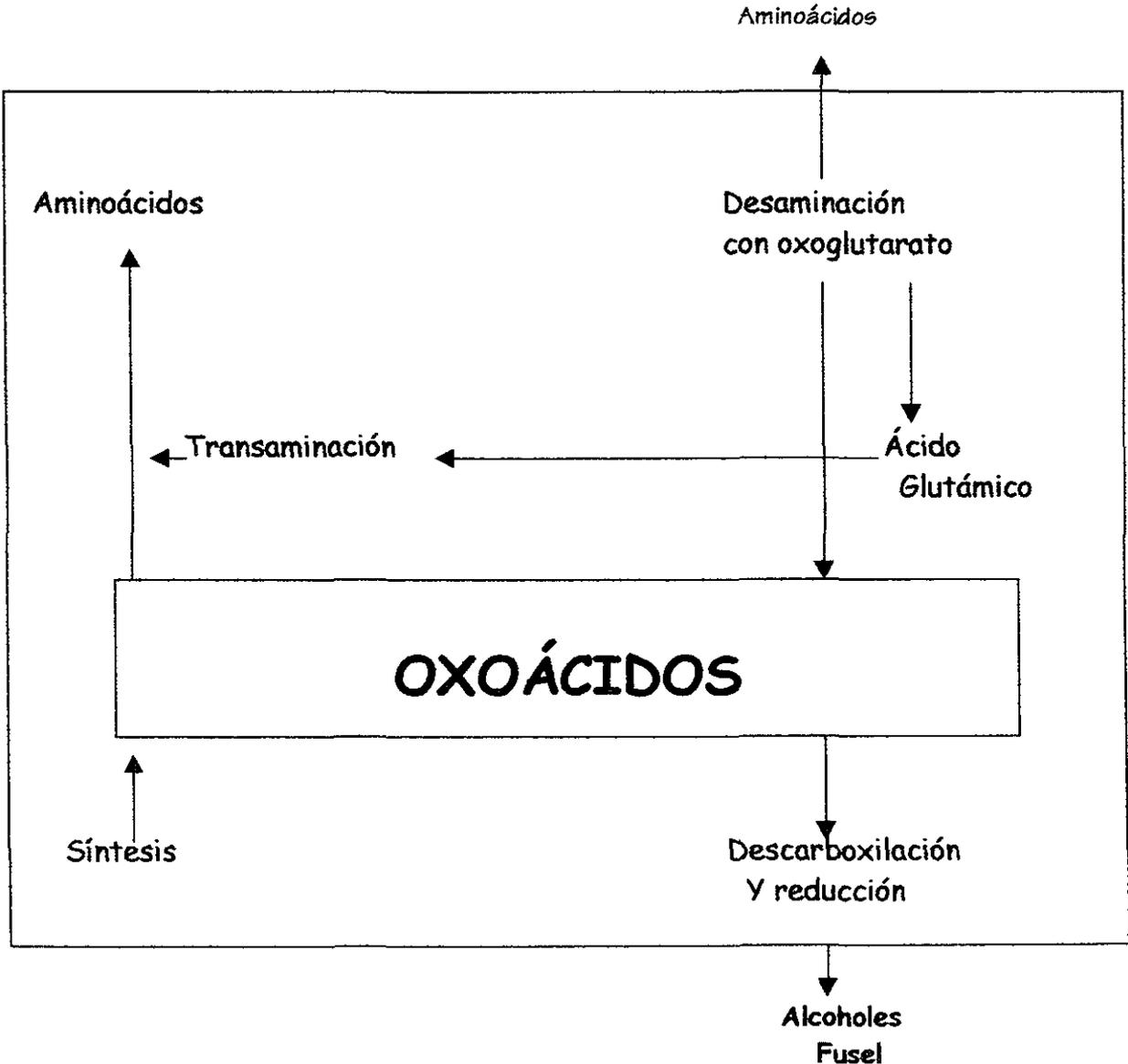


Figura 8 Esquema hipotético de la formación de alcoholes fusel

2) La relación depende de la inhibición por retroalimentación de aminoácidos sobre aquellas reacciones las cuales sintetizan sus cadenas de carbono.

Äyräpää señaló, que a niveles suficientes de nitrógeno para permitir el desarrollo de rutas biosintéticas, pero insuficiente para ocupar los oxoácidos en las reacciones de transaminación, se incrementa la formación de alcoholes fusel a partir de oxoácidos libres. (44)

Por otro lado, si se incrementan las cantidades de nutrientes nitrogenados exógenos, la posibilidad de llevar a cabo la transaminación también se incrementaría, los oxoácidos serían usados y se formarían menos alcoholes fusel. Sólo cuando un aminoácido se encuentre en exceso a lo necesario, la célula formará su correspondiente alcohol fusel por desaminación por la ruta de Erlich. (36, 44, 47)

ALCOHOL ISOAMÍLICO

Los estudios muestran que el mecanismo de formación de alcoholes en las levaduras involucra estados sucesivos de transformación enzimática por enzimas como la transaminasa, carboxilasa y la alcohol deshidrogenasa. (41, 42)

El objetivo de este conjunto de reacciones es proporcionar ácido glutámico a partir del cual pueden sintetizarse otros aminoácidos (prolina, ornitina y arginina), dando el correspondiente 2-oxoácido. (36, 42)

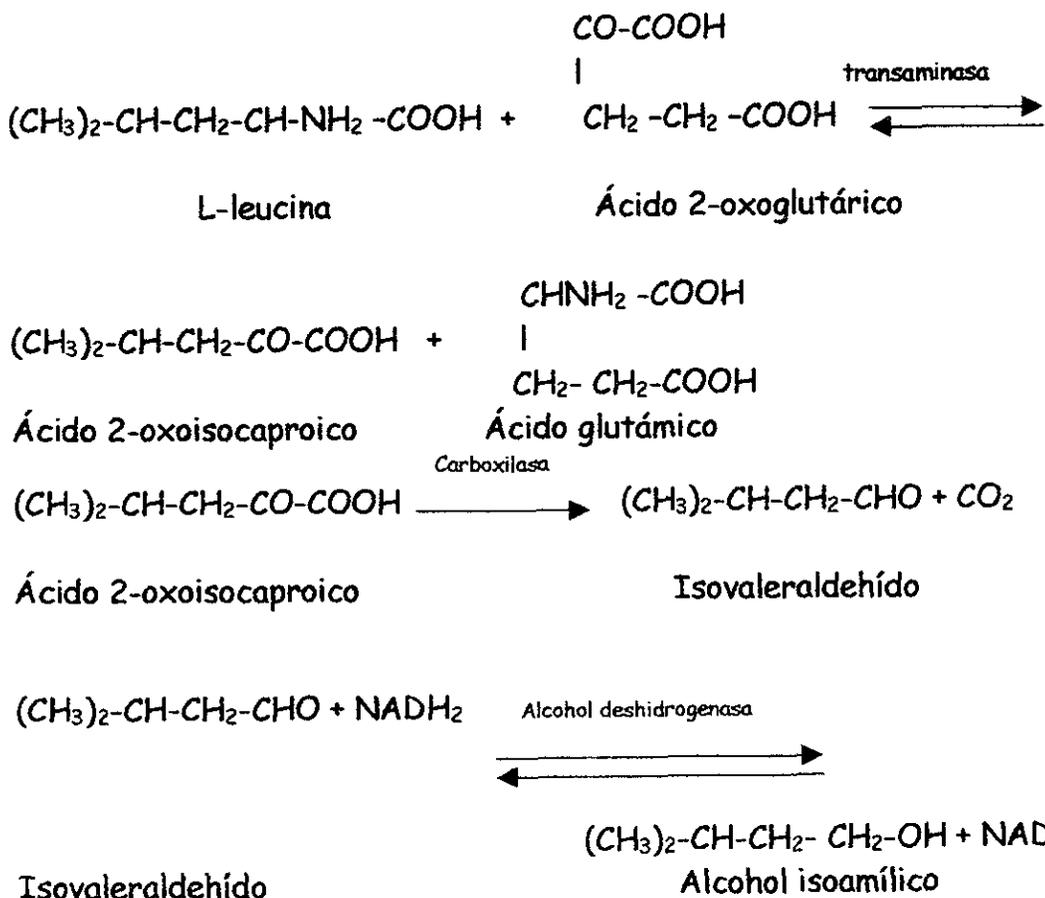


Figura 9 Mecanismo de Erlich para la formación de alcohol isoamílico

El alcohol isoamílico corresponde al fragmento carbonado que resta de la leucina, la cual al ser desaminada por la transaminasa, y seguir las demás reacciones en las que participa la carboxilasa y la alcohol deshidrogenasa, rinde finalmente alcohol isoamílico. (44, 42)

ALCOHOL ISOBUTÍLICO

El alcohol isobutílico, al igual que otros alcoholes, puede ser formado a partir de fragmentos de carbono generados en el catabolismo de los carbohidratos. Estos fragmentos, como ya se ha mencionado son los 2-oxoácidos, los cuales son intermediarios en la transaminación con glutamato. (36,

47)

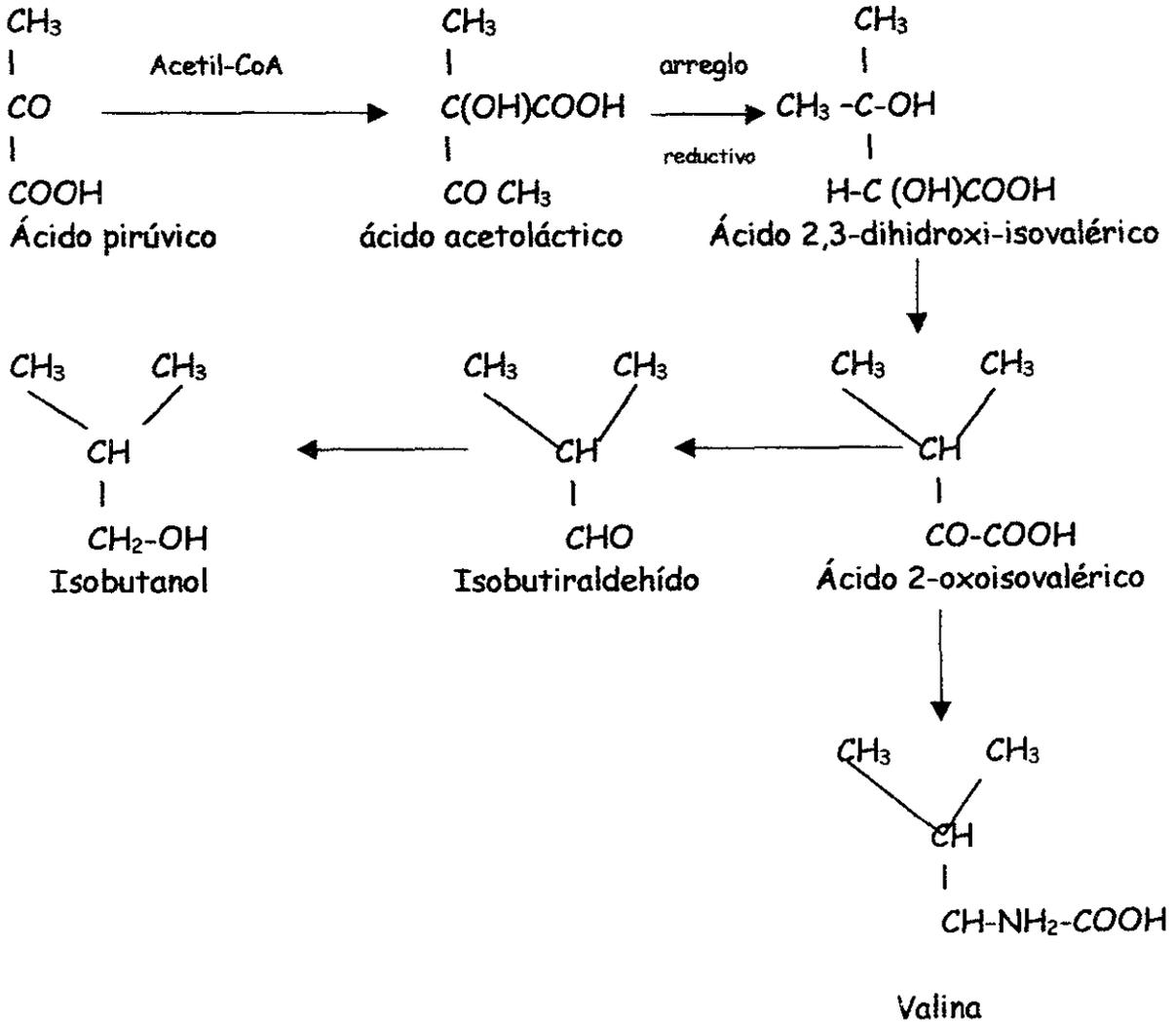


Figura 10 Mecanismo de la formación de alcohol isobutílico

ALCOHOL AMÍLICO

Con 2-oxobutirato, en vez de piruvato, la correspondiente secuencia conduce a la isoleucina y de allí, a través del 2-oxo-3-metilvalerato al alcohol amílico. (36)

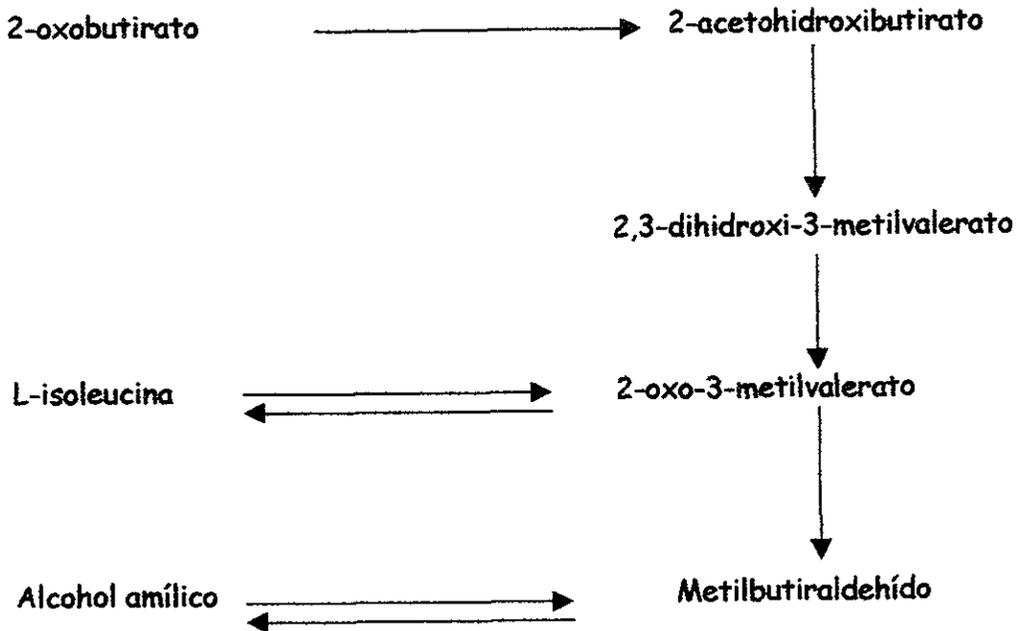


Figura 11 Mecanismo de formación del alcohol amílico

ACETONA, ISOPROPANOL, N-BUTANOL

Una fracción significativa del Acetil-CoA se convierte en acetoacetato ó (D)-B-hidroxi-butirato.

A este tipo de fermentación se le conoce como butírica, y es realizada por algunas especies de *Clostridium*.

Esta fermentación conduce a una variada serie de productos, pero siempre se forma butirato, bien como producto final o como intermediario en la formación de n-butanol. (36)

La glucosa se convierte en piruvato y el piruvato después de una serie de reacciones se convierte en acetil-CoA, CO₂ y equivalentes de reducción. Entonces el acetil-CoA se reduce a productos de fermentación usando el NADH formado en las reacciones glucolíticas. Las proporciones de los diferentes productos son influidas por la duración y las condiciones de fermentación. Dependiendo del pH serán los productos que se obtengan. En la primera etapa se forman los ácidos, pero a medida que el pH decae empiezan a acumularse los productos neutros, la acetona y el butanol. (34, 36, 39)

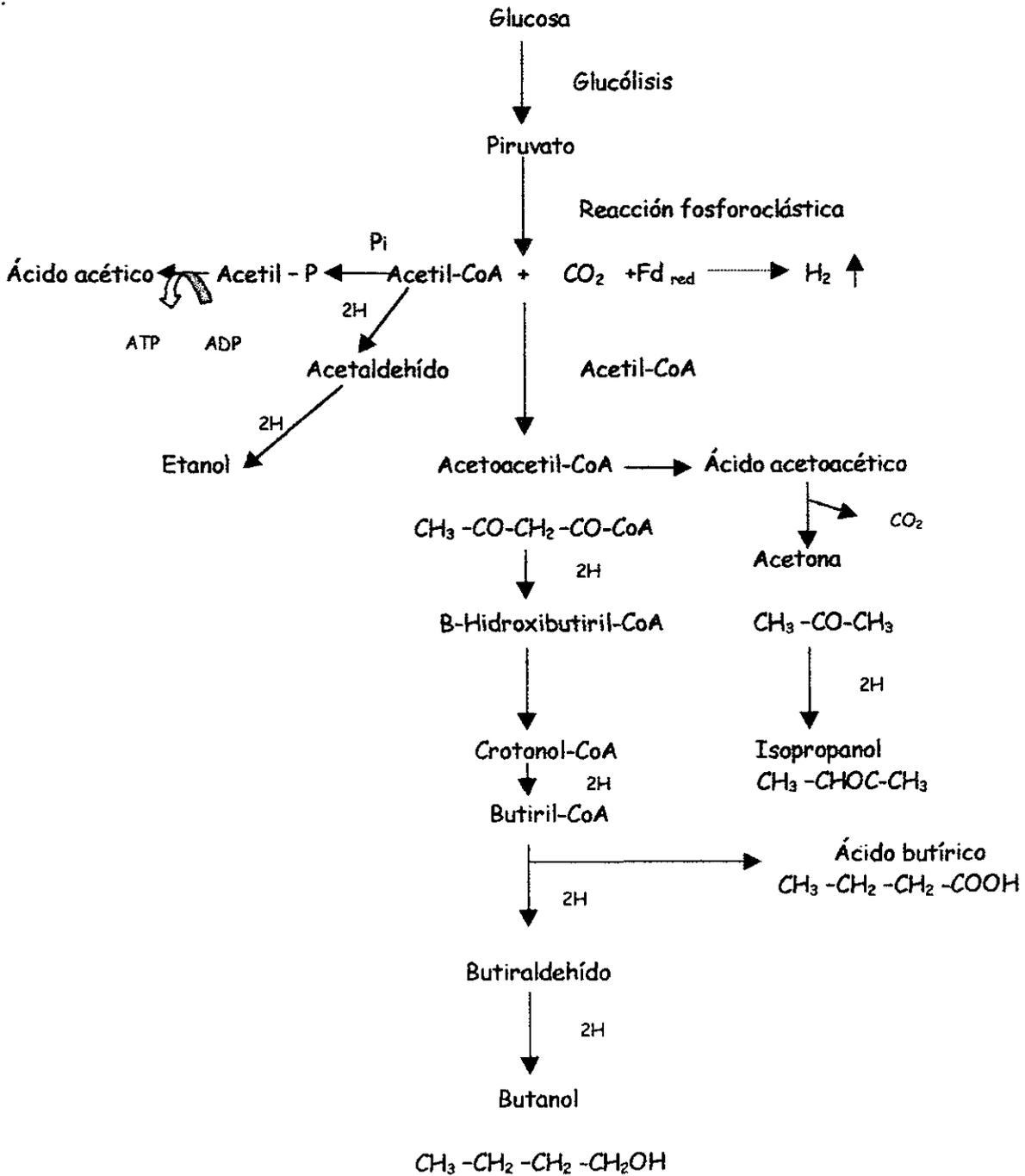


Figura 12 Vía de la formación de acetona, isopropanol, butanol y ácido butírico

DIACETILO

Observaciones realizadas en levaduras han permitido formular la hipótesis de que la formación de diacetilo está relacionada con el α -acetolactato o la L-valina.

Esto se fundamenta en lo siguiente:

1. En *Sacch. Cerevisiae* y otros organismos el acetolactato es un precursor de la acetoina (el cual es un precursor del diacetilo) y de la valina.
2. Preparaciones "libres de células" de *Sacch. Cerevisiae* convierten el α -acetolactato a 2-oxoisovalerato, y este da lugar a la valina en un sistema que requiere NADP.
3. Se encontró que la formación de diacetilo durante la fermentación fue fuertemente disminuida por la adición de L-valina, pero no por algún otro aminoácido u otro compuesto nitrogenado. (36)

Todo lo anterior favorece el punto de vista de que el diacetilo se forma como subproducto de la síntesis de valina partiendo del piruvato vía acetolactato, por lo que se sugiere que algún tratamiento tiende a suplantar la ruta anaeróbica por la ruta aeróbica (p.ej. un incremento en el contacto con aire por transferencia durante la fermentación y se predispone a la célula a formar diacetilo). (36)

Entonces puede decirse que si la célula requiere valina, puede por cambios adaptativos, incrementarse la capacidad de la levadura para sintetizar la valina y de esta forma el diacetilo.

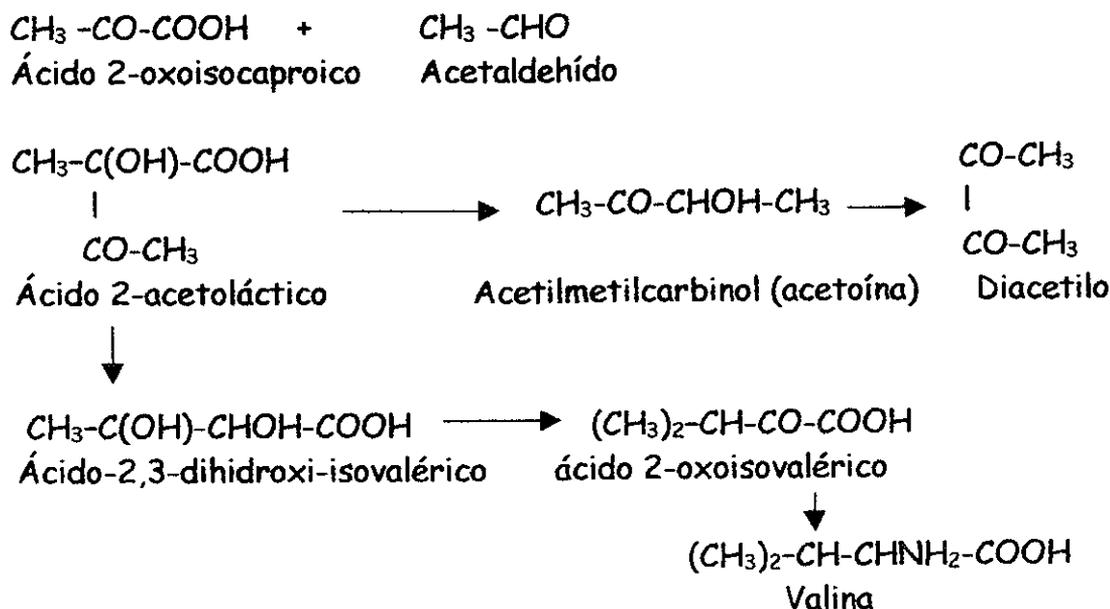


Figura 13 Mecanismo de la formación de diacetilo

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ceratocystis fimbriata es un hongo filamentosos que ha sido estudiado por su capacidad de producir aromas frutales que pueden ser de gran interés para la industria de los alimentos, y, considerando que la vitamina B₁ (tiamina) es necesaria para el mejor crecimiento de *Ceratocystis fimbriata*, y además que los procesos fermentativos que pueden ser utilizados a nivel industrial deben ser optimizados, en este trabajo se pretende determinar el efecto de la tiamina al ser adicionada al PDA (medio sólido, para la obtención del inóculo) y/o al medio de cultivo líquido, así como la concentración de tiamina que proporcione un mayor crecimiento y producción de volátiles, al trabajar con dos concentraciones de tiamina menores y una mayor a 10^{-4} mol/L (33.7 mg de tiamina/L).^(5,6)

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la tiamina en el crecimiento y producción de compuestos volátiles a diferentes concentraciones de tiamina (2.5, 12.5, 37.5 $\mu\text{g/mL}$), en un medio de cultivo líquido, utilizando esporas cultivadas con y sin tiamina en PDA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar por análisis del espacio de cabeza (headspace), utilizando cromatógrafo de gases, la concentración de compuestos volátiles totales formados durante el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* por un lapso de 120 horas a las diferentes concentraciones de tiamina.

Establecer cual es el tiempo en que se obtiene la mayor concentración de los compuestos volátiles de interés.

Determinar la relación existente entre el crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* con respecto a la concentración de tiamina, mediante la cuantificación del peso seco (g).

Determinar la concentración de tiamina a la que se obtuvo el mayor rendimiento de biomasa y de productos volátiles totales.

5. HIPÓTESIS

En estudios realizados con *Ceratocystis fimbriata* se concluyó que la producción de aromas frutales está asociada con su crecimiento, y además, que puede obtenerse una mayor cantidad de biomasa cuando se le adiciona tiamina al medio de cultivo, por lo tanto, es factible suponer que : *al adicionar tiamina al PDA (medio sólido) y al medio de cultivo líquido, mayor será la producción de biomasa y de volátiles con aroma frutal.*

6. MATERIAL Y MÉTODOS

INSTRUMENTOS

Balanza analítica Mettler
Balanza semianalítica Mettler
Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (gas acarreador: helio grado cromatográfico; detector: aire e hidrógeno)
Columna Carbowax 20M (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro)
Espectrofotómetro UV-Visible
Potenciómetro Corning

EQUIPO

Autoclave AESA
Bomba de vacío Felisa Modelo 1600
Campana de flujo laminar Veco
Estufa Felisa
Microscopio Nikon Type 104
Parrillas de agitación y calentamiento Thermolyne 1000
Refrigerador General Electric
Shaker con agitación y temperaturas controladas

MATERIAL DE VIDRIO

Cajas petri
Camara de Neubauer
Cubreobjetos
Embudo Büchner
Frascos serológicos de 100ml
Matraces Erlenmeyer de 125ml, 250ml y 1000ml
Matraces Kitazato de 250 ml
Pipetas graduadas de 1 ml, 2ml, 5ml, y 10ml
Pipetas Pasteur
Portaobjetos
Probetas de 25ml y 100ml
Termómetros con escala de 10°C a 150° C
Tubos de ensaye 13x100
Tubos de ensaye 18x150
Vasos de precipitado de 10ml, 100ml, 250ml, 600ml

OTROS

Algodón
Barras de agitación magnéticas
Espátula metálica
Gasa
Gradillas metálicas
Housing con membrana de 0.22μ de teflón (Millipore)
Jeringa de cromatografía gas tight de 2 mL
Ligas
Mechero Fisher
Micropipeta de 25μ L Volac
Micropipeta de 50μ L Gilson
Papel aluminio
Papel filtro Wathman No. 2
Perilla

MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Agar Papa Dextrosa (Merck)

REACTIVOS PARA MEDIO LÍQUIDO ESTÁNDAR

Glucosa J.T. Baker
Urea J.T. Baker
Sulfato de amonio J.T. Baker
Fosfato de potasio monobásico J.T. Baker
Nitrato férrico J.T. Baker
Sulfato de Zinc J.T. Baker
Sulfato de magnesio $7 H_2O$ J.T. Baker

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó una cepa de *Ceratocystis fimbriata* CBS 374-83, proveniente de (Centralalbureau Voor Schimmelcultures) Baarn, The Netherlands.

MANTENIMIENTO DE LA CEPA

La cepa se conservó en agar inclinado de Saboraund, cubierto con aceite mineral estéril.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se emplearon esporas frescas cultivadas en seis matraces de 250 mL utilizando 75 mL de agar papa dextrosa preparado de acuerdo a las instrucciones del proveedor, se inoculó la cepa por punción y se incubó a $30^{\circ} C$ por cinco días.

COSECHA DE ESPORAS

Se colocaron 70 mL de agua en un matraz de 250 mL, 30 perlas de vidrio y un agitador magnético. Todo esto se esterilizó en el autoclave a 121 °C (15 psi) durante 15 minutos. Después de que el matraz y su contenido alcanzaron la temperatura ambiente, en una campana de flujo laminar y con un mechero Fisher, se vació su contenido en uno de los matraces donde se cultivaron las esporas. Se agitó durante tres minutos en una placa de agitación a tres cuartos de la capacidad total de la placa y se vertió el contenido de este matraz en otro de los seis matraces. Esta misma operación se realizó con los siguientes cinco matraces en las mismas condiciones.

CONTEO DE ESPORAS

Se tomaron 0.5 mL de la solución de esporas y este volumen se llevó a 4.5 mL de agua para obtener una dilución 1:10. Con una pipeta Pasteur se tomó una cantidad de la suspensión de esporas y después de agitar un minuto con vortex, se realizó la cuenta de esporas en la cámara de Neubauer (factor de conversión $(25) (10^4) / 13$). Se contaron 13 cuadros. El número de esporas se calculó con la siguiente relación:

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

Donde N = número de esporas recuperadas

N = número de esporas contadas

d = factor de dilución

V = volumen de la solución de esporas

Se obtienen aproximadamente 1×10^8 esporas por matraz.

PREPARACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO ESTÁNDAR

En este trabajo se usó el medio líquido estándar de máxima producción para *Ceratocystis fimbriata*, elaborado por Christen. (40)

La composición del medio líquido estándar es la siguiente:

Glucosa	50 g/L
Urea	1.9 g/L
Sulfato de amonio	4.5 g/L
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g/L
Nitrato de calcio $4 H_2O$	1.0 g/L
Sulfato de magnesio $7 H_2O$	0.75 g/L

Oligoelementos: (se usaron 2 mL por cada litro de medio líquido estándar)

Nitrato férrico	723.8 mg/L
Sulfato de Zinc $7 H_2O$	439 mg/L
Sulfato de magnesio $7 H_2O$	203.0 mg/L

Se disolvió la glucosa en 200 mL de agua. Se reguló el pH de la glucosa a seis con una solución de hidróxido de sodio 0.5 M. La solución de glucosa se esterilizó sin ningún otro componente del medio después de ajustar el pH. Las macrosales y oligoelementos se esterilizaron por separado a 121°C (15 psi) durante 15 minutos. La urea y el sulfato de amonio se disolvieron en un matraz con 200 mL de agua y se esterilizaron por separado a la misma presión y temperatura mencionadas arriba. (46)

En la fermentación líquida se usaron 40 frascos serológicos de 100 mL. En los frascos se adicionaron 20 mL de medio líquido estándar y se procedió a inocular con el volumen calculado que contuviera aproximadamente 2×10^7 esporas. Los frascos se cubrieron con seis capas de gasa con los hilos entrecruzados con una capa de algodón intermedia. Los tapones de gasa se sujetaron con ligas.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

BIOMASA

Se filtró el contenido de cada uno de los frascos serológicos de 100 mL por filtración al vacío, utilizando discos de papel whatman previamente pesados e identificados, los cuales se manipularon con pinzas. Los discos de papel whatman con el material filtrado (micelio) se secaron por 24 horas a 65°C.

MEDICIÓN DE pH

Se midió el pH empleando un potenciómetro Corning con electrodo de vidrio. El potenciómetro se calibró con soluciones buffer de pH cuatro y diez.

ANÁLISIS DEL ESPACIO DE CABEZA (HEADSPACE)

Se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5890, equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de carbowax con 30 m de longitud, con un diámetro interno de 0.25 mm, y con un espesor de película de 0.25 μm . La temperatura del inyector y del detector utilizada fue de 225°C. La temperatura del horno se controló automáticamente con el programa de calentamiento con temperatura inicial de 35°C durante 3 minutos, y una rampa de temperatura de 5°C cada minuto hasta llegar a 190°C. Se usó helio como gas acarreador, y para el detector, hidrógeno y aire. La relación split fue 1:40 y el volumen de inyección de 2 mL.

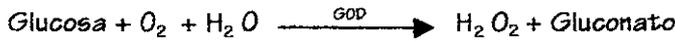
Para cuantificar los componentes del headspace se elaboraron curvas estándar inyectando de 0-40 microlitros de los compuestos de interés en una ampolla de 500 mL. Se equilibró la temperatura de la ampolla durante 15 minutos a 30°C. Se inyectaron 2 mL de los compuestos de interés al cromatógrafo de gases. Se elaboraron curvas estándar graficando área contra concentración en microlitros por litro.

CONSUMO DE GLUCOSA

El consumo de glucosa se determinó mediante el método de Trinder, utilizando la prueba enzimático-colorimétrica, GOD-PAP.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La determinación de glucosa se efectúa mediante el método de Trinder según las siguientes reacciones:



REACTIVOS

Reactivo 1	TRIS pH 7.4	92 mmol/L
Solución Tampón	Fenol	0.3 mmol/L
Reactivo 2	Glucosa oxidasa	15000 U/L
	Peroxidasa	1000 U/L
	4-Aminofenazona	2.6 mmol/L
Estándar	Sol. Glucosa	100 mg/L

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Se disolvieron los enzimas del reactivo dos con el contenido del reactivo uno. Esta solución monoreactiva es estable un mes a 2-8 °C ó siete días a temperatura ambiente, al abrigo de la luz.

En la técnica se manejaron los siguientes parámetros:

Longitud de onda	505 nm
Temperatura	30 °C
Cubeta o celda	1 cm paso de la luz

Se ajustó a cero con blanco de reactivo

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	-	20 µL	-
Muestra	-	-	20 µL
Reactivo	2 mL	2 mL	2 mL

Se mezcló e incubó 30 minutos a temperatura ambiente. La coloración es estable 30 minutos a temperatura ambiente.

El método es lineal hasta valores de 500 mg/dL, por lo que cuando las concentraciones fueron superiores a este valor se diluyeron las muestras y se multiplicó el resultado por el factor de dilución.

El cálculo de la concentración de glucosa se realizó con la siguiente fórmula.

$$\text{mg/dL Glucosa} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra}}{\text{Densidad óptica del estándar}} \times \text{concentración del estándar}$$

$$\text{mg/dL} \times 0.0555 = \text{mmol/L}$$

$$\text{Concentración del estándar : 100 mg/dL}$$

PROCEDIMIENTO GENERAL

FASE I

Se preparó una solución patrón (solución stock) cuya concentración fue de 10 mg/ mL. De esta solución se adicionaron 2.5 mL en 500 mL de agar papa dextrosa para obtener una concentración de 50 mg/L de tiamina en el agar. La cepa de *Ceratocystis fimbriata* se sembró por punteo en seis matraces con 75 mL de agar papa dextrosa. A éstas esporas, sembradas con 5 mg de tiamina /L de PDA se les denominó esporas T+. Los matraces se colocaron en una incubadora a 30° C (+/- 1°C) durante cinco días. Después de los cinco días para la obtención de las esporas, se procedió a preparar y esterilizar los materiales necesarios para la fermentación. Se preparó un litro de medio líquido estándar, para lo cual se pesaron las cantidades especificadas en la sección de medio de cultivo líquido estándar, se esterilizó y enfrió hasta llegar a la temperatura ambiente.

En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Fisher) se colocaron 200 mL de medio estándar en tres matraces de 500 mL. Se preparó una solución patrón con una concentración de 1 mg/ mL y se adicionaron los volúmenes que se especifican en la tabla 5, para obtener las siguientes concentraciones de tiamina 2.5 µg/ mL, 12.5 µg/ mL, y 37.5 µg/ mL en los respectivos matraces con 200 mL de medio líquido estándar. La solución patrón (solución stock) de tiamina antes de adicionarse a los respectivos medios líquidos, se esterilizó por filtración.

Concentraciones de tiamina en los medios líquidos para realizar la fermentación	2.5 µg/mL	12.5 µg/mL	37.5 µg/mL
Volumen de solución patrón que se adicionó a 200 ml de medio líquido estándar	0.5 mL	2.5 mL	7.5 mL

Tabla 5 Volúmenes para preparar medios de cultivo con tiamina

Se prepararon diez frascos serológicos con 20 mL de medio estándar a los cuales no se les adicionó tiamina. Éstos frascos se etiquetaron como medio estándar. Se tomó un pequeño volumen del medio estándar restante y se midió el pH. Después se prepararon diez frascos serológicos con 20 mL de cada concentración de tiamina 2.5 µg/ mL, 12.5 µg/ mL y 37.5 µg/ mL. Cada determinación se hizo por duplicado por lo cual se trabajó con diez frascos. Los frascos fueron previamente etiquetados para evitar confusiones.

De acuerdo a la cuenta de esporas se calculó el volumen para inocular aproximadamente 2×10^7 esporas en cada frasco. Se inocularon los 40 frascos de vidrio de boca chica y se cubrieron con seis capas de gasa y algodón, ajustando los tapones con liga. Se incubó a 30° C y se mantuvieron en agitación lenta. El análisis de espacio de cabeza (headspace), biomasa (filtración), y pH, se realizaron a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de fermentación en ese orden. La determinación del consumo de glucosa, se realizó después de las 120 horas de fermentación, para contar con todas las muestras por analizar.

La filtración de la biomasa se realizó en discos de papel wathman No.2 previamente identificados y pesados. Las muestras se colocaron en una estufa a 65° C por 24 horas.

Con el líquido filtrado se midió el pH y se guardaron los filtrados en tubos de ensayo etiquetados para cuantificar la glucosa del medio con el kit Glucosa GOD-PAP/Trinder.

FASE II

En esta parte del experimento se cultivaron sin tiamina las esporas de *Ceratocystis fimbriata* en agar papa dextrosa, por lo que en este trabajo se les llamó esporas T-. Se siguió el mismo procedimiento de la Fase I y ambas fases se realizaron dos veces por duplicado.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se promediaron los resultados de biomasa, pH, consumo de glucosa y se obtuvo la desviación estándar. Por lo que respecta a los resultados de producción de volátiles se trataron con el procedimiento de comparación apareada de Tukey, el cual permite comparar K medias entre sí.

Tukey demostró que todos los límites de confianza para $n_i - n_j$ vienen dados por

$$(\bar{y}_i - \bar{y}_j) \pm q_{k,v,\alpha/2} / \sqrt{2} s (1/n_i + 1/n_j)^{1/2}$$

Donde $q_{k,v}$ es el nivel de significación superior apropiado del rango estudentizado para K medias y v el número de grados de libertad en la estimación de la varianza σ^2 por la desviación estándar. Esta fórmula es exacta si el número de observaciones de todas las medias es igual y aproximada si las medias se basan en distintos números de observaciones.

La longitud del intervalo de confianza para cualquier nivel de confianza dado es mayor cuando se utiliza el estadístico de rango $q_{k,v}$ que cuando se utiliza el estadístico t , puesto que el estadístico de rango tiene en cuenta la posibilidad de que cualquiera de las $k(k-1)/2$ posibles parejas de diferencias pueda ser seleccionada en el contraste. Los valores críticos de $q_{k,v} / \sqrt{2}$ han sido tabulados. El nivel de significación (error tipo I) es $\alpha=0.05$

$$\pm q_{k,v,\alpha/2} / \sqrt{2} ((1/n_i + 1/n_j) s^2)^{1/2}$$

Cualquier diferencia observada, mayor en valor absoluto que el valor obtenido con esta fórmula, puede considerarse estadísticamente significativa.

Para este estudio $k=8$ diferentes concentraciones de tiamina y $n=4$ observaciones de cada tipo. Se estimó la media y_t de cada tratamiento t y la varianza s^2 .

A continuación se presenta la descripción del procedimiento que se realizó para la comparación apareada de Tukey con los resultados de la acetona, así como la forma en que se interpretan. Los resultados de la producción de volátiles, en este caso de la acetona, fueron integrados con el programa Origin. El modelo al que se ajustó su comportamiento, correspondió a la regresión polinomial descrita por la siguiente ecuación:

$$Y = A_0 + A_1x + A_2x^2 + A_3x^3$$

Con este programa de computadora, también se obtuvieron las desviaciones estándar, así como los coeficientes de correlación. En el anexo 2 se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos con el programa Origin utilizando los datos del acetato de isobutilo para el medio estándar T+.

Una vez que se obtuvieron los promedios de las áreas bajo la curva de la producción de acetona, la desviación estándar y la varianza, se promedió la varianza total (σ^2) y se colocaron en una tabla como la que se muestra en el ejemplo de la acetona para la comparación apareada de Tukey para ANCO de producción acumulada de la acetona (tabla 6).

Se realizaron los cálculos para obtener el parámetro de comparación, y se procedió a calcular las diferencias de las medias ($y_i - y_j$) de las áreas bajo la curva de la producción de acetona en los diferentes medios trabajados en este experimento.

Para obtener las diferencias de las medias de la primera fila, y_i tomó el valor de la media del estándar T+, y a y_j se le asignaron los valores de las medias 2.5 T+, 12.5 T+, 37.5 T+, estándar T-, 2.5 T-, 12.5T-, 37.5T-. Las diferencias de medias de la segunda fila se obtuvieron, asignando a y_i el valor de la media 2.5 T+, y y_j tomó los valores de las medias, de los medios 12.5 T+ ... 37.5 T-. Para la tercera fila, y_i tomó el valor de la media 12.5 T+, y y_j tomó los valores de los medios 37.5 T+...37.5 T-. De forma similar se obtuvieron las diferencias de medias que se presentan en el ejemplo, asignando el valor y_i a la media de cada uno de los medios de cultivo, excepto la media del área bajo la curva del medio 37.5 T-.

Siguiendo este procedimiento se obtuvieron las 28 diferencias de medias (Tabla 6) y después se procedió a calcular el parámetro de comparación, que es el valor absoluto, respecto al cual se han de comparar las diferencias de las medias

$$K = 8$$

$$S^2_{T-}$$

$$V = k(k-1)/2$$

$$V = (8(8-1))/2$$

$$V = 8(7)/2$$

$$V = 28$$

$$\alpha = 0.05$$

$$q_{k,v, \alpha/2} / 2^{1/2}$$

$$q_{8,28, 0.025} / 2^{1/2} = 4.46 / 2^{1/2}$$

$$q_{8,28} / 2^{1/2} = 3.15$$

$$\pm q_{k,v, \alpha/2} / 2^{1/2} \left((1/n + 1/n)s^2 \right)^{1/2} = 3.15 \left((1/4 + 1/4)0.018 \right)^{1/2}$$

$$\pm = 0.298 \text{ (Valor de referencia)}$$

Para la interpretación de los resultados, es suficiente comparar el valor absoluto obtenido con las diferencias de las medias. De esta forma puede considerarse estadísticamente significativa cualquier diferencia mayor en valor absoluto, con el valor de referencia.

Para el ejemplo de la acetona, las 28 diferencias de medias son mayores, en valor absoluto, con el valor de referencia (0.298). De acuerdo a la comparación apareada de Tukey, hay diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los medios.

Comparación apareada de Tukey para ANCO de producción acumulada de Acetona

Tratamiento	STD T+	2.5 T+	12.5 T+	37.5 T+	STD T-	2.5 T-	12.5 T-	37.5 T-
ABC	7.95	17.69	6.2	25.02	296.65	350.91	168.45	234.76
sd	0.2	0.0054	0.01	0.096	0.12	0.27	0.14	0.16
sd ²	0.04	2.92E-05	0.0001	0.00922	0.0144	0.0729	0.0196	0.0256
s ² _T	0.018							

Tratamiento	STD T+	2.5 T+	12.5 T+	37.5 T+	STD T-	2.5 T-	12.5 T-	37.5 T-
Acetona	7.95	17.69	6.2	25.02	296.65	350.91	168.45	234.76
	*	-9.74	1.75	-17.07	-288.7	-342.96	-160.5	-226.81
		*	11.49	-7.33	-278.96	-333.22	-150.76	-217.07
			*	-18.82	-290.45	-344.71	-162.25	-228.56
				*	-271.63	-325.89	-143.43	-209.74
					*	-54.26	128.2	61.89
						*	182.46	116.15
							*	-121.76

Valor de referencia = 0.298

$$K=8$$

$$S^2_T=$$

$$V= k(k-1)/2$$

$$V=(8(8-1))/2$$

$$V=8(7)/2$$

$$V=28$$

$$\alpha=0.05$$

$$q_{k,v, \alpha/2/21/2}$$

$$q_{8,28, 0.025/21/2}= 4.46/21/2$$

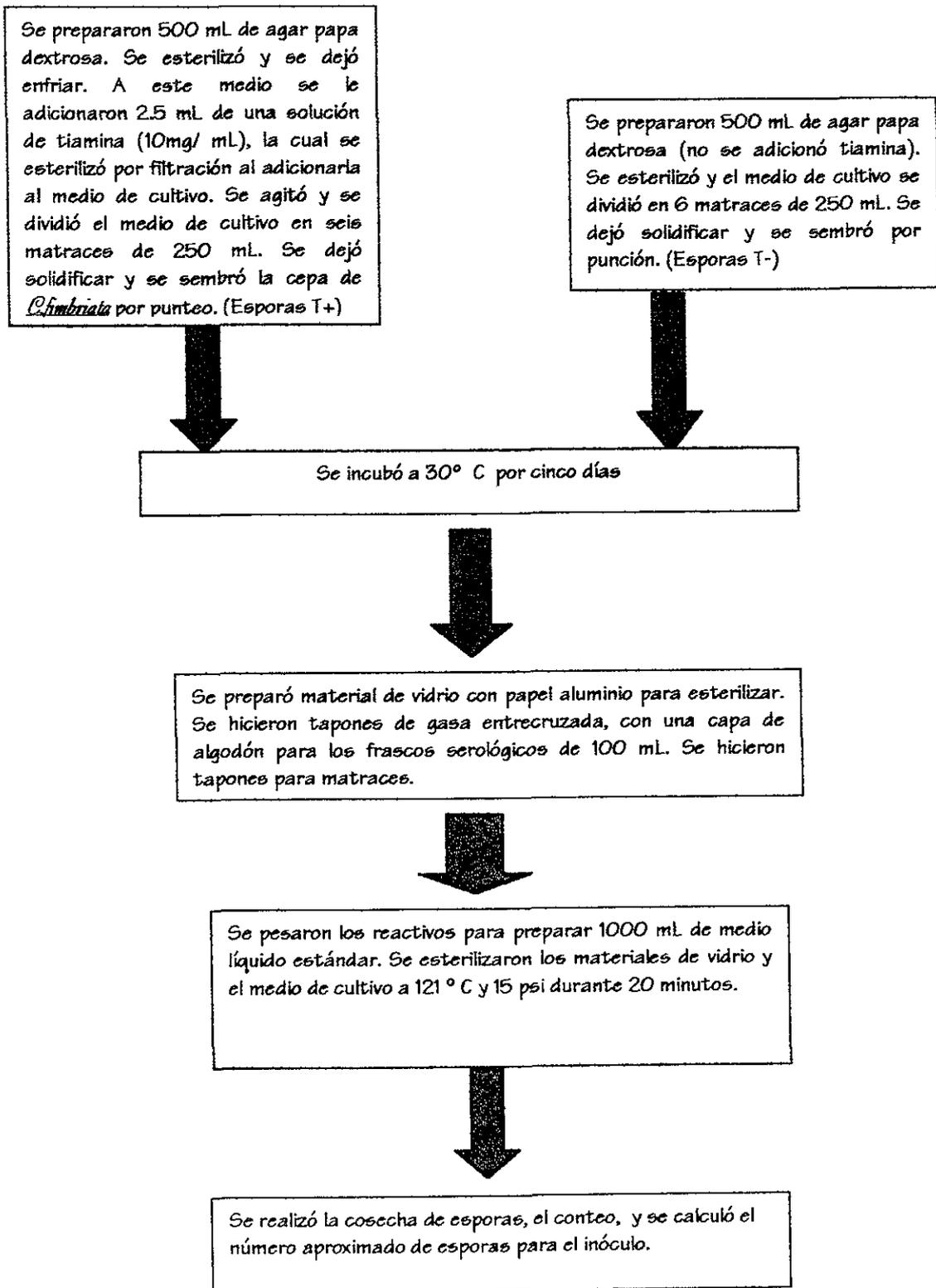
$$q_{8,28/21/2}= 3.15$$

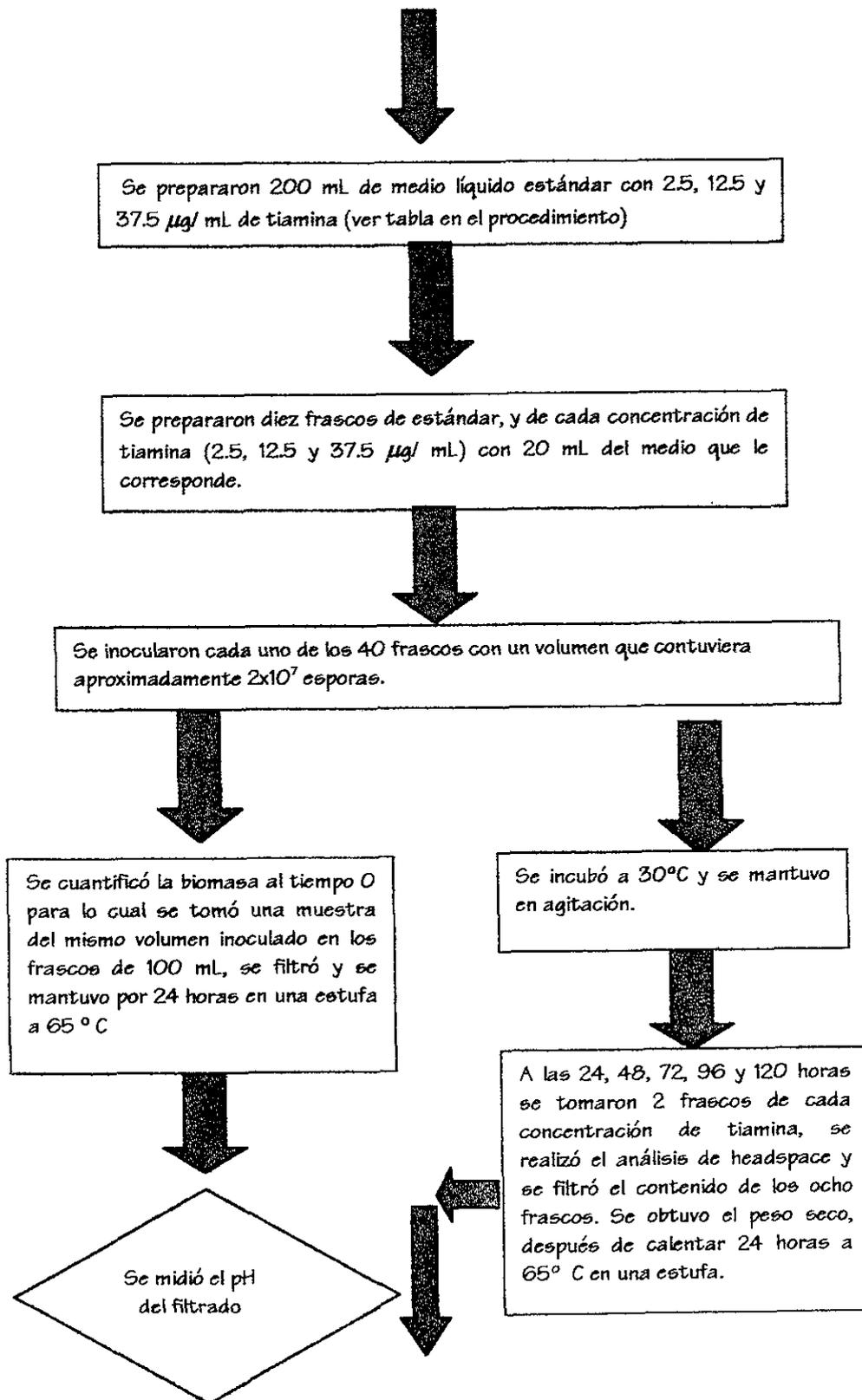
$$+ q_{k,v, \alpha/2/21/2} \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n} s^2 \right)^{1/2} =$$

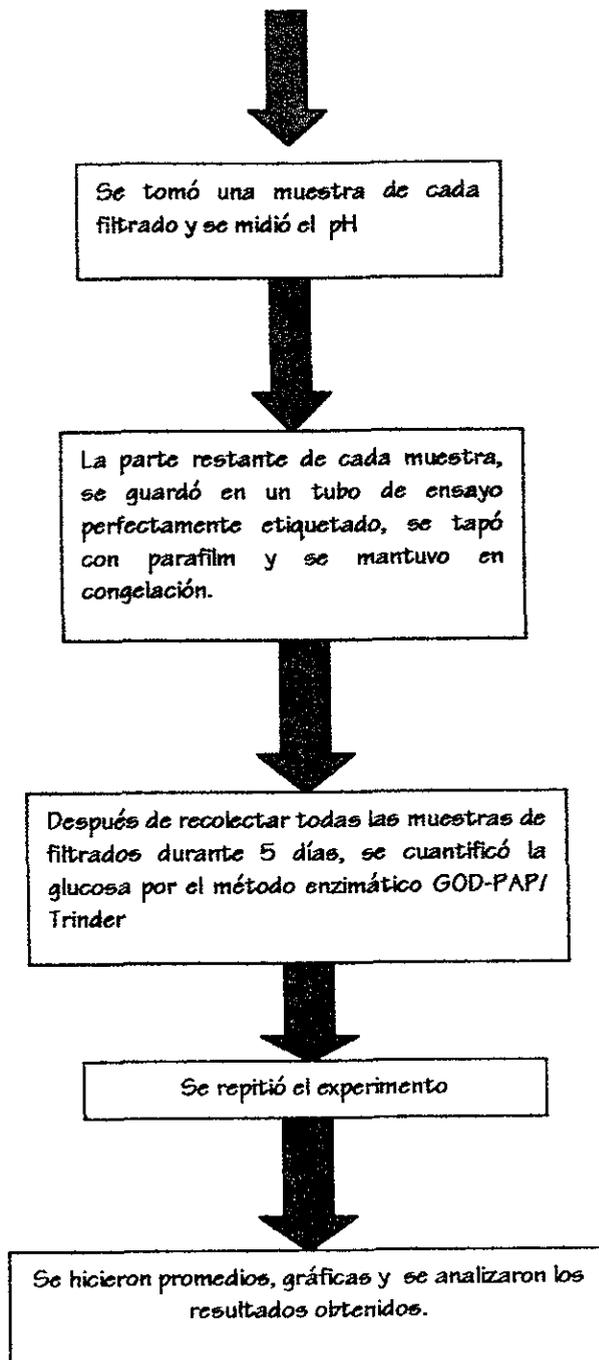
$$= 3.15 \left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4} 0.018 \right)^{1/2}$$

$$+ = 0.298 \text{ (Valor de referencia)}$$

DIAGRAMA DE FLUJO







RESULTADOS

Las dos fases del experimento se repitieron dos veces por duplicado, se promediaron los resultados y se obtuvieron las figuras y tablas que se presentan a continuación. A los resultados obtenidos en la producción de aromas se les aplicó un modelo de regresión polinomial, a partir del cual se obtuvieron las áreas bajo la curva de la producción de cada compuesto. En el anexo 2 se presenta solamente un ejemplo de los resultados obtenidos con el programa Origin, debido a que la cantidad de información procesada fue muy grande.

Se aplicó el modelo de regresión polinomial, ya que el comportamiento de la producción acumulada de cada volátil se ajustó a este modelo. Los coeficientes de correlación de la producción acumulada se encontraron en un rango de 0.99995-0.95689, y la desviación estándar en un rango de 0.0137-37.8376. Respecto a los resultados de biomasa, pH y consumo de glucosa, también se calculó la desviación estándar, las cuales fueron de 0.007-1.8, 0.07-0.49 y 0.53-5.81098 respectivamente.

Considerando estos resultados se puede decir que los métodos utilizados para la cuantificación de biomasa, pH, consumo de glucosa y productos volátiles fueron repetibles y se manejaron en condiciones semejantes.

Por otra parte, el tratamiento estadístico que consistió en la comparación apareada de Tukey indica que hubo diferencia estadísticamente significativa mayor al 5% entre la producción de cada medio de cultivo (medios T+ y T-), en los diferentes compuestos volátiles obtenidos, excepto, en la producción de alcohol amílico, en los medios estándar T+ y 37.5 T+.

Curvas de biomasa, consumo de glucosa y pH, con esporas T+

Medio estándar
T+

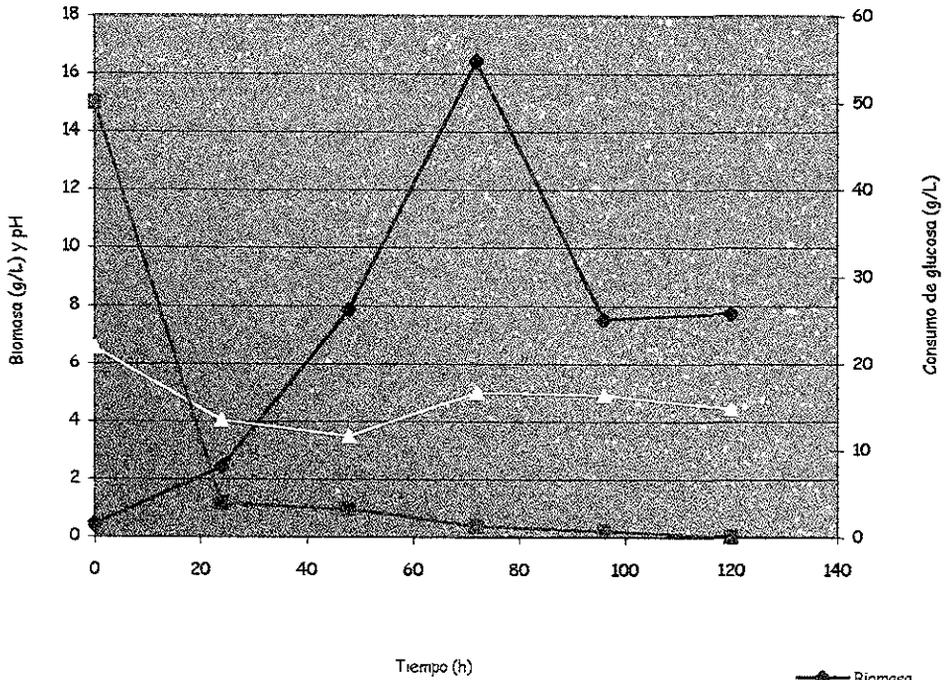


Figura 14 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas con 5 mg de tiamina/L de PDA.

Medio 2.5
T+

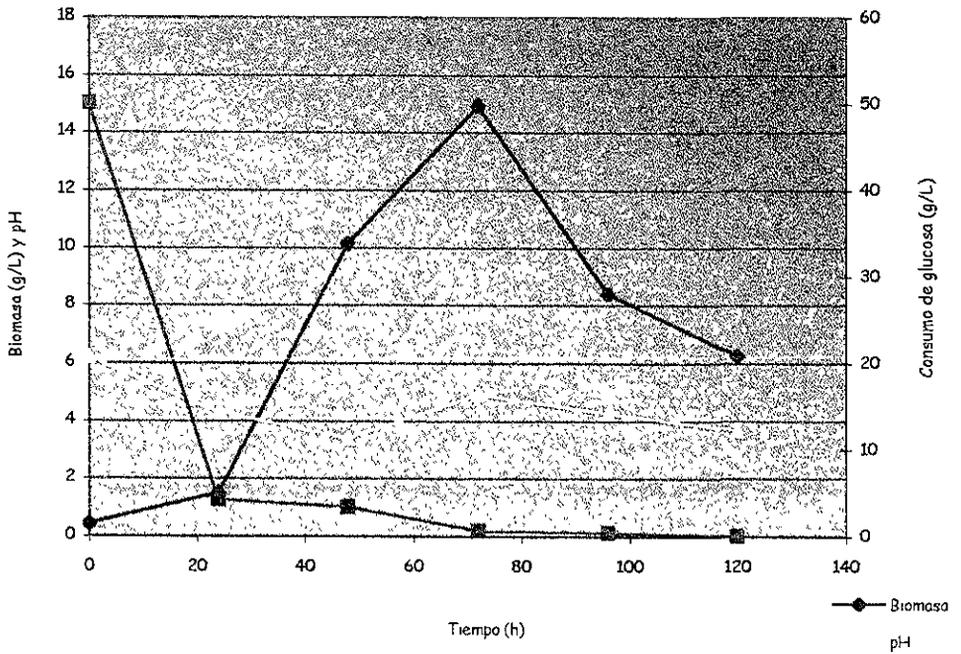


Figura 15 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 2.5 mg/L de tiamine, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas con 5 mg de tiamina/L de PDA.

Medio
12.5
T*

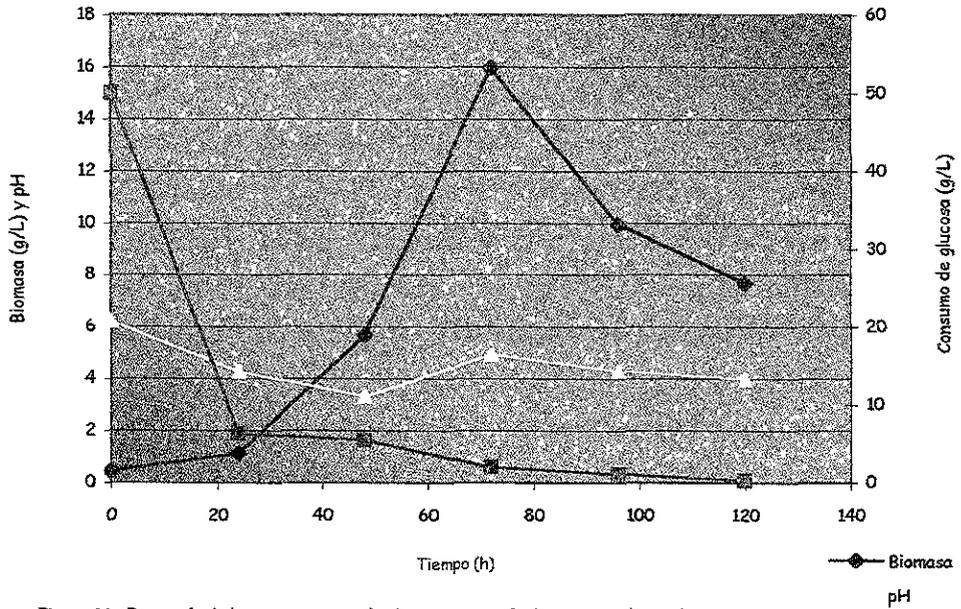


Figura 16 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 12.5 mg/L de tiamina, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas con 5 mg de tiamina/L de PDA.

Medio
37.5
T*

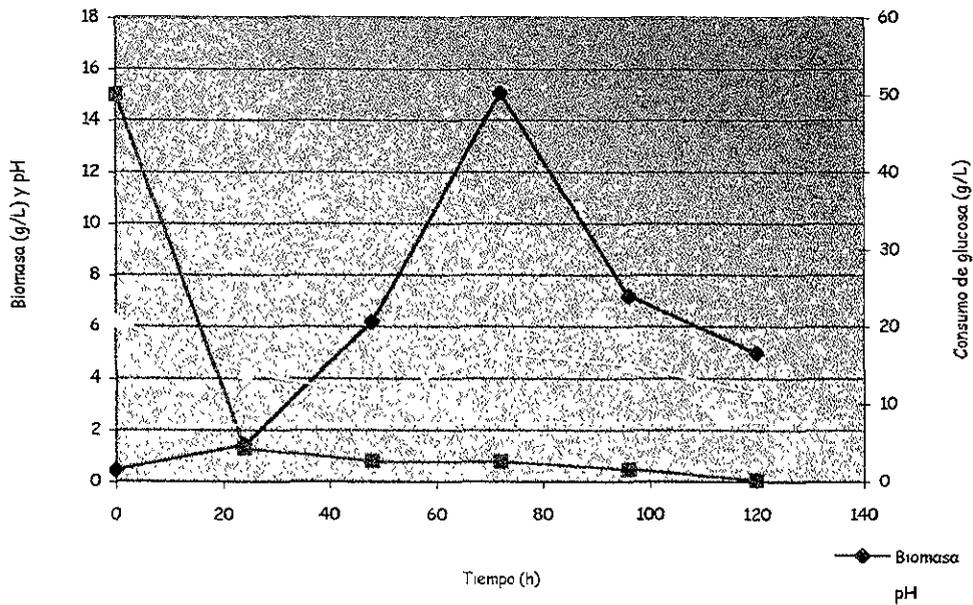


Figura 17 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 37.5 mg/L de tiamina, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas con 5 mg de tiamina/L de PDA.

Curvas de biomasa, consumo de glucosa y pH con esporas T-

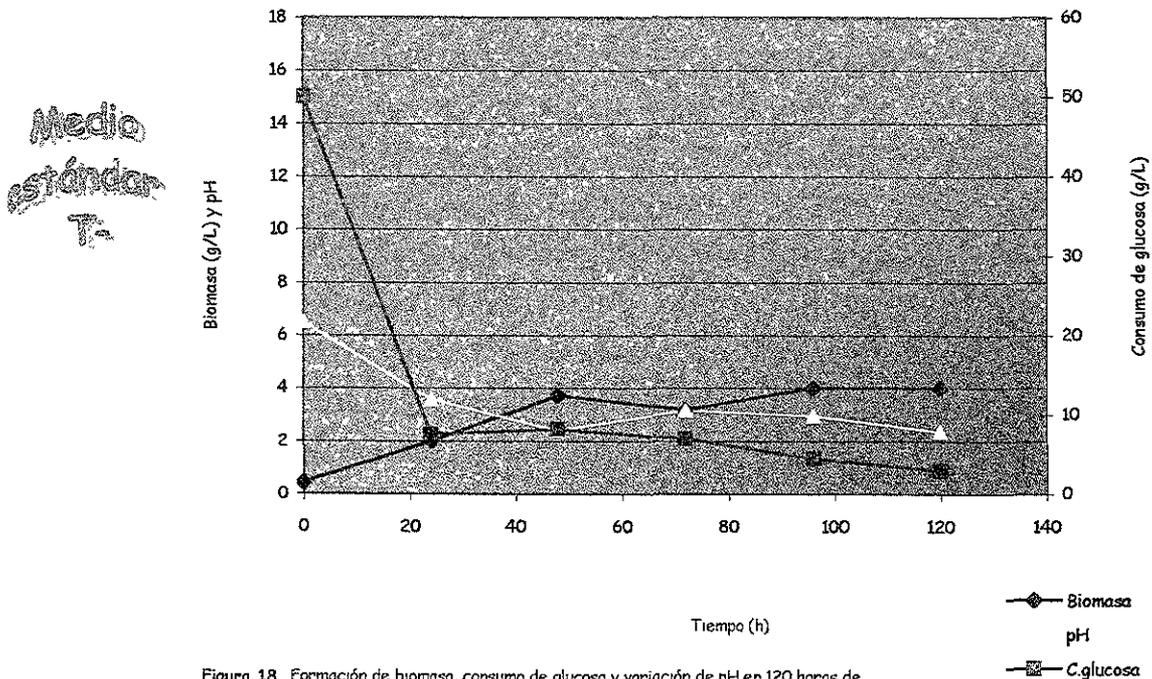


Figura 18 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas sin tiamina en PDA.

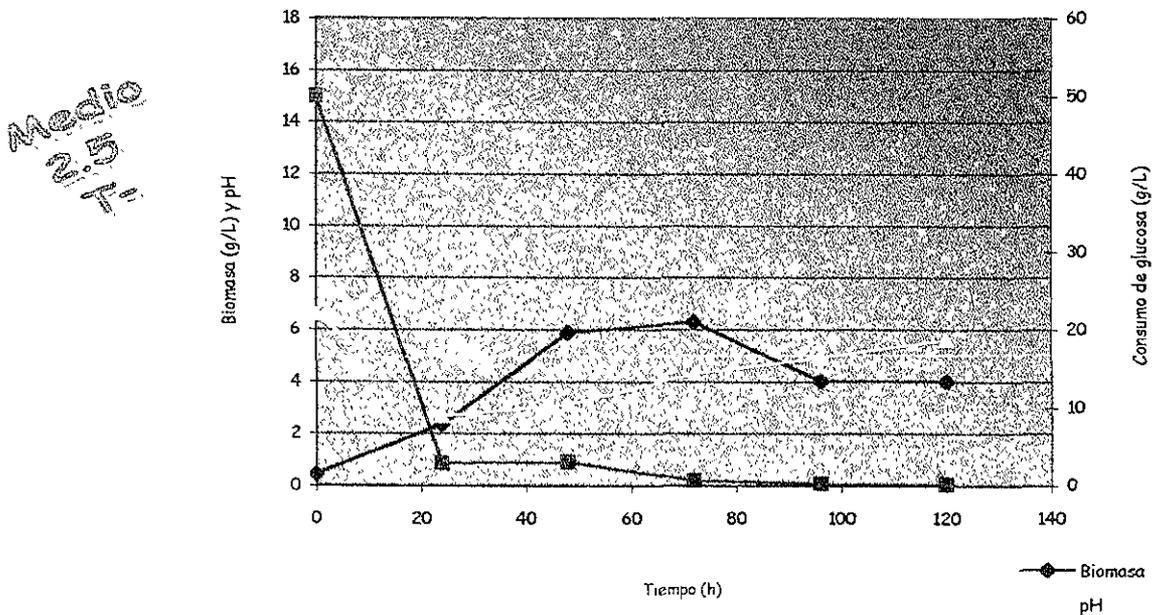


Figura 19 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 2.5 mg/L de tiamina, utilizando esporas de *C.*

Medio
12.5
T-

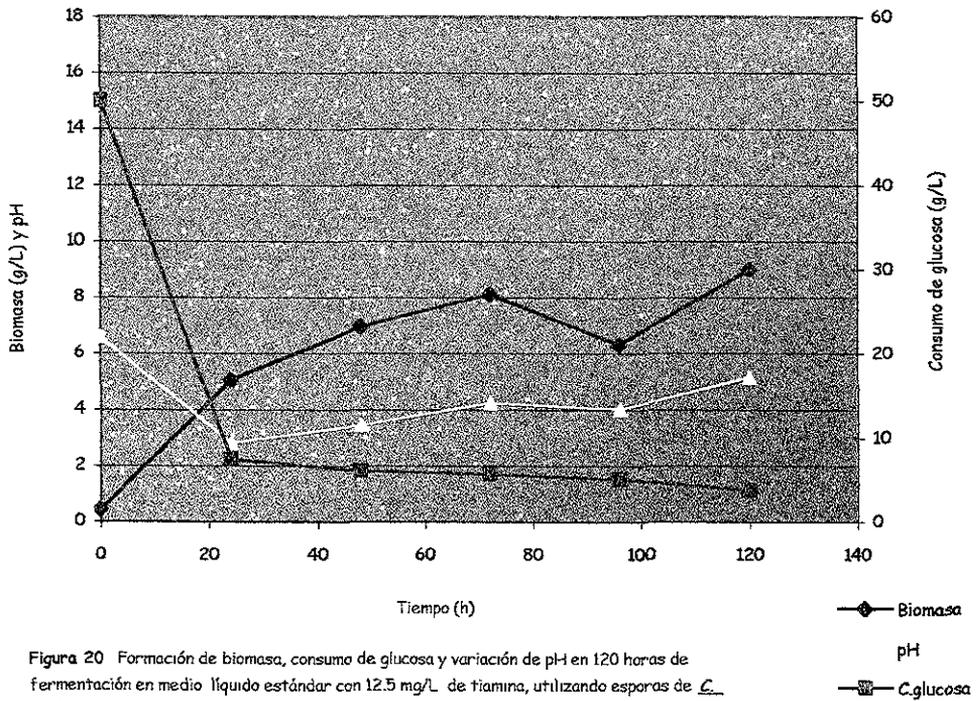


Figura 20 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 12.5 mg/L de tiamina, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas sin tiamina en PDA.

Medio
37.5
T-

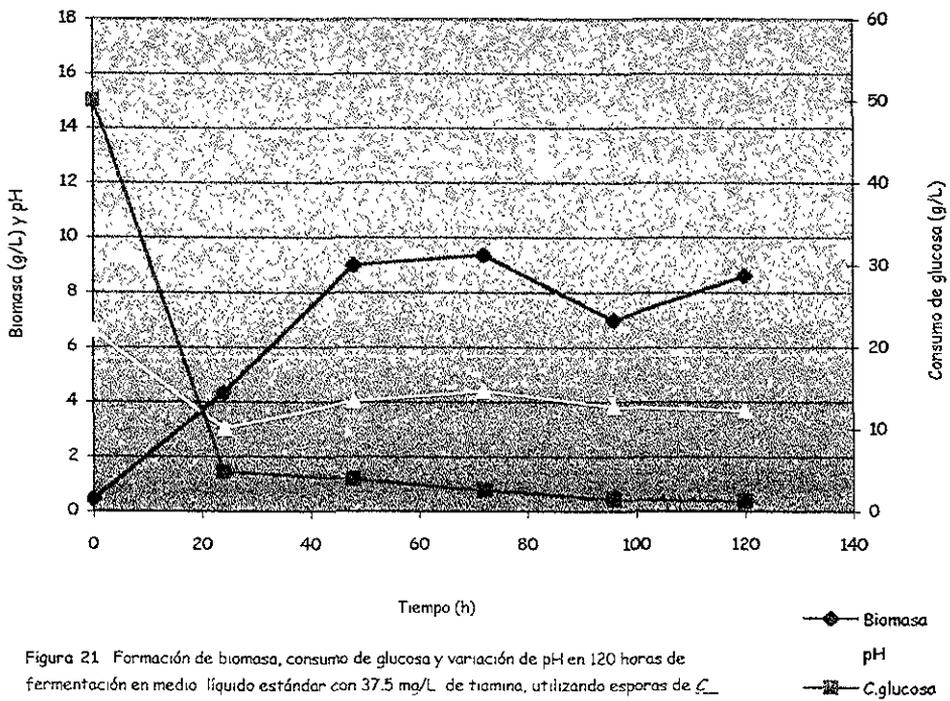


Figura 21 Formación de biomasa, consumo de glucosa y variación de pH en 120 horas de fermentación en medio líquido estándar con 37.5 mg/L de tiamina, utilizando esporas de *C. fimbriata* cultivadas sin tiamina en PDA.

COMPARACIÓN DE ÁREAS BAJO LA CURVA DE BIOMASAS OBTENIDAS CON ESPORAS T+ Y T-

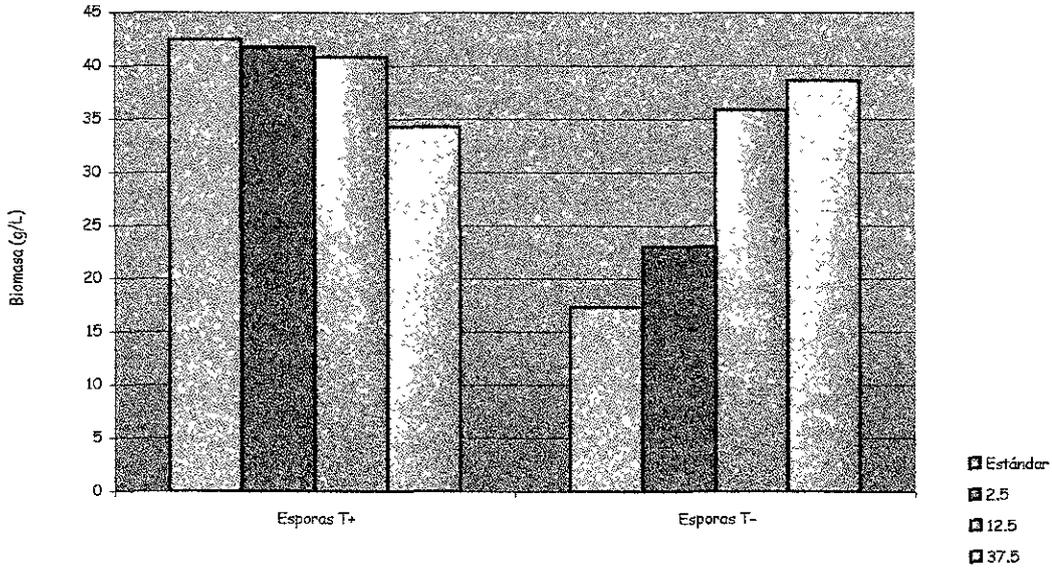


Figura 22 Comparación de biomasa obtenidas con esporas T+ y T- de *C. fimbriata* durante 120 horas de fermentación en medio líquido.

COMPARACIÓN DE PRODUCCIÓN TOTAL ACUMULADA DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON ESPORAS T+ Y T-

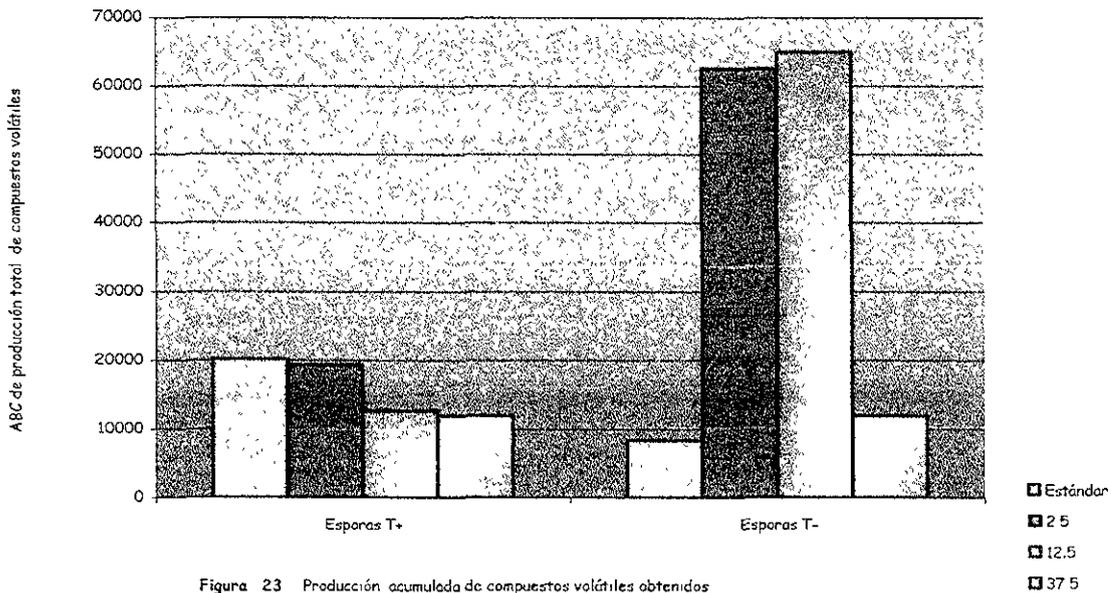


Figura 23 Producción acumulada de compuestos volátiles obtenidos en 120 horas de fermentación en medio líquido con esporas T+ y T- de *C. fimbriata*

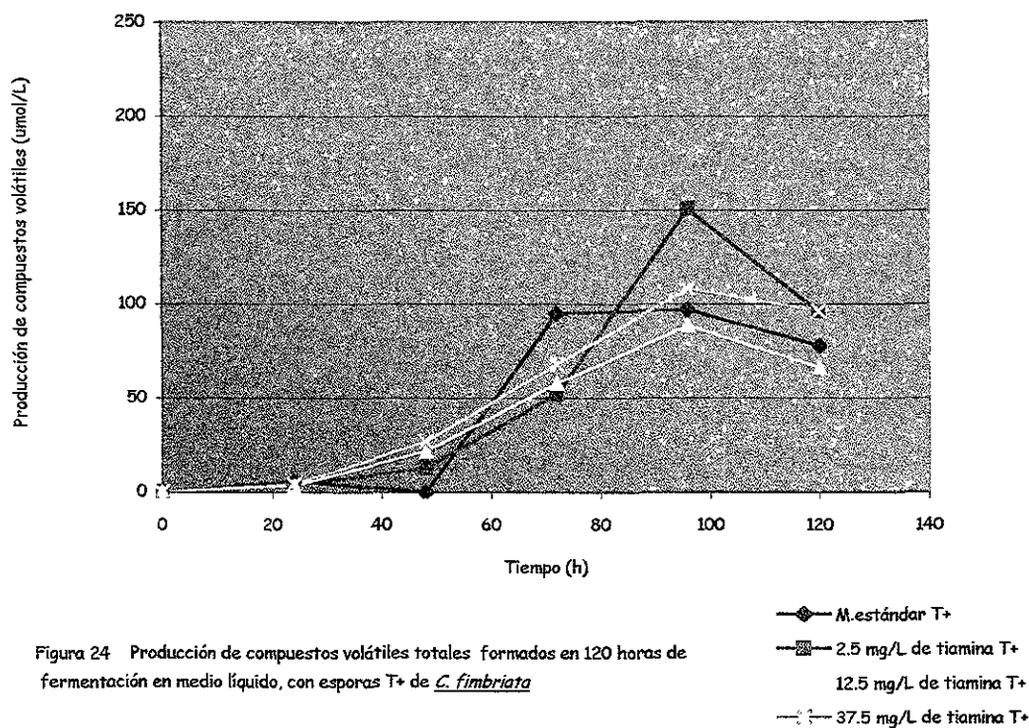


Figura 24 Producción de compuestos volátiles totales formados en 120 horas de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata*

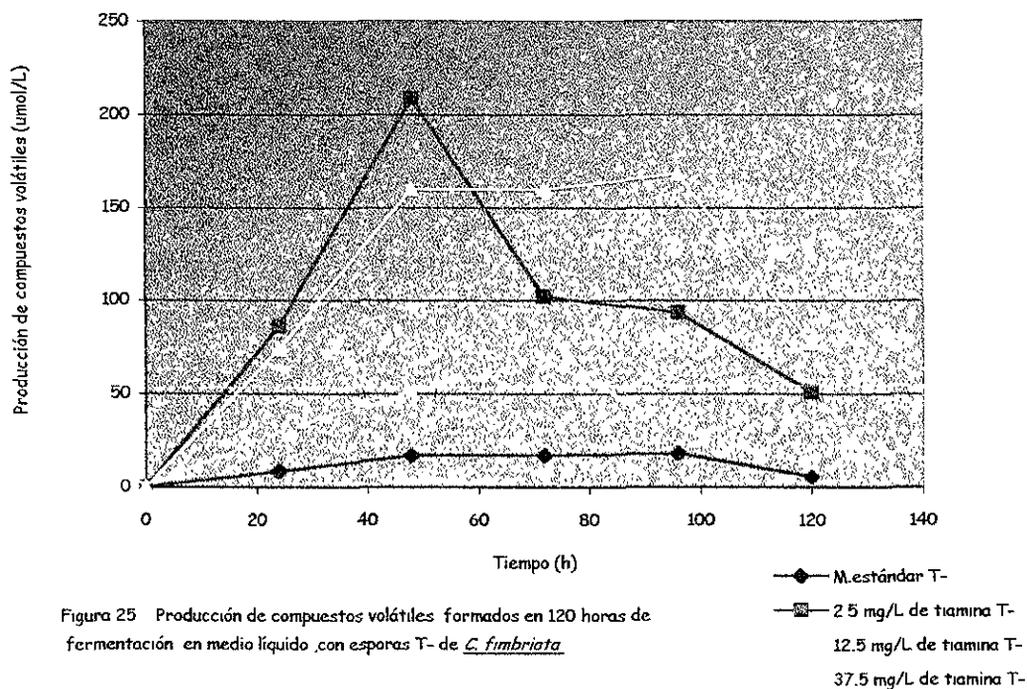


Figura 25 Producción de compuestos volátiles formados en 120 horas de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata*

RENDIMIENTO DE LA BIOMASA Y PRODUCTOS VOLÁTILES, CON ESPORAS T+ Y T- DE *C. fimbriata*

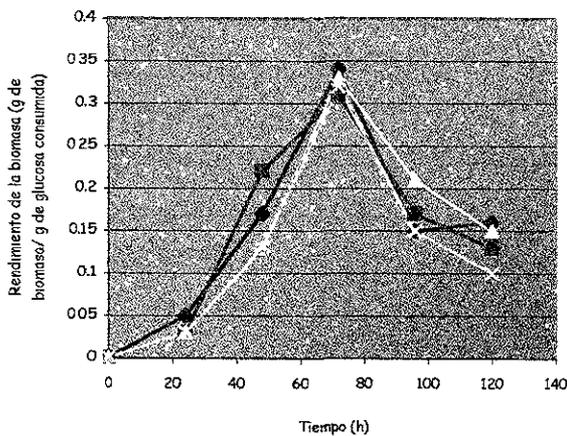


Figura 26 Rendimiento de la biomasa con esporas T+ de *C. fimbriata*, obtenido en 120 horas de fermentación, en medio líquido.

● M. Estándar T+
 ■ 2.5 mg/L tiamina T+
 ▲ 12.5 mg/L tiamina T+
 △ 37.5 mg/L tiamina T+

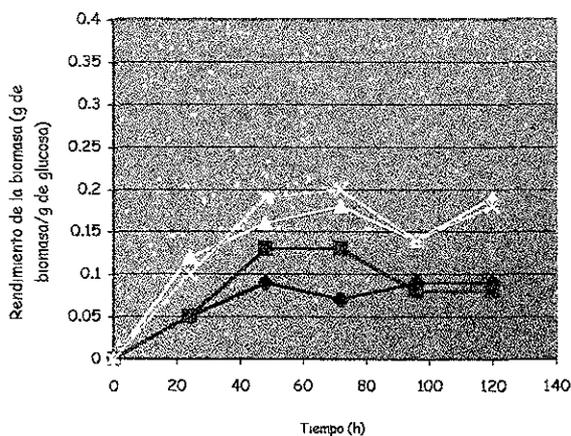


Figura 27 Rendimiento de la biomasa con esporas T- de *C. fimbriata*, obtenido en 120 horas de fermentación, en medio líquido.

● M. Estándar T-
 ■ 2.5 mg/L tiamina T-
 ▲ 12.5 mg/L tiamina T-
 △ 37.5 mg/L tiamina T-

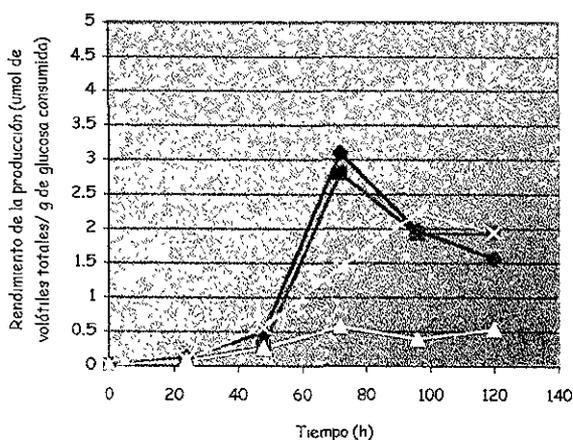


Figura 28 Rendimiento de la producción de compuestos volátiles con esporas T+ de *C. fimbriata*, en 120 horas de fermentación, en medio líquido.

● M. Estándar T+
 ■ 2.5 mg/L de tiamina T+
 ▲ 12.5 mg/L de tiamina T+
 △ 37.5 mg/L de tiamina T+

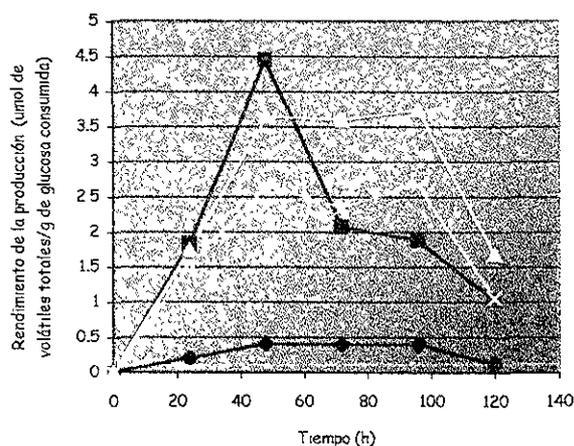


Figura 29 Rendimiento de la producción de compuestos volátiles con esporas T- de *C. fimbriata*, en 120 horas de fermentación, en medio líquido.

● M. Estándar T-
 ■ 2.5 mg/L de tiamina T-
 ▲ 12.5 mg/L de tiamina T-
 △ 37.5 mg/L de tiamina T-

Área bajo la curva de productos volátiles obtenidos durante 120 horas de fermentación en medios de cultivo con diferentes concentraciones de tiamina:

Producto	ABC Estándar T+	ABC 2.5 T+	ABC 12.5 T+	ABC 37.5 T+
Acetaldehído	191.75	221.502	175.83	242.62
Acetato de Etilo	10359.3	13238.5	6871.38	9199.73
Acetato de Isoamilo	509.01	474.18	360.95	516.35
Acetato de Isobutilo	286.19	262.26	176.95	199.29
Acetona	7.95	17.69	6.2	25.02
Alcohol Amílico	270.66	277.06	226.51	271.62
Alcohol Isoamílico	11.87	50.14	8.74	9.06
Butanol	625.67	220.46	501.28	276.19
Butirato de etilo	336.17	153.04	115.69	283.93
Diacetilo	196.11	226.33	176.04	166.46
Etanol	6743.02	3986.33	3573.84	500.43
Isobutanol	625.67	220.46	501.26	276.19
Isopropanol	14.3	18.79	1.49	7.49
Suma de volátiles totales	20177.67	19366.70	12696.16	11974.38

Tabla 7 Áreas bajo la curva de los productos obtenidos en 120 horas de fermentación líquida, utilizando esporas cultivadas con tiamina en agar papa dextrosa

Producto	ABC Estándar T-	ABC 2.5 T-	ABC 12.5 T-	ABC 37.5 T-
Acetaldehído	82.77	221.5	305.22	155.2
Acetato de Etilo	3632.4	42665.2	48830.7	4668
Acetato de Isoamilo	598.46	1095.55	858.82	339.62
Acetato de Isobutilo	774.72	1810.09	1561.59	705.27
Acetona	296.65	350.91	168.45	234.76
Alcohol Amílico	437.5	443.35	357.16	290
Alcohol Isoamílico	66.6547	11.48	13.94	0
Butanol	559.37	144.94	467.86	430.992
Butirato de etilo	112.37	456.59	129.6	6.15
Diacetilo	208.43	770.47	1233.65	698.13
Etanol	974.3	14418.2	10521.1	3930.62
Isobutanol	559.37	144.94	467.86	430.99
Isopropanol	15.25	4.025	0	0
Suma de volátiles totales	8318.24	62537.3	64916	11889.7

Tabla 8 Áreas bajo la curva de los productos volátiles obtenidos en 120 horas de fermentación líquida, utilizando esporas cultivadas sin tiamina en agar papa dextrosa

Perfil de la producción de volátiles a diferentes concentraciones de tiamina con esporas T+

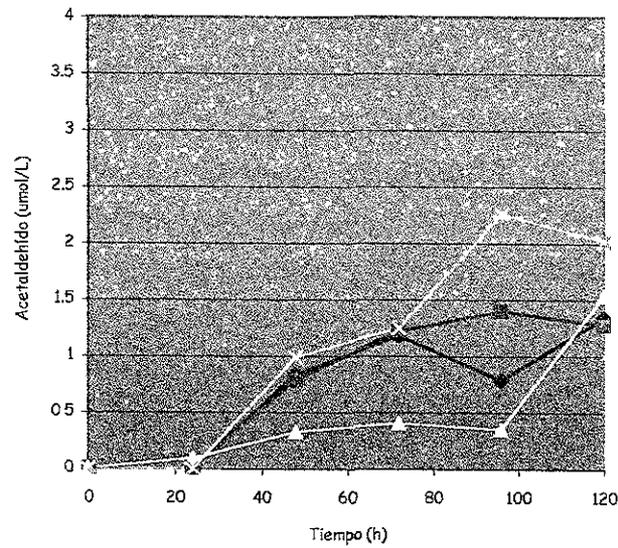


Figura 30 Producción de Acetaldehído durante cinco días de fermentación en medio líquido con esporas T+ de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

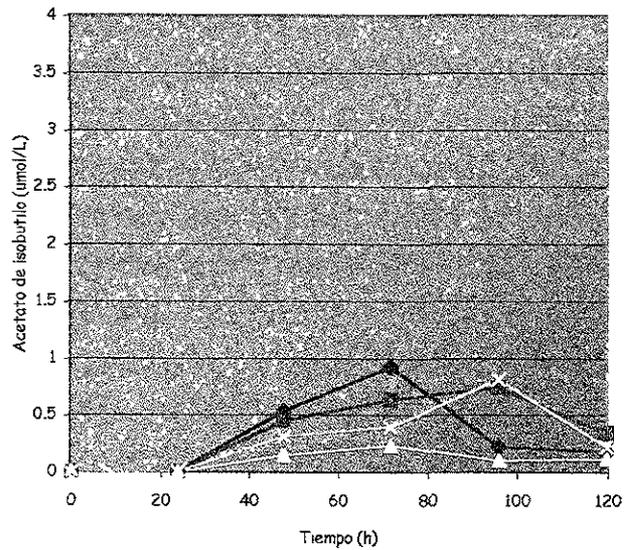


Figura 31 Producción de Acetato de isobutilo durante cinco días de fermentación en medio líquido con esporas T+ de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

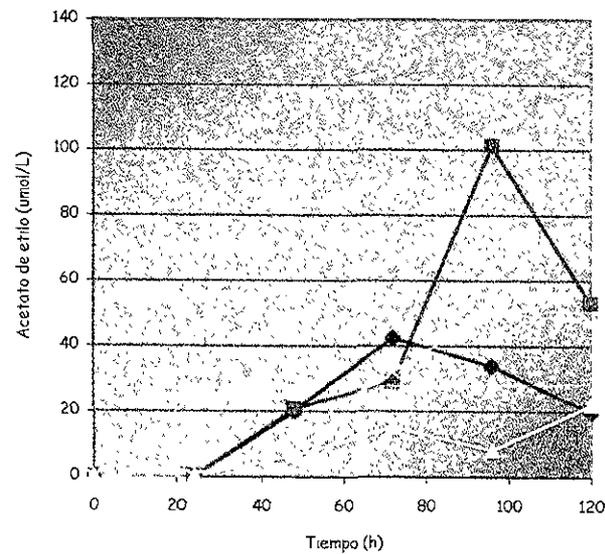


Figura 32 Producción de Acetato de etilo durante cinco días de fermentación, en medio líquido con esporas T+ de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

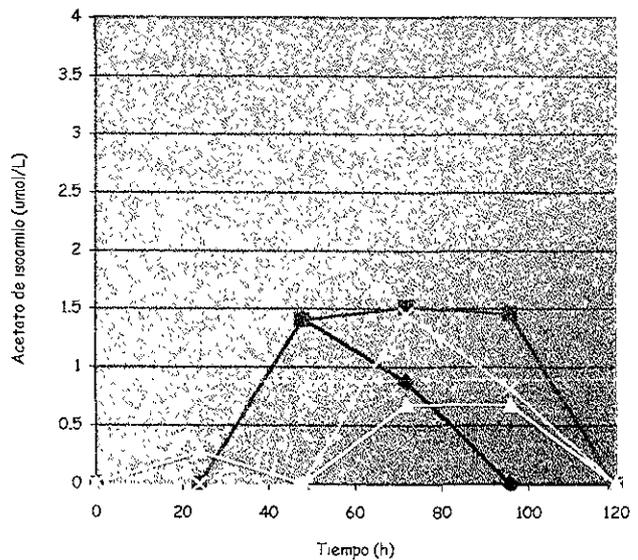


Figura 33 Producción de acetato de isoamilio durante cinco días de fermentación, en medio líquido con esporas T+ de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina

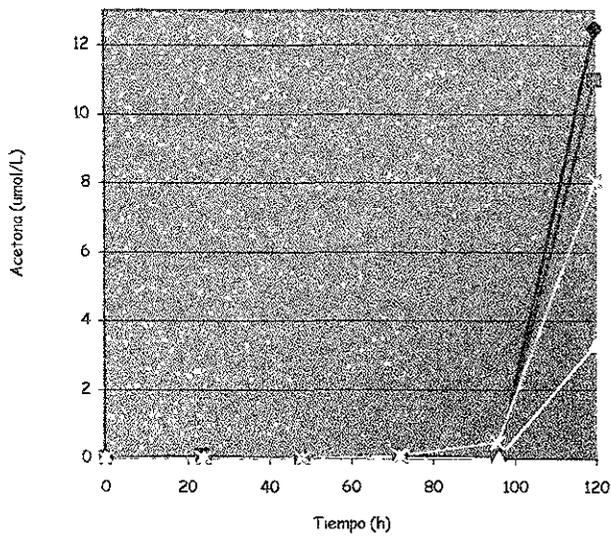


Figura 34 Producción de acetona durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

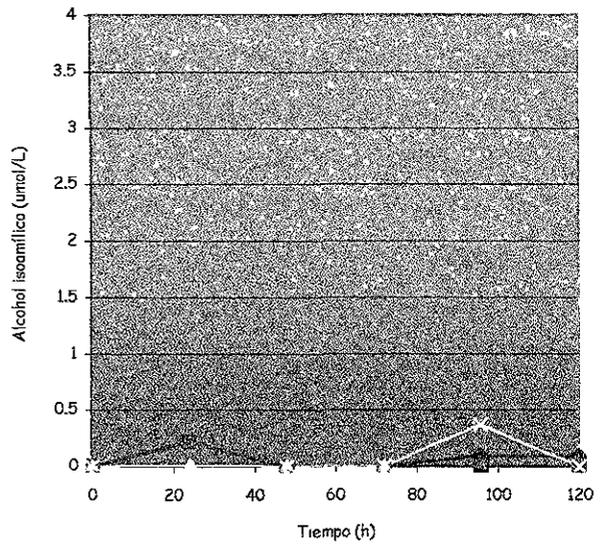


Figura 35 Producción de Alcohol isoamílico durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

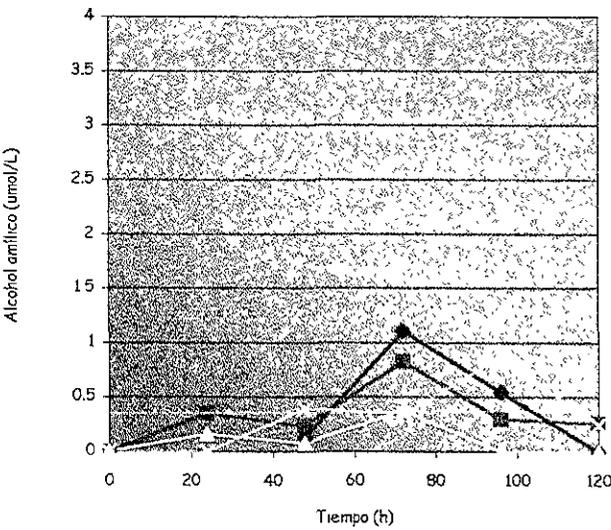


Figura 36 Producción de Alcohol amílico durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

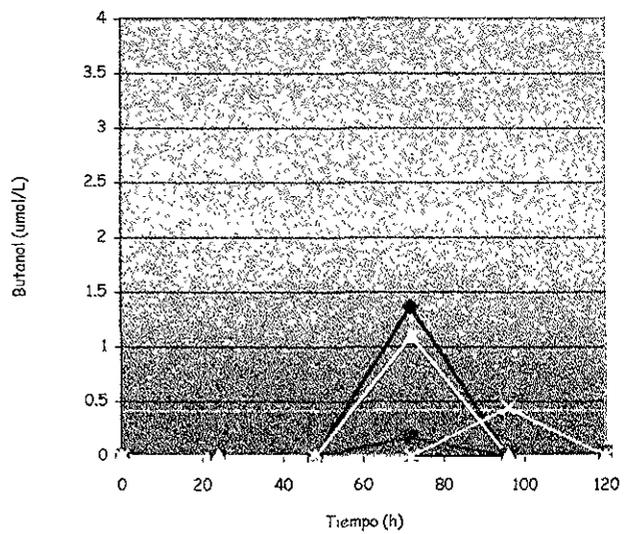


Figura 37 Producción de Butanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

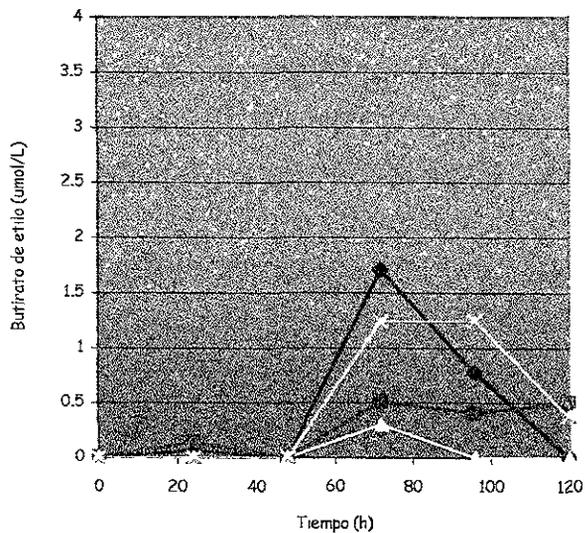


Figura 38 Producción de Butirato de etilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

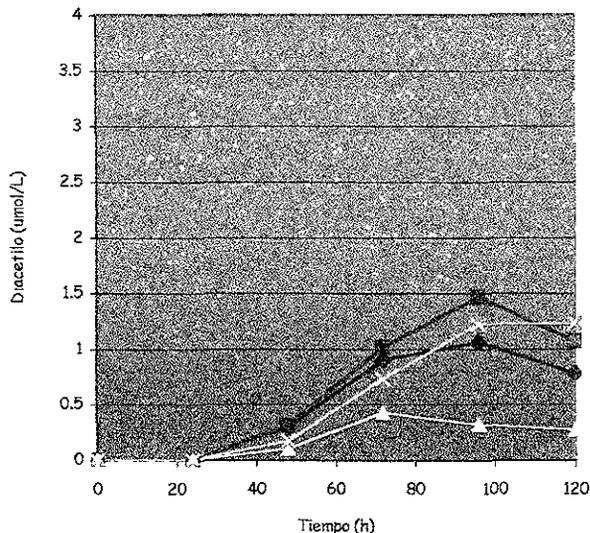


Figura 39 Producción de diacetilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

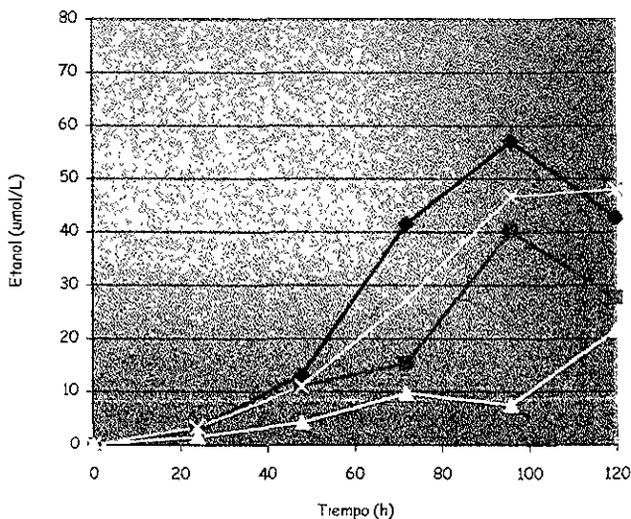


Figura 40 Producción de etanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar T+
 ■ 2.5 T+
 ▲ 12.5 T+
 ◆ 37.5 T+

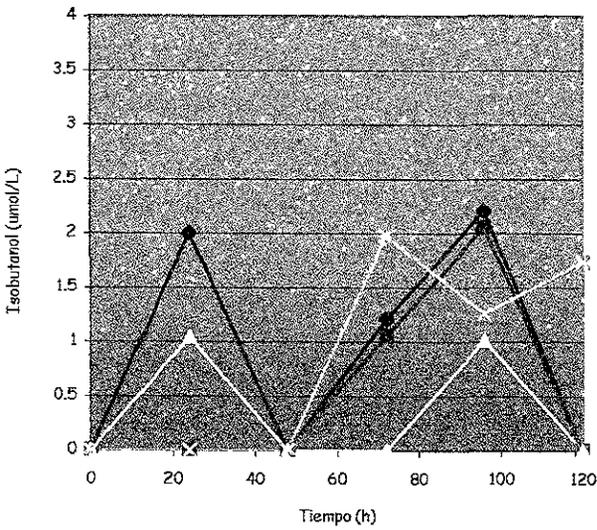


Figura 41 Producción de isobutanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

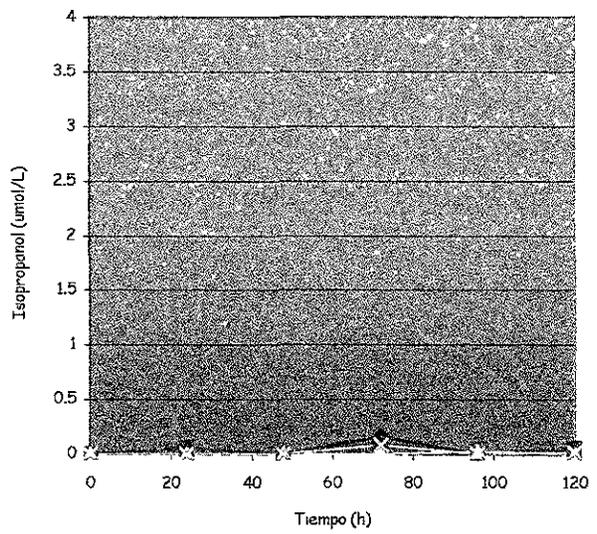


Figura 42 Producción de Isopropanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

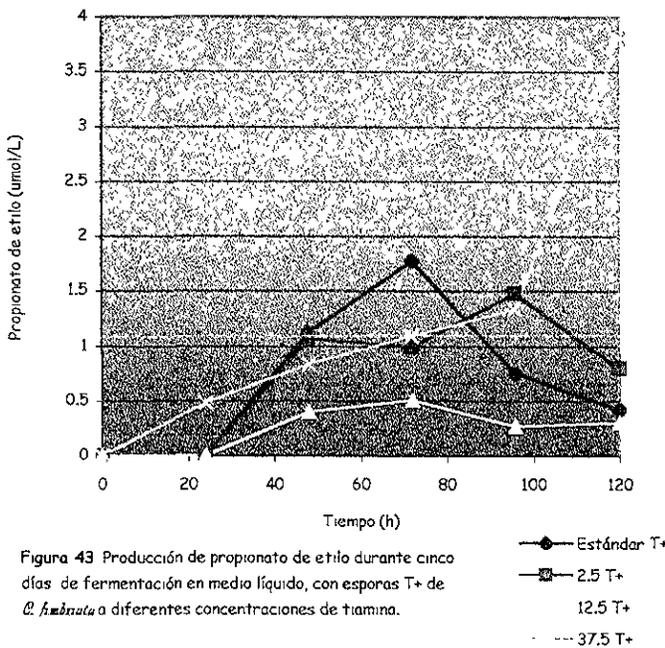


Figura 43 Producción de propionato de etilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T+ de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

Perfil de la producción de volátiles a diferentes concentraciones de tiamina con esporas T-

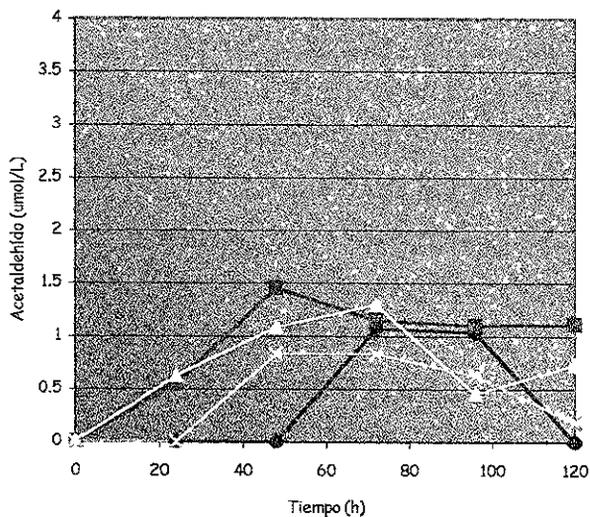


Figura 44 Producción de acetaldehído durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

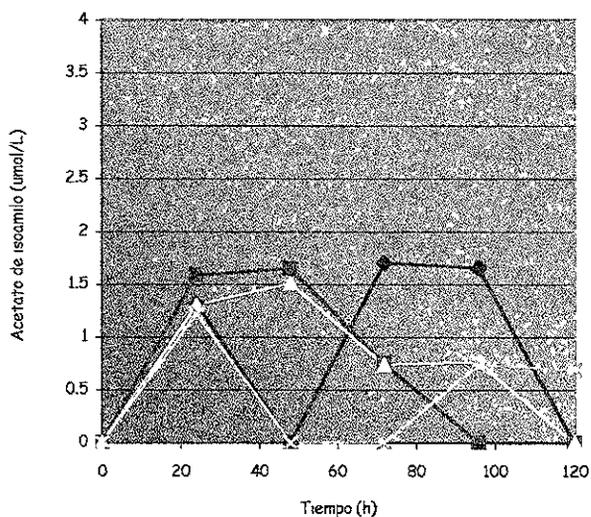


Figura 45 Producción de Acetato de isoamilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

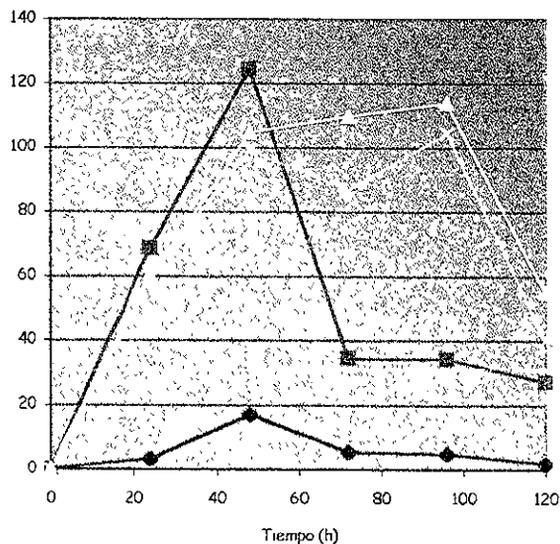


Figura 46 Producción de Acetato de etilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

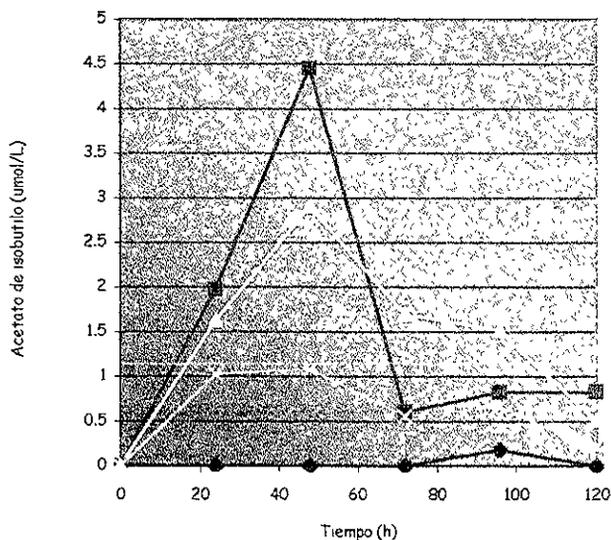


Figura 47 Producción de Acetato de isobutilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

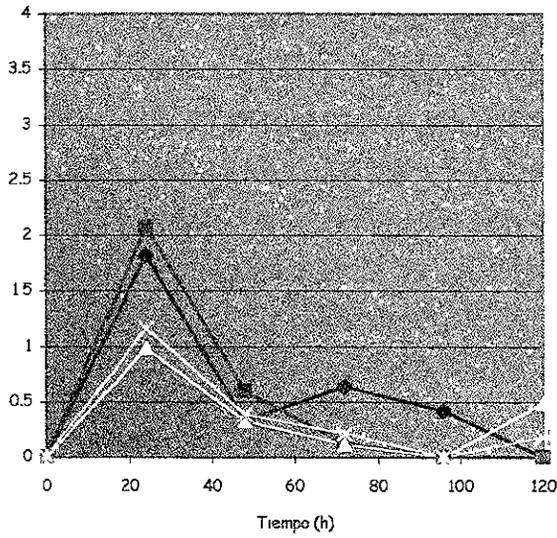


Figura 48 Producción de Acetona durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ▼ 37.5 T-

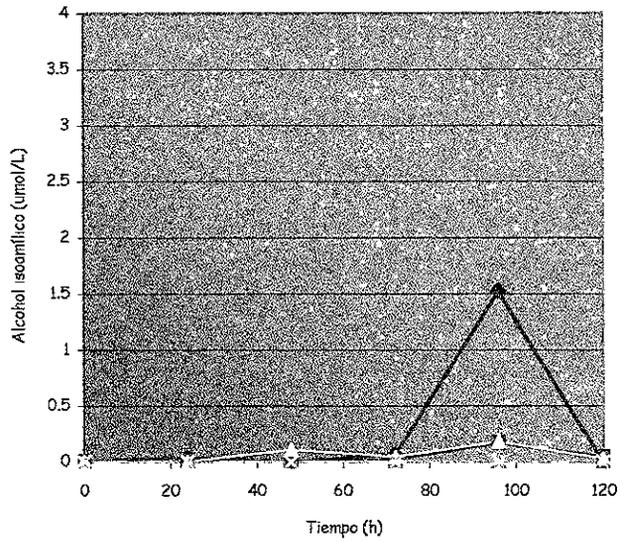


Figura 49 Producción de Alcohol isoamílico durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ▼ 37.5 T-

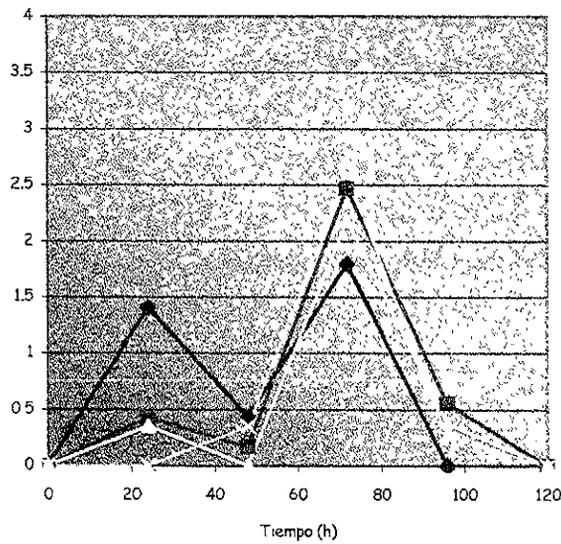


Figura 50 Producción de Alcohol amílico durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ▼ 37.5 T-

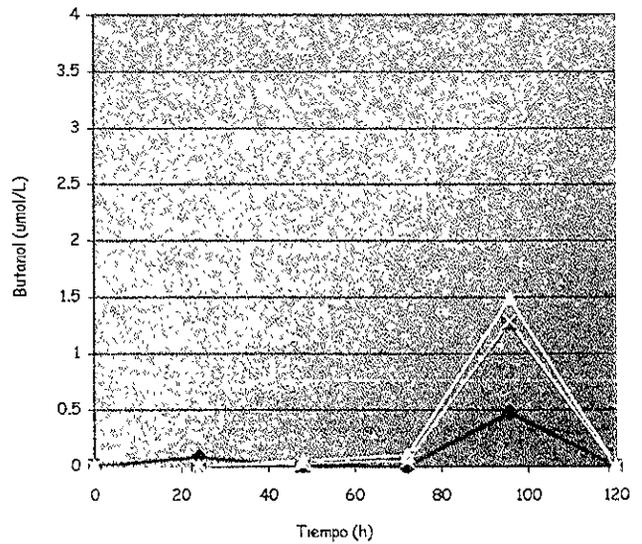


Figura 51 Producción de Butanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ▼ 37.5 T-

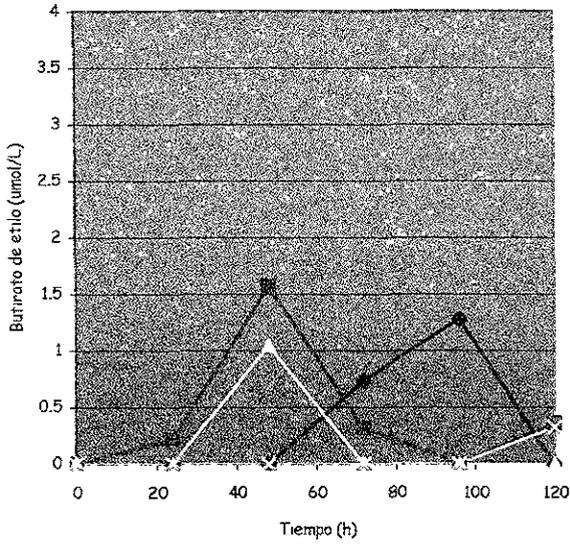


Figura 52 Producción de Butirato de Etilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ◆ 37.5 T-

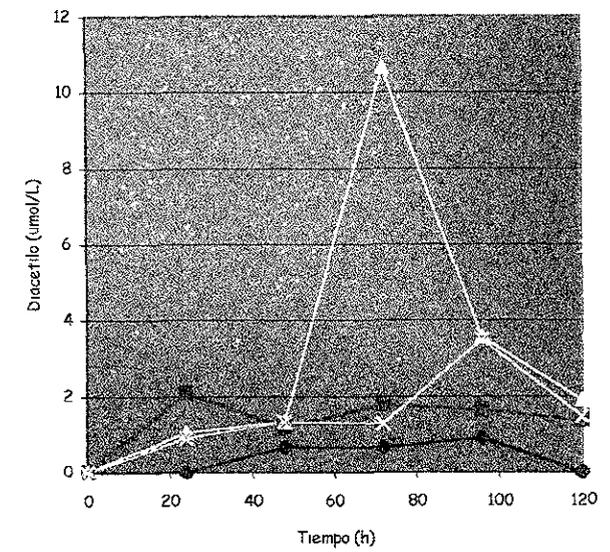


Figura 53 Producción de Diacetilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina.

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ◆ 37.5 T-

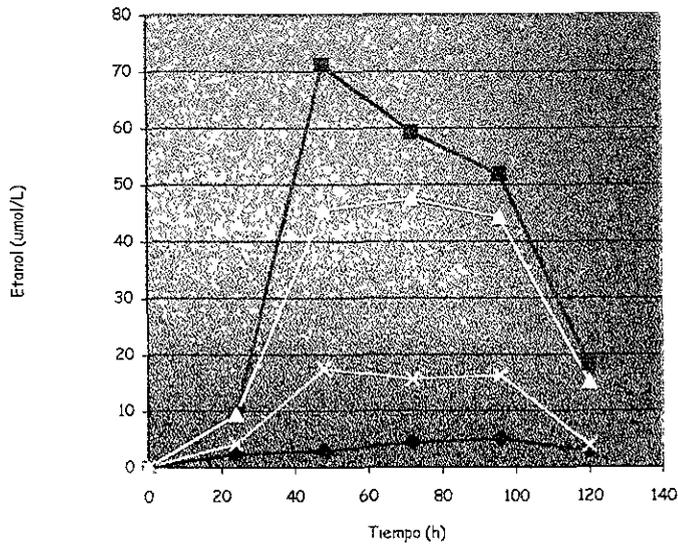


Figura 54 Producción de Etanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata*, a diferentes concentraciones de tiamina

● Estándar T-
 ■ 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 ◆ 37.5 T-

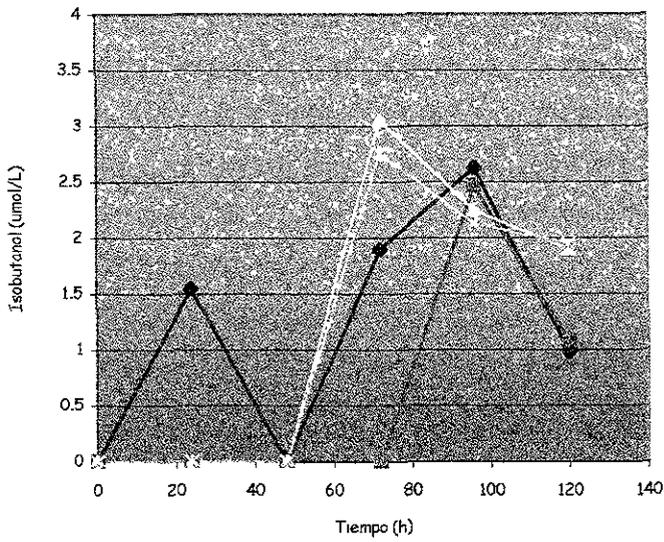


Figura 55 Producción de Isobutanol, durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

—●— Estándar T-
 - - - ■ - - 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 - · - · - · - · - 37.5 T-

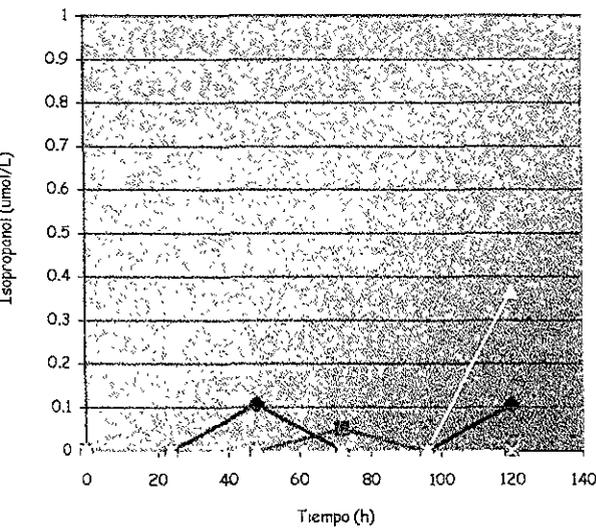


Figura 56 Producción de Isopropanol durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

—●— Estándar T-
 - - - ■ - - 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 - · - · - · - · - 37.5 T-

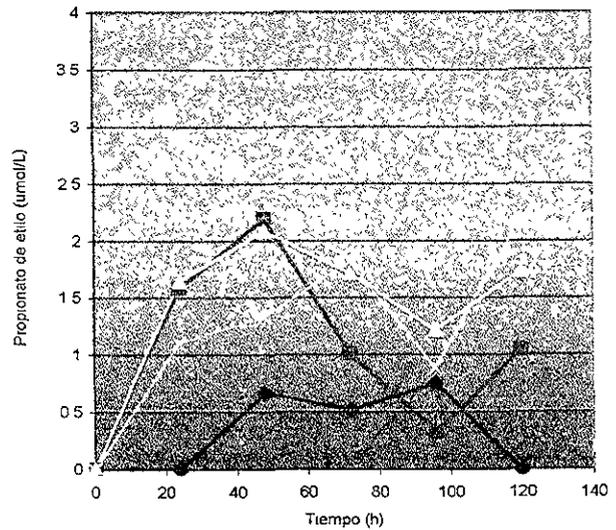


Figura 57 Producción de Propionato de etilo durante cinco días de fermentación en medio líquido, con esporas T- de *C. fimbriata* a diferentes concentraciones de tiamina.

—●— Estándar T-
 - - - ■ - - 2.5 T-
 ▲ 12.5 T-
 - · - · - · - · - 37.5 T-

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Comparación de curvas de crecimiento, Consumo de glucosa, pH y producción de aromas

En las figuras (14-21) se muestra el crecimiento de las esporas de *C. fimbriata* cultivadas con y sin tiamina (esporas T+ y esporas T-, respectivamente). En el tratamiento con esporas T+ (figuras 14-17) se observa, que el crecimiento obtenido durante las primeras 24 horas, fue más lento que en los medios con esporas T-, pues en los medios T+, la mayor cantidad de biomasa formada en las primeras 24 horas fue de 1.8 g (excepto en el medio estándar T+), mientras que con los medios T-, la mayor cantidad de biomasa obtenida en el mismo tiempo fue de 5.1 g. De acuerdo a esto se observa que la adición de tiamina a las esporas, afecta en el crecimiento, además, hay que considerar el hecho de que en el medio estándar T+ se obtuvo la mayor cantidad de biomasa total (43 g/L), y al ir aumentando la concentración de tiamina, el crecimiento disminuyó (34 g/L en el medio 37.5 T+), lo cual indica que la tiamina adicionada al medio líquido, posiblemente ejerció un efecto inhibitorio, mientras que en el medio estándar T+, la cantidad de tiamina adicionada a las esporas (5 mg/L) favoreció el crecimiento (figura 22).

En el caso de las esporas T- (figuras 18-21), se observa el efecto contrario al presentado en los medios con esporas T+, ya que al ir aumentando la concentración de tiamina, se incrementó la cantidad de biomasa (18 g/L en el medio estándar T-; 38.5 en el medio 37.5 T-) y aunque cada medio se comportó diferente, en general, se observa que, la mayor producción de biomasa se dio a las 72 horas, excepto en el medio estándar T-(figura 22).

Ahora bien, aunque las curvas de biomasa no tienen los suficientes puntos para determinar el inicio y final de una fase en una curva típica de crecimiento, se aplicó el log 10 a la biomasa y se obtuvieron las curvas de crecimiento que se presentan en el anexo 1, en la figura a de este anexo se observa que en los medios T+, probablemente, la fase lag fue un poco más prolongada que en los medios T- (figura b) ya que el crecimiento fue más lento, y la fase logarítmica parece presentarse poco antes de las 24 horas y terminar entre las 48 y 72 horas, para dar lugar a la fase estacionaria que probablemente se presenta antes de las 72 horas y después de las 96 horas, y finalmente dar paso a la fase de muerte que parece iniciar entre las 96 y 120 horas.

Por otra parte, en los medios con esporas T- (figura b del anexo), se observa una pendiente mayor en las rectas que van del tiempo 0 a las 24 horas, las cuales parecen indicar que antes de las 20 horas se inicia la fase logarítmica, esto se puede sustentar con trabajos previos, realizados con *C. fimbriata*, (6) en los que no se adicionó tiamina al medio líquido, y en los cuales se utilizó la producción de CO₂ como indicador del crecimiento. En éstos trabajos se menciona que, en no más de 20 horas se observa un drástico incremento en la producción de CO₂ en el medio. Lo cual puede sustentar que en un medio sin tiamina como el medio estándar T-, la fase lag dura aproximadamente 20 horas; y respecto a las pendientes de los otros medios, se puede ver que son mayores (figura b del anexo 1) por lo que quizás fue menor el tiempo de la fase lag o por lo menos cercano a 20 horas. Ahora bien, la fase logarítmica parece terminar en el lapso que va de las 24 a las 48 horas, para luego dar inicio a la fase estacionaria que quizás inicia antes de las 48 horas y termina antes de las 96 horas, pues en la figura b del anexo 1 se observa que a las 96 horas la curva muestra un declive, lo cual indica que se inició la fase de muerte.

Aunque cabe mencionar que después de que disminuye la formación de biomasa (antes de las 96 horas), ésta se mantiene (medio 2.5 T-) o incrementa como en el caso de los medios 12.5 y 37.5 T-. La explicación para esto se encuentra en la literatura, en donde se menciona que al final de la fase estacionaria, cuando empieza la fase de muerte, las células muertas sufren lisis y se liberan en el medio nuevos sustratos, los cuales sirven como fuente de energía para las demás células. (41)

Con todo lo mencionado anteriormente, se puede decir que hay diferencias evidentes en el crecimiento que presentaron ambos tipos de esporas en el medio líquido, y que la adición de tiamina en diferentes concentraciones marcó el comportamiento de cada medio. En el caso de los medios con esporas T+, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa (en el medio estándar T+ se obtuvo un 59.04% más de biomasa con respecto al medio estándar T-, en el medio 2.5 T+ se obtuvo un 44.85 % más de biomasa con respecto al medio 2.5 T-, en el medio 12.5 T+ el crecimiento fue 12.12% mayor con respecto al medio 12.5 T-, y en el medio 37.5 T- la biomasa fue mayor en un 8.48% con respecto al medio 37.5 T+). Por otra parte la producción total de compuestos volátiles fue mayor en los medios con esporas T- (en el medio estándar T+ la producción de volátiles fue mayor en un 58.77 % con respecto al medio estándar T-, en el medio 2.5 T- la producción fue mayor en un 69.03 % con respecto al medio 2.5 T+, en el medio 12.5 T- la producción fue mayor en un 80.44 % con respecto al medio 12.5 T+, y en el medio 37.5 T+ la producción fue 39.65 % mayor con respecto al medio T-, de forma general se puede decir que la biomasa fue menor en los medios con esporas T-, sin embargo, la producción total de compuestos volátiles fue mayor (figuras 22 y 23).

El efecto que ejerció la tiamina en las esporas no es bien comprendido, sin embargo, varios investigadores que estudian la inducción enzimática, coinciden en que la información genética codificada en el DNA controla la formación de las enzimas celulares, y la formación de las enzimas a su vez, es determinada por la concentración de los nutrientes del medio y de efectores de bajo peso molecular, por lo que quizás, las esporas T+ fueron afectadas por la presencia de tiamina en la síntesis de sus enzimas. (46,

49)

Además, otra posible explicación de esto es considerando que las esporas T+ tomaron del medio de precultivo la cantidad de tiamina permitida por la consistencia del medio sólido (PDA), pero al llevarse a un medio líquido con más tiamina, la tiamina adicionada ejerció efecto inhibitorio en el funcionamiento de las enzimas, por lo que en los medios con más tiamina se observa un decrecimiento.

Lo anterior se fundamenta en trabajos realizados por varios investigadores que concluyen que el control del metabolismo en la célula se inicia en la regulación del consumo de los nutrientes. Estos nutrientes son tomados por mecanismos de transporte específicos de forma que la célula puede concentrarlos dentro de ella partiendo de soluciones diluidas en el exterior. Los procesos de consumo de nutrientes los controla la célula, y cuando la cantidad de nutrientes tomados ha alcanzado una concentración determinada, en algunos casos innecesaria (o hasta perjudicial) el consumo se detiene. (46,49-

51)

Por otra parte, las esporas T-, al encontrarse en un medio líquido con mayor facilidad de difusión, consumieron del medio la tiamina, la cual indujo la formación de las enzimas que la requieren y por ello se favoreció el crecimiento (aunque no tanto como en los medios T+), y como se verá más adelante, también la formación de compuestos volátiles.

Por lo que se refiere al consumo de glucosa, se observa una disminución drástica de la fuente de carbono en el medio durante las primeras 24 horas. Dicha glucosa es metabolizada para dar inicio al crecimiento. En las figuras 14-21 se muestra que la glucosa se consume del medio rápidamente.

En las figuras 26-29, se muestra el comportamiento de los coeficientes de rendimiento de sustrato referido a biomasa y productos volátiles con esporas T+ y T-, en éstas figuras se observa que el mejor coeficiente de rendimiento de sustrato referido a la biomasa ($y_{x/s}$) se obtuvo a las 72 horas en los medios con esporas T+, y aunque los valores son muy similares, se puede notar que el medio estándar T+, fue el medio en que se obtuvo el mejor rendimiento a las 72 horas ($y_{x/s} = 0.34$). En los medios con esporas T-, el mayor coeficiente de rendimiento de sustrato referido a la biomasa lo presentó el medio con 37.5 mg de tiamina ($y_{x/s} = 0.2$, a las 72 horas), lo cual concuerda con los datos reportados en la figura 22. Ahora bien, al comparar dichos coeficientes, se observa que los mejores coeficientes de rendimiento de sustrato referidos a biomasa se obtuvieron en los medios T+, lo cual coincide con lo mencionado anteriormente.

Respecto a los coeficientes de rendimiento de sustrato referidos a producto ($y_{p/s}$), en las figuras 28 y 29 se observa que los mejores resultados se presentaron en los medios estándar T+ ($y_{p/s} = 3.1$ a las 72 horas), 2.5 T+ ($y_{p/s} = 2.8$, a las 72 horas), 2.5 T- ($y_{p/s} = 4.44$ a las 48 horas) y 12.5 T- ($y_{p/s} = 3.64$ a las 48 h; $y_{p/s} = 3.6$ a las 72 h; $y_{p/s} = 3.75$ a las 72 h). Éstos resultados coinciden con los medios que produjeron la mayor cantidad de volátiles con esporas T+ y T-. Nuevamente, si comparamos los coeficientes de rendimiento de sustrato referido a los productos obtenidos con ambos tipos de esporas T+ y T-, se observa que los medios T- presentaron los mejores rendimientos. De aquí, se puede concluir que, en los medios con esporas T+, la tiamina favoreció al crecimiento, pero no la producción de volátiles. En los medios con esporas T-, no se favoreció el crecimiento como en los medios con esporas T+, pero sí fue mayor al observado en el medio estándar T-, y respecto a los compuestos volátiles, se favoreció la producción de éstos.

Respecto a los valores de pH de los medios con esporas T+ (figura 14-21), se observan valores muy similares en cada uno de los medios hasta las 66 horas, después de lo cual hay diferencias más visibles, sin embargo, el patrón de comportamiento es el mismo. Es decir, el pH baja a valores comprendidos entre 3.2-3.5 a las 48 horas, después sube a las 72 horas, y nuevamente disminuye alcanzando valores comprendidos entre 3.4 y 4.5. En los medios con esporas T-, los valores de pH fueron más variables entre cada medio, por ejemplo, el medio estándar obtuvo los valores de pH más ácidos que los obtenidos en los otros medios T-. También se ve en la gráfica que el valor de pH más bajo que se obtuvo en el medio estándar fue a las 22 horas, después de lo cual empieza a subir nuevamente.

Al parecer, en los medios con esporas T+, después de alcanzar el pH más bajo que la célula fúngica toleró (a las 48 horas), ésta reaccionó para contrarrestar la concentración de iones H+, formando los ésteres y además obteniendo energía por otras rutas metabólicas, esto se puede ver en las figura 24, donde se muestra que la mayor producción de compuestos volátiles, y principalmente de ésteres (figuras 27-29, 39), se da después de las 48 horas, por lo cual es factible suponer que la célula los formó como una medida auxiliar para poder seguir sobreviviendo en el medio y además para obtener los productos necesarios. La misma explicación aplica para los medios con esporas T- (figura 23, 41-43, 53) sólo que en estos medios el aumento de la producción se dió después de las 24 horas, ya que fue a este tiempo en el que los medios T- (excepto medio estándar T-) mostraron el pH más bajo (3.3-2.7). En base a lo anterior, se puede concluir que hay una estrecha relación entre el pH y la formación de productos por la célula.

Aquí, es importante recordar que los valores de pH medidos corresponden a las modificaciones del exterior de la célula, sin embargo, en el interior de la célula, también existe un rango de pH que la célula

tratará de mantener para continuar con sus procesos internos de obtención de energía, esto lo hace manteniendo un gradiente de iones H^+ interno, y sacando al exterior la cantidad que altere sus funciones, aunque debe considerarse que la célula no puede desechar indefinidamente al exterior todo lo que le afecte en su interior, ya que la concentración de iones H^+ en el exterior también puede afectar sus funciones de consumo de sustratos, así como el funcionamiento de las enzimas extracelulares, por esto, llega un momento en que la célula no puede continuar con la diferencia de gradientes de concentración tanto en el interior como en el exterior, y finalmente la célula muere. (37, 50, 51.)

Efecto del incremento de tiamina en el medio líquido sobre el crecimiento y producción de aromas con esporas T+ y T- de *C. fimbriata*

En las figuras 22 y 23, se observa que al aumentar la concentración de tiamina en el medio líquido con esporas T+, la producción total acumulada de compuestos volátiles disminuyó (áreas bajo la curva de 20,042-14,815.7), al igual que la producción de biomasa (42.5 g/L a 34 g/L). Por lo que puede suponerse que la tiamina al proporcionarse para la formación del inóculo y además adicionarla al medio líquido, produjo un efecto inhibitor al encontrarse en exceso en el medio de cultivo, y esto puede fundamentarse, considerando que la afinidad de una enzima para unirse con su sustrato, puede variar si en el medio se encuentran otras pequeñas moléculas que afecten su unión con el sustrato y por lo tanto impidan que la enzima reaccione con el sustrato.

Al parecer, en esta parte del experimento, las enzimas que requieren de pirofosfato de tiamina, cumplieron su función hasta donde les fue posible, y a pesar de que la producción total acumulada en los medios con esporas T+ fue menor con respecto al estándar T+, su producción fue mayor al comparar con el estándar T-, por lo que la tiamina favoreció la producción.

Respecto a la producción individual de compuestos volátiles con esporas T+ y T-, pueden observarse las cantidades obtenidas de cada volátil en las tablas 7 y 8. Sin embargo, el hecho de que la producción de ciertos volátiles sea mayor y de otros sea menor, se debe a las necesidades de la célula, a la formación de ciertos productos tóxicos, así como a las fluctuaciones de pH, y a la cantidad de nutrientes en el medio.

Por otra parte, en las figuras 22 y 23, en donde se muestran los resultados con esporas T+, se observa que la adición de tiamina al PDA (al inóculo), produce un incremento en la biomasa y en los volátiles en el medio líquido estándar, sin embargo, la adición de una cantidad ligeramente mayor a 10^{-4} moles de tiamina /L al medio líquido, produce la disminución de la biomasa, pero sobre todo, afecta la producción de los compuestos volátiles.

Por otro lado, la adición de tiamina a los medios líquidos con esporas T-, incrementó la biomasa (17.5 g/L a 38.6 g/L) y los volátiles al aumentar la concentración de tiamina en el medio (Áreas bajo la curva de 7,238.5 a 65,613.9), excepto en la concentración con 37.5 $\mu\text{g/mL}$ de tiamina donde los volátiles disminuyeron (ABC = 54,365.55), obteniéndose una producción menor a la formada en los medios 2.5 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ pero mayor a la obtenida en el medio estándar T- (ABC = 7,238.5).

Ahora bien, al observar las cantidades de cada volátil formado en el medio T- con 37.5 mg de tiamina/L (ver tabla 8), se puede notar que las áreas bajo la curva que corresponden a los ésteres son muy bajas, y como ya se mencionó anteriormente, éstos probablemente se forman a partir del Acetil-CoA, por lo que parece ser que en este medio, esta molécula siguió las rutas biosintéticas que permitieron la

duplicación y crecimiento de la célula, viéndose el reflejo de esto en la biomasa, y el efecto inverso en los productos de fermentación, Aunque también debe considerarse que quizás en este medio existía un mayor número de células viables, que se reprodujeron más rápidamente, y por ello la mayoría de las moléculas precursoras obtenidas en el catabolismo, se utilizaron para la formación de las macromoléculas necesarias para el crecimiento.

Como se muestra en la tabla 8, la cantidad de productos formados por esporas T- de *Ceratocystis fimbriata* y con tiamina en el medio líquido, son mucho mayores que las obtenidas con las esporas T+, por lo que podría suponerse que, al encontrarse la tiamina en un medio completamente líquido, las moléculas de tiamina tuvieron la facilidad de introducirse a la célula y ser fosforiladas por los ATPs recién formados en la glucólisis.

Por otra parte, la fase de adaptación, es la etapa en la cual la célula reconoce los nutrientes de los que dispone y empieza a sintetizar los enzimas que requiere para la obtención de energía y para su crecimiento, puede pensarse que de alguna forma la presencia de tiamina indujo la formación de una mayor cantidad de las enzimas que requieren tiamina, al estar presente en el medio.

En la tabla 8 se pueden observar que hay diferencias entre los medios con esporas T-, ya que de algunos productos se obtuvieron mayores concentraciones y de otros menos, por ejemplo, en el caso del medio con 12.5 ug/mL (T-), a pesar de que fue el medio con una producción total acumulada mayor, de todos sus productos no se obtuvieron las concentraciones más altas, sólo de algunos de ellos. Lo mismo para el estándar T-, a pesar de que fue el medio en el que se obtuvo menos producción, hay algunos productos como el isopropanol, el alcohol isoamílico y otros que se obtuvieron en mayor cantidad que con el medio 12.5 ug/mL, y se observa el mismo efecto al comparar con los otros medios con esporas T-. Esto se debe primordialmente al acoplamiento de las reacciones tanto catabólicas como anabólicas, además en este caso a la presencia de tiamina.

En la tabla 8, se observa que en el medio 2.5 T- la producción de los ésteres fue alta con respecto a los otros medios T- excepto para la producción de acetato de etilo que fue mayor en el medio 12.5 T-, por lo que se puede decir que la coenzima TPP favoreció la formación de Acetil-CoA que se utilizó para la formación de todos estos ésteres, pero además, el acetato de etilo, es el producto que se obtuvo en mayor cantidad en el medio, y para su obtención se requirió de etanol, el cual se obtuvo por la fermentación alcohólica. En la fermentación alcohólica el TPP también es utilizado por la piruvato descarboxilasa, y favoreció la obtención de acetaldehído, pero principalmente la de etanol, ya que en la célula se requiere de la formación de NAD+ que se utiliza en la oxidación de otras moléculas. Por lo que se refiere al etanol formado, la célula lo transformó en acetato de etilo para obtener la energía de hidrólisis del acetyl-CoA (-31.5 KJ/mol), y para no detener la formación de más NAD+, por haber una alta concentración de etanol en el medio. Las cantidades de etanol y acetaldehído formadas, seguramente corresponden al equilibrio en que podían estar por las condiciones del medio. Todo lo mencionado es en cuanto a la formación del acetato de etilo, pero por lo que se refiere a los otros ésteres el hecho de que sus alcoholes se deriven de otras rutas modifica completamente la situación.

El alcohol isoamílico corresponde al resto del esqueleto carbonado de la leucina después de haber sido desaminado. (56, 58) Es importante mencionar, que nuevamente el TPP participa en la formación de valina, leucina, e isoleucina, por lo que cabe pensar, que al poder obtener éstos aminoácidos a partir del piruvato (valina y leucina; la isoleucina requiere de piruvato y 2-oxobutirato), se aprovechó esto, para la obtención de otros aminoácidos por transaminación ya que también los requiere la célula. Por otro lado, hay que recordar que los oxoácidos que resultan de la transaminación, es decir, los fragmentos

carbonados de los restos de aminoácidos, se convierten en alcoholes, sólo si el medio se encuentra carente de amonio. (59) En base a esto, de acuerdo a los resultados, y considerando la cantidad de acetato de isoamilo formado y la pequeña cantidad de alcohol isoamílico se puede decir que hubo una buena producción de leucina en el medio para suplir las necesidades de la célula, si no las óptimas, por lo menos las esenciales con respecto a los otros medios.

Por un lado se tiene que la producción de acetato de isoamilo fue buena (2.5 T-), pero hay que recordar que el alcohol isoamílico formado tuvo la posibilidad de ser reutilizado para la obtención de otro aminoácido, sin embargo, la célula prefirió la obtención de energía al favorecer la reacción del alcohol con el Acetil-CoA, quizás porque en ese momento la célula requería de la energía para otras reacciones prioritarias y los aminoácidos no eran necesarios en ese momento ó quizás la cantidad de nitrógeno en el medio no fue suficiente para reutilizar los restos de carbono. La misma explicación se puede aplicar para el isobutanol que se verá a continuación.

Por lo que se refiere al isobutanol, éste también se deriva de los 2-oxoácidos. Al parecer en este medio (2.5 T-) las condiciones favorecieron la formación de aminoácidos pues la cantidad de isobutanol formado fue la menor al compararse con los otros medios, aún considerando al estándar T-, y además la cantidad de acetato de isobutilo confirma esto.

El alcohol amílico después de ciertas reacciones puede formar la isoleucina, pero una reacción nunca se lleva a cabo al 100% a menos que se estén modificando las condiciones para favorecerla, lo cual no fue el caso por lo que se obtuvo la cantidad indicada en los resultados.

En cuanto a la formación del propionato de etilo (medio 2.5 T-), se observa que se favoreció la formación de este compuesto con respecto al estándar, pero al comparar con los otros ésteres formados fue el que se obtuvo en menor concentración, posiblemente porque la ruta que permite la formación del propionato no es muy necesaria para la célula y en la reacción que forma el propionato de etilo, el reactivo limitante es el propionil-CoA, el cual se puede obtener de la oxidación de los aminoácidos isoleucina, valina o metionina, y también de la síntesis de ácidos grasos impares, en donde en la vuelta final de la β -oxidación de éstos ácidos grasos se obtiene el propionil-CoA, sin embargo, es factible pensar que en este caso, el propionil-CoA se obtiene de la oxidación de los aminoácidos mencionados, aunque no se descarta la segunda opción.

Resta hablar un poco, acerca del isopropanol, el butanol, la acetona y el ácido butírico o su precursor el Butiril-CoA que es probablemente de donde se obtiene el butirato de etilo.

Se puede observar que la producción de acetona se favoreció, y si es que el butiril-CoA es el precursor del butirato de etilo, también se favoreció este producto con la adición de tiamina. Por lo que respecta al butanol, disminuyó su concentración, pues el butiril-CoA, que pudo llegar a formar el butanol se transformó en butirato de etilo, esto quizás por cuestiones de equilibrio o porque la hidrólisis de enlace del butiril-CoA, para formar el éster genera una gran cantidad de energía.

Finalmente, respecto al isopropanol el equilibrio que es afectado por el pH del medio, tendió a favorecer a la acetona que es precursor del isopropanol.

Arriba se detalló la producción de cada compuesto volátil en el medio 2.5 T-, por lo que para evitar ser repetitivos, aquí solo se propondrán de forma general, las explicaciones de porqué se favorecieron determinadas rutas que aumentaron la producción de aromas en los medios 12.5 y 37.5 $\mu\text{g/mL}$.

Como ya se ha dicho anteriormente, la célula siempre busca su beneficio mediante el máximo aprovechamiento de los sustratos que encuentra en el medio en que crece para la obtención de energía, es decir, la célula consume los sustratos del medio de acuerdo a la energía que deba proporcionar para sus actividades en un instante determinado. Ahora bien, considerando lo anterior, y además que la hidrólisis del enlace Acetil-CoA, puede proporcionar un ΔG° de -31.5 KJ/mol, reacción que es ligeramente (1 KJ/mol) más exergónica que la hidrólisis del ATP, es factible pensar que la célula favorezca éstas rutas, en algunas ocasiones más y en otras menos, dependiendo de las condiciones en el medio de cultivo. Sin embargo, el camino que en un momento dado siga la célula para obtener su energía, también dependerá de los productos finales de las rutas que se encuentren funcionando, pues estos productos pueden actuar como inhibidores de su ruta, cuando se encuentran en cierta concentración, por lo que la célula, tiene que tomar otras medidas, ya sea buscar otra ruta o transformar el producto que sirve como inhibidor en otro compuesto, al parecer *C. fimbriata* transforma éstos productos en ésteres, pues la hidrólisis del enlace Acetil-CoA al transformarse en éster con etanol, alcohol isoamílico o isobutanol, le proporciona energía para otras funciones.

A su vez, los alcoholes, como son el alcohol amílico, isoamílico e isobutanol se obtienen de reacciones de transaminación, en la elaboración de aminoácidos, y ya que la célula requiere de los aminoácidos en grandes cantidades, también se favoreció su obtención, aunque cabe aclarar que de haberse encontrado más amonio en el medio, éstos restos de fragmentos carbonados conocidos como 2-oxoácidos pudieron ser reutilizados para la formación de más aminoácidos, pero debido a la falta de amonio en el medio, se utilizaron para formar los respectivos ésteres, excepto el alcohol amílico.

Por lo que respecta al etanol, la reacción para su obtención se favoreció con la presencia de tiamina lo que también contribuyó a la formación del acetato de etilo.

En la tabla 8 se muestran los resultados de los medio 12.5 y 37.5 T-, y se observa que la adición de tiamina, definitivamente no favoreció a ciertos productos como es el caso de la acetona, el alcohol amílico, el butanol (comparado con el estándar), al butirato de etilo en el caso del medio 37.5 T- (únicamente), al isobutanol y al isopropanol, esto se debió seguramente a que la célula encontró mayor beneficio al continuar por otra ruta o porque las condiciones de pH del medio de cultivo no permitieron continuar por las rutas afectadas.

Por otra parte, el acetato de etilo y el diacetilo, fueron los productos mayoritarios en el medio 12.5 T- al comparar con cualquiera de las concentraciones obtenidas en los otros medios.

La explicación para el diacetilo es que debido a que es un subproducto de la síntesis de valina partiendo del piruvato vía acetolactato, quizás por las condiciones del medio ésta fue la ruta más favorecida. Para que esta ruta se favoreciera tuvo que haber un incremento en el contacto con aire, para suplantar la ruta anaeróbica por la ruta aeróbica, según estudios realizados por Kringstad y Rash. (36)

Respecto al medio 37.5 T-, sólo se puede decir que la concentración trabajada de tiamina, inhibió las enzimas que participan en su metabolismo pues la producción de aromas fue ligeramente superior a la del estándar.

En los párrafos anteriores, se plantearon algunas posibles explicaciones basadas en el metabolismo, de las diferencias entre la producción de aromas en cada medio con esporas T-, ya que fue en

éstos medios, donde se obtuvo la mayor producción de compuestos volátiles. Ahora se presentarán algunos aspectos de los perfiles de producción de cada volátil.

En la figura 30, se observa que la producción de acetaldehído fue detectada en el análisis del espacio de cabeza después de las 24 horas en todos los medios, excepto en el medio 12.5 T+, que se detectó antes. Después de este periodo de 24 horas, la producción fue incrementando, y en los medios 2.5 y 37.5 T+ alcanzó su máximo a las 96 horas (1.4 y 2.3 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente), después de lo cual disminuyó, sin embargo, en el medio estándar y 12.5 T+, se redujo la producción a las 96 horas y después hubo un aumento de acetaldehído formado. Debido a que el tiempo que se mantuvo la fermentación fue de 120 horas, no se sabe si en estos medios la producción continuó o disminuyó, aunque hay que considerar el hecho de que el acetaldehído es un reactivo precesor del etanol, por lo que se puede suponer que las condiciones o necesidades de la célula, no favorecieron la formación de acetaldehído en el lapso de las 72 a las 96 horas, por lo que disminuyó la producción de acetaldehído.

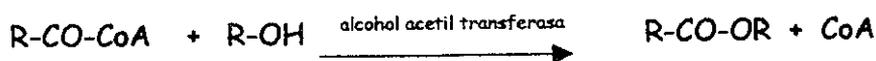
Respecto al acetato de isobutilo (figura 31), se observa que es detectado después de las 24 horas y va aumentando la producción. En el medio estándar la máxima producción se da a las 72 horas (0.93 $\mu\text{mol/L}$) y después disminuye, pero en los medios 2.5 y 37.5 T+ la producción siguió aumentando alcanzando su máximo a las 96 horas, después de lo cual disminuyó. De esta figura, es importante observar que el medio estándar T+ fue el que produjo una mayor cantidad de acetato de isobutilo, por lo que puede decirse que el medio con menos tiamina obtuvo la mayor producción.

El acetato de etilo, es el producto que se obtuvo en mayor concentración en todos los medios, y en la figura 32, se observa que en el medio 2.5 T+ se obtuvo la producción más alta de este producto (101.13 $\mu\text{mol/L}$), en porciento podría expresarse que la producción de acetato de etilo fue mayor en un 21.75 % con respecto al medio estándar T+, mayor en un 48.1% con respecto al medio 12.5 T+, y un 30.50 % respecto al medio 37.5 T+, además se puede notar que después de las primeras 24 horas se inicia su producción, la cual aumenta y disminuye de forma diferente en cada medio.

En la figura 33 se observa la producción de acetato de isoamilo, la cual es diferente en cada medio. En este caso, se observa que en todos los medios (excepto en el medio 12.5 T+) la producción inicia después de las 24 horas, al igual que la producción del acetato de etilo y acetato de isobutilo.

La producción de acetona, se observa en la figura 34, y como puede notarse, se inicia después de las 96 horas. Debido a que la fermentación no se estudió por más de 120 horas, no se puede determinar si la producción continuó aumentando o disminuyó.

Como se mencionó anteriormente, el alcohol isoamílico, necesita del acetil-CoA para formar el respectivo éster. Probablemente la reacción generalizada para la formación de ésteres es:



En la reacción se observa que para formar un éster es necesario un alcohol, así como el acetil-CoA, y considerando que *Ceratocystis fimbriata* forma los respectivos ésteres de los alcoholes que produce, excepto el del isopropanol (figura 42) y el alcohol amílico (figura 36), es probable que no forme estos ésteres debido a que la concentración de éstos alcoholes no es la suficiente para que se efectúe la reacción, sin embargo, en el caso de los otros alcoholes: isoamílico, etanol y el isobutanol que se obtienen en concentraciones más altas, se obtienen los respectivos ésteres, por lo que la concentración de los

alcoholes influirá en el desplazamiento de la reacción hacia la formación de ésteres, y también afectará a la concentración de alcoholes que haya en el medio.

Además, esta consideración ayuda a explicar, el porque se observan estas fluctuaciones en el comportamiento de la producción de dichos alcoholes (figuras 35, 40, 41), es decir, si la concentración de uno de estos alcoholes que forman su respectivo éster, aumenta mucho, lo más probable es que la célula reaccione para formar el éster, sin embargo, al disminuir la concentración del alcohol, la formación del éster se interrumpirá, y solo continuará si vuelve a incrementarse la producción del alcohol. Por otra parte, se considera que el alcohol, funciona como reactivo limitante, ya que la otra parte del éster probablemente se obtiene del acetil-CoA, la cual es una molécula muy importante en el metabolismo de la célula, y que se obtiene en grandes cantidades.

Por lo que respecta al etanol (figura 40), se observa que la producción describe un perfil parecido a una curva de crecimiento, además hay que notar que entre las 24 y 48 horas la concentración de etanol no era muy alta, quizás porque el etanol formado, se ocupó en la obtención de acetato de isobutilo, acetato de etilo, acetato de isoamilo y propionato de etilo.

En la figura 36 se observa que a las 24 horas el alcohol amílico ya es detectado en los medios 2.5 y 12.5 T+, después disminuye a las 48 horas y vuelve a incrementar en el lapso de 48 a 72 horas, después de lo cual disminuye. También puede observarse, que con excepción del medio estándar, en los otros medios se presenta la formación del alcohol amílico, después hay una ligera disminución y nuevamente se incrementa la producción llegando a su máximo y vuelve a disminuir.

La figura 38 muestra que la mayor concentración de butirato de etilo se presenta en el lapso de las 48 a las 72 horas, pero principalmente en el medio estándar T+.

El perfil de la producción de diacetilo que se muestra en la figura 39, muestra que la producción de este volátil inicia después de las 24 horas, va aumentando hasta las 96 horas y luego disminuye, excepto en el medio 12.5 T+ donde el aumento es hasta las 72 horas, y después disminuye.

Respecto a la producción de propionato de etilo (figura 43), se observa que en casi todos los medios la producción del éster se inicia a las 24 horas, sin embargo, cada medio presenta un comportamiento distinto en la formación de este volátil.

En las figuras 44-47, 52, 57 se observa que la producción de cada uno de éstos compuestos (acetaldehído, acetato de isoamilo, acetato de etilo y acetato de isobutilo, butirato de etilo, propionato de etilo) se detecta en el análisis de espacio de cabeza (headspace) a las 24 horas casi en todos los medios, lo cual es importante observar, ya que en los medios con esporas T+, la detección del producto y la mayor producción, se presenta en el transcurso de las 24 a las 48 horas.

Como se observa en las figuras 44-47, 52, 57, no hay un comportamiento similar en los diferentes medios para la producción de cada compuesto, sin embargo, hay que considerar que la producción de cada uno de los volátiles está relacionada entre sí, por ejemplo, en el caso los ésteres influye la concentración de los alcoholes (figura 49, 54, 55) aunque también los requerimientos de energía, así como la formación de algunos productos neutros (acetona) para evitar la acidificación del medio.

En la figura 48, se observa que las más altas concentraciones de acetona se presentaron a las 24 horas, después de lo cual disminuyó la formación de este producto. Al comparar con la producción de acetona en los medios con esporas T+, se observa que en dichos medios la producción de acetona se

presentó después de las 96 horas, y con las esporas T-, la producción máxima fue cuantificada a las 24 horas. Probablemente la producción de acetona es una medida para disminuir la acidez del medio.

De forma general, puede decirse que los ésteres, parecen estar parcialmente asociados con el crecimiento, pues la síntesis de éstos se inicia después de un periodo de crecimiento previo, debido que se necesita la acumulación de los metabolitos primarios para su formación, y después su producción se relaciona con el crecimiento. Respecto a los alcoholes y el acetaldehído, éstos son subproductos del catabolismo energético (metabolitos primarios) y su producción está relacionada con el crecimiento, aunque los subproductos pueden ser aprovechados para la obtención de otros productos necesarios para la célula o bien para obtener energía, debido a esto es que en las figuras de los perfiles de producción de los compuestos (figuras 30-57), se observan tantas variaciones y diferencias entre un medio y otro. En tabla 9 se muestran los intervalos de tiempo en los cuales los medios con esporas T+ y T- presentaron la mayor producción de cada compuesto volátil. En los casos donde se da un intervalo, es porque hubo diferencias en los tiempos en que se obtuvo la mayor producción en cada tiempo, por lo que se manejó como intervalo y en los casos en que se muestra una hora específica, es porque, ese fue el tiempo en que se cuantificó la producción más alta del producto. Aunque debe considerarse el hecho de que estos resultados fueron arrojados por los tiempo en que se analizaron las muestras, sin embargo, se pudo dar el caso de que se obtuviera una producción mayor en otro tiempo intermedio en el cual no se analizó la muestra, por lo que estos tiempos son datos tentativos, en los que se obtiene la concentración mayor de cada compuesto volátil.

De la comparación de tiempos de máxima producción con esporas T+ y T- que se presenta en la tabla 9, se observa que la producción de ésteres, isobutanol e isopropanol se dió 24 horas antes en los medios con esporas T-, y la máxima producción del alcohol amílico e isoamílico se presentó en tiempos de fermentación iguales con ambos tipos de esporas.

Producto	Tiempo (h) en el que se obtuvo la mayor producción en medios con esporas T+	Tiempo (h) en el que se obtuvo la mayor producción en medios con esporas T-
Acetaldehído	72-120	48-72
Acetato de etilo	72-120	48
Acetato de isoamilo	48-96	24-72
Acetato de isobutilo	72-96	48
Acetona	120	24
Alcohol amílico	72	72
Alcohol isoamílico	96	96
Butanol	72	96
Butirato de etilo	72-96	48
Diacetilo	72-96	72-96
Etanol	96-120	48
Isobutanol	96	72-96
Isopropanol	72	120
Propionato de etilo	72-120	48-72

Tabla 9 Tabla comparativo de tiempos en los que se oobtuvo la mayor produccción de compuestos volátiles con esporas T+ y T- de *Ceratocystis fimbriata*.

Medios de cultivo en que se obtuvo la mayor producción de cada compuesto volátil

Anteriormente se mencionó que la producción de cada volátil fue diferente en cada medio de cultivo, en algunos medios se favoreció la producción de solo algunos volátiles, mientras que se inhibió la producción de otros. En la tabla 10 se puede observar el medio de cultivo en que se obtuvo la mayor producción de cada volátil, así como la relación de aumento de la producción con respecto al estándar T- (sin tiamina) y el tiempo en que se obtuvo la mayor producción del compuesto volátil. De estos resultados se puede rescatar que el medio de cultivo 2.5 T-, fue en el que se favoreció la producción de más volátiles, después le siguió el estándar T+, sin embargo, el aumento de la producción en el medio estándar T+ sólo fue ligeramente superior a la del estándar T-. En el medio 12.5 T-, se favoreció la producción de acetato de etilo y de diacetilo, sin embargo, cabe mencionar que la producción en este medio fue una de las más importantes, ya que el aumento de la producción en comparación con el estándar fue considerablemente mayor.

También debe destacarse, que la adición de tiamina al medio de cultivo, en algunos casos no favoreció la producción de ciertos volátiles, tal es el caso del alcohol isoamílico, ya que como se observa, el medio estándar T- que no contenía tiamina fue el que produjo este alcohol en mayor cantidad.

Producto	Medio de cultivo en que se obtuvo la mayor producción	Relación del aumento de la producción con respecto al estándar T-	Tiempo (h) en el que se obtuvo la mayor producción
Acetaldehído	2.5 T-	1: 4	48
Acetato de etilo	12.5 T-	1:13	48-96
Acetato de isoamilo	2.5 T-	1:2	24-48
Acetato de isobutilo	2.5 T-	1:2	48
Acetona	2.5 T-	1:1 Ligeramente mayor	24
Alcohol amílico	2.5 T-	1:1 Ligeramente mayor	72
Alcohol isoamílico	Estándar T-	*	96
Butanol	Estándar T+	1:1 Ligeramente mayor	72
Butirato de etilo	2.5 T-	1:4	48
Diacetilo	12.5 T-	1:6	72
Etanol	2.5 T-	1:15	48
Isobutanol	Estándar T+	1:1 Ligeramente mayor	96
Isopropanol	Estándar T+	1:1 Ligeramente mayor	72

Tabla 10 Relaciones del aumento de la producción de cada volátil, con respecto a la producción de los volátiles del medios estándar T-

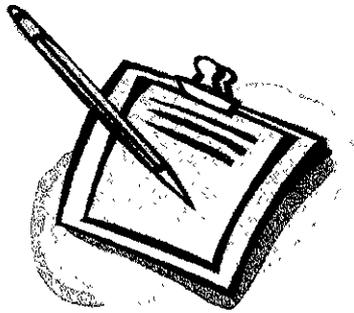
8. CONCLUSIONES

- ❖ La mayor producción de aromas se obtuvo utilizando esporas T- en el medio líquido a una concentración de 2.5 y 12.5 mg/L de tiamina, aunque no se obtuvieron las concentraciones más altas de todos los productos en éstos medios.
- ❖ Los productos que se obtuvieron en mayor concentración fueron los siguientes: el acetato de etilo, del cual la mayor producción (MP) fue de las 48-96 horas de fermentación en el medio 12.5 T- , acetaldehído (MP 48 horas; medio 2.5 T-), acetato de isoamilo (MP 24-48 horas; medio 2.5 T-), acetato de isobutilo (MP 48 horas; medio 2.5 T-), butirato de etilo (MP 48 horas; medio 2.5 T-), diacetilo (MP 72 horas; medio 12.5 T-), etanol (MP 48 horas; 2.5 T-).
- ❖ El mayor rendimiento de biomasa se obtuvo en el medio estándar T+ (fermentación en medio líquido sin tiamina y esporas cultivadas con tiamina).
- ❖ Con esporas T-, el incremento de tiamina hasta 37.5 ug/mL produjo inhibición del crecimiento y por lo tanto de la producción de aromas, sin embargo, por debajo de esta concentración, entre un rango de 2.5-12.5 ug/mL se favoreció, en especial, la producción de acetato de etilo y de los otros ésteres.
- ❖ Con esporas T+, al incrementarse la concentración de tiamina, el crecimiento disminuyó, al igual que la producción de compuestos volátiles (excepto en el medio 37.5 T+). Mientras que con esporas T-, al incrementarse la concentración de tiamina en el medio líquido, el crecimiento aumentó al igual que la producción de compuestos volátiles (excepto en el medio 37.5 T-). Por lo tanto, la doble adición de tiamina, en las esporas y en el medio líquido, no mejora la producción de aromas, sólo la inhibe, por lo que la hipótesis se rechaza.
- ❖ La tiamina favoreció el crecimiento y la producción de aromas en los medios T- al actuar en las rutas que requieren el Pirofosfato de tiamina(TPP), debido a que su presencia en el medio induce la formación de las enzimas que necesitan TPP.

9. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar un experimento, en el que se proporcionen además de todos los nutrientes del medio líquido estándar, 12.5 mg/L de tiamina, y aminoácidos como leucina y valina (para la formación de más ésteres y alcoholes: isobutanol, alcohol isoamílico, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo).
- ❖ Realizar las fermentaciones con medios naturales económicos ricos en tiamina, para establecer el medio más conveniente, en base a la producción y costos.
- ❖ Una vez obtenido el medio óptimo realizar un escalamiento del proceso en un fermentador.

10. ANEXOS



Anexo 1

Curvas de crecimiento en escala logarítmica,
de esporas T+ y esporas T-

Curvas de crecimiento con esporas T+ de *Ceratocystis fimbriata*
Tiempo vs Log 10 de la biomasa

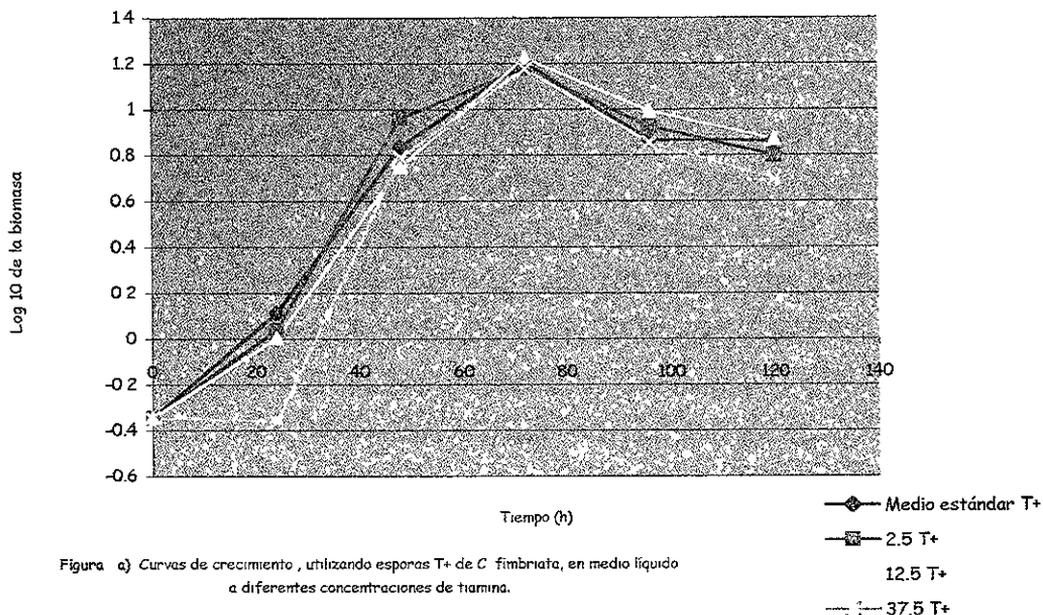


Figura a) Curvas de crecimiento , utilizando esporas T+ de *C. fimbriata*, en medio líquido a diferentes concentraciones de tiamina.

Curvas de crecimiento con esporas T- de *Ceratocystis fimbriata*
Tiempo vs Log 10 de la biomasa

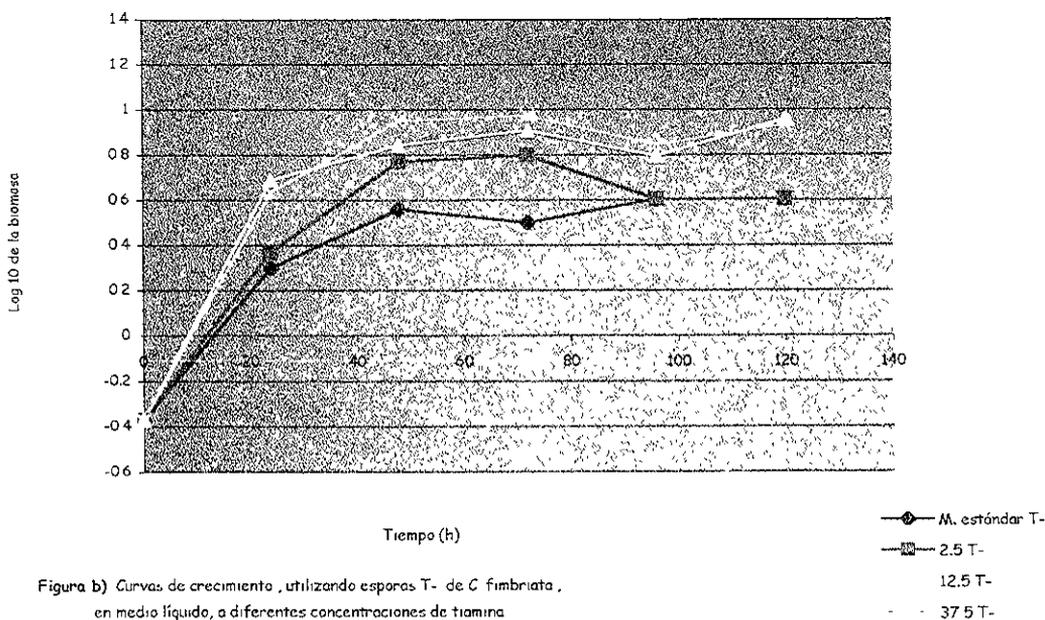


Figura b) Curvas de crecimiento , utilizando esporas T- de *C. fimbriata*, en medio líquido, a diferentes concentraciones de tiamina

Anexo 2

Aplicación del modelo de regresión polinomial
para la obtención del ABC del
Acetato de isobutilo en el medio estándar T-,
utilizando el programa de computadora Origin.

Anexo 2

ACETATO DE ISOBUTILO

STD+

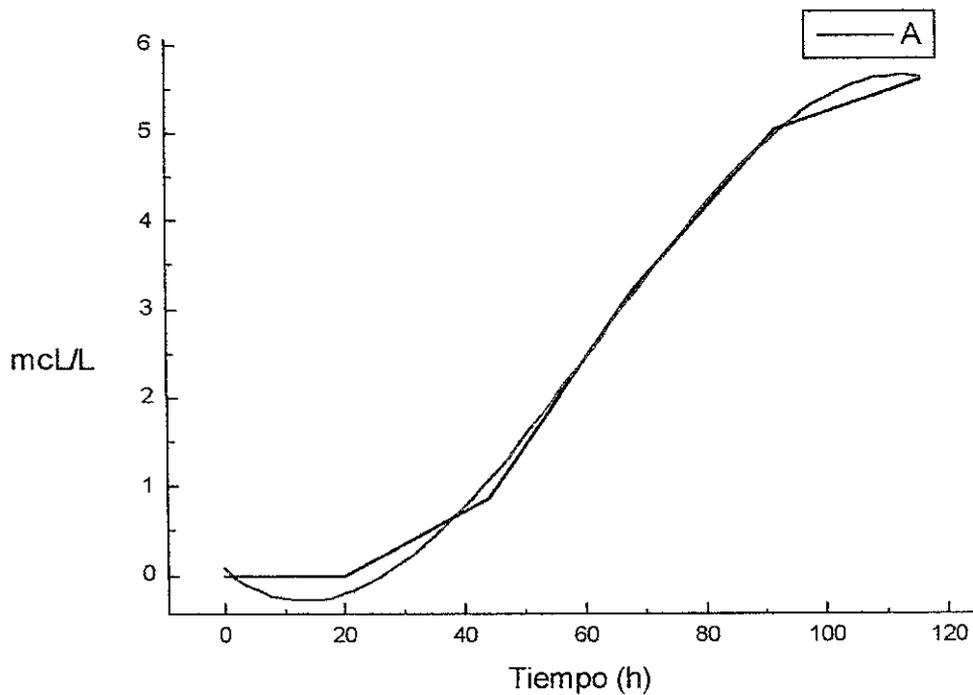
Polynomial Regression on Data1_A
 $y = A0 + A1x + A2x^2 + A3x^3 + \dots$

Parameter	Value	sd
A0	0,069039616	0,21566
A1	-0,054964927	0,01855
A2	0,0023088553	3,96235E-4
A3	-1,226023E-5	2,23645E-6

R = 0,99844
 $R^2 = 0,99689$
SD = 0,22249

Integ of Data1_A from zero
i = 1 --> 6
x = 0 --> 116

Area	Peak at	Width	Height
286,1928	116	48	5,5998



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desrosier N. Elementos de tecnología de alimentos. España : Editorial Continental, 1984:13-67; 453-479; 673-723.
2. Ames J, MacLeod. Volatile components of okra. *Phytochemistry* 1990; 29(4):1201-1207.
3. Bigelis R. Flavor metabolites and enzymes from filamentous fungi. *Food biotechnology* 1992; 46: 151-161.
4. Meza J, Christen P, Revah S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycol Res* 1997; 101: 911-919.
5. Christen P, Villegas E, Revah S. Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media. *Biotechnol Lett* 1994; 16(11):1183-1188.
6. Christen P, Meza J, Revah S. Fruity aroma production in solid state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycol Res* 1997; 8:911-917.
7. Meza J, Christen P, Revah S. Effect of added aminoacids on the production of a fruity aroma by *Ceratocystis fimbriata*. *Sci des aliments* 1998; 18: 627-636.
8. Christen P. Producción de aromas en fermentación sólida. *Tópicos de investigación y docencia* 1995; 4: 102-109.
9. Barnett H, Lilly G. The relation of thiamin to the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. *Mycologia* 1947; 39:699-708.
10. Robbins W, Ma R. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella*. *Bull Torrey Club* 1942; 69(3): 184-203.
11. Bu'Lock J. Introduction to basic biotechnology, Londres : Academic Press, 1990: 3-55.
12. Trevan S, Boffey K. Biotecnología: Principios biológicos. España: Editorial Acribia, 1990: 3-13; 17-21; 69-75; 77-93; 95-106; 107-113.
13. Atlas R. Microorganism in our world. California : Academic Press, 1995:158-179.
14. Brock T, Madigan M. Microbiología. 6ª ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1996:99-100, 127-129; 181-184; 328-329; 332-335; 373-375.
15. Sharpell F. Microbial flavour and fragrances: *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, 1985: 965.
16. Spatafora J, Blackwell M. The polyphyletic origins of ophiotomatoid fungi. *Mycol Res* 1994; 98(1):1-9.

17. Andrus C, Harter L. Morphology of reproduction in *Ceratostomella fimbriata*. Jour Agr Research 1933; 46(12): 1059-1077.
18. Upadhyay H, Kendrick B. Podromus for a revision of *Ceratocystis* (microascales, ascomycetes) and its conidial states 1975; 67: 798-805.
19. Hanlin R. Illustrated genera of ascomycetes. American Phytopathological Society 1990; 94: 18-20.
20. Olchowecki A, Reid J. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in manitoba, Can J Bot 1974; 52:1675-1711.
21. Webster R, Buttler E. A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*, Can J Bot 1967; 45: 1457-1468.
22. Campbell R. Nutrient requirements for the production of perithecia by *Ceratocystis variospora* and other species. Am Jour Bot 1958; 45:263-270.
23. Robbins W, Ma R. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella* and related fungi. Am Jour Bot 1947; 29(10):835-843.
24. Wilson E, Lilly V. The utilization of oligosaccharides by some species of *Ceratocystis*. Mycologia 1958; 50:376-389.
25. Bernhard S, Sidney A. Estructura y función de las enzimas, España : Ediciones H. Blume, 1987: 136-177; 201-229.
26. Laguna, Piña E. Bioquímica. 4ª ed. México : Ciencia y Cultura Latinoamericana, 1995: 31-43.
27. Borel, Randoux, Maquart, Le Peuch. Bioquímica Dinámica. Argentina : Editorial Médica Panamericana, 1989: 276-306.
28. Machlin J. Handbook of vitamins, pigments and growth factor. Ireland : The Universities Press, 1989: 15-24; 137-145.
29. Elsevier E. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factor. 2ª ed. Northern Ireland : The Universities Press, 1989: 137-145
30. Mc Gilvery R, Goldstein G. Bioquímica. 2ª ed. México : Interamericana, 1986: 514-559.
31. Wang D, Cooney Ch, Demain A, Dunnill P. Fermentations and enzyme technology. New York : John Wiley and Sons, 1979: 311-318.
32. Lenhinger A. Bioquímica. 2ª ed. Barcelona : Ediciones Omega, 1994: 341-345; 371-394; 989-997.
33. Van Holde M. Biochemistry. Rewood : Cummings Publishing Company, 1990:339-401; 539-589.
34. Voet D. Voet J. Bioquímica. Barcelona : Ediciones Omega, 1992: 356-380; 383-393; 424-452; 456-481; 619-625; 767-770.

35. Smith J. The filamentous fungi. Great Britain : Ed. Arnold, 1978 : 308-327.
36. Rose H, Harrison J. The yeast, 2nd ed. New York : Academic Press, 1975 : vol 3 : 341-443.
37. Wang Y, Mc Neil B. Scleroglucan. Critical reviews in biotechnology 1996; 16(3): 185-215.
38. Moore E. Fundamentals of the fungi. 3rd ed. New Jersey : Prentice Hall, 1990: 307-330.
39. Rose A. Microbiología química. 2^a ed. España : Editorial Alhambra, , 1977: 211-254; 313-326; 438-443.
40. Prescott, Dunn's. Industrial microbiology. 4th ed. United States American : Avi Publishing Company, 1982: 35-41; 732-739.
41. Elsevier C, King R. Food biotechnology. 2nd ed. Northern Ireland : Universities Press, 1997: 59-81.
42. Dickinson R, Lanterman M, Danner P. A C¹³ nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucina to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1997; 24871-26878.
43. Derrick S, Large P. Activities of the enzymes of the erlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* growth in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. Journal of general microbiology 1993 ; 139 : 2783-2792).
44. Äyräpää T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. Journal of the Institute of Brewing Chemist 1971; 77(266-276).
45. Berry D, Chamberlain Formation of organoleptic compounds by yeast grown in continuous culture in defined medium. Journal of the American Society of Brewing Chemist 1986 ; 44: 52-56.
46. Dickinson J, Dawes I. The catabolism of branched-chain amino acids occurs via 2-oxoacid dehydrogenase in *saccharomyces cerevisiae*, Journal of General Microbiology 1992; 138: 2029-2033.
47. Bigelis R, Weir P, Jones R. Exogenous valine reduces conversion of leucine to 3-methyl-1-butanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology 1983; 45 (658-664).
48. Christen P, Reimbault M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. Biotechnol letters 1991; 13(7):521-526.
49. Bailey J. Towards a science of metabolic engineering, Science 1991; 252 : 1668-1674
50. Stephanopoulos G, Aristos A, Jens N. Metabolic engineering principles and methodologies. California : Academic Press, 1998: 1-19; 21-77.
51. Cameron D, Tong I. Cellular and metabolic engineering. Appl Biochem Biotechnol 1992; 38 (105-140)
52. Dawes I, Fisiología de los microorganismos. España : H Blume Ediciones, 1990: 81-114, 175-223.

53. Lanza E, Palmer K. Aroma production by cultures of *Ceratocystis monilliformis*. J Agric Food Chem 1976; 24:1247.
54. Acree T, Teranish R. Flavour science sensible principles and techniques. American Chemical Society, 1993: 1-19; 137-164; 169-197, 225-241.
55. Thoma R. Industrial microbiology. United States American: Editorial Dowden, 1977 : vol. 12: 23-47.
56. Pelczar M, Reid R, Chan E. Microbiología. 4ª ed. México : Mc Graw Hill, 1995: 163-190.
57. Smith J., Biotechnology, 2ª ed., Great Britain : Gallier Printers, 1989: 1-32; 42-43; 82-92.
58. Rehm H. Industrial Microbiology. 2ª ed. New York : Ed. Springer, 1988: 56-70.
59. Bull A, Dalton H. Comprehensive biotechnology. Great Britain : Pergamon Press, 1985: vol. 1: 252-276.
60. Mc Intyre M, Mc Neil B. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. Appl Microbial Biotechnol 1998; 50: 291-298
61. Kennet. Regulation and control of metabolic activities, [Wisconsin]: University of Wisconsin Department of Bacteriology, 1998. < <http://www.bact.wisc.edu/bact303> > [Consulta: 24 marzo 2000]
62. Yarranton W. Molecular and cell biology of yeast, Canada : Blackizend Sons Ltd, 1989: 280-303.
63. Peritone P. Biotechnology in Latin America. Politics impacts and risks. Wilmington Delaware : SR Books, 1998: 1-11; 69-95.
64. Mittal L, Gauri S. Food biotechnology techniques and applications. Canada : Technomic publishing ; 1992: 105-107.
65. Horvath C, Etre L. Chromatography in biotechnology. Whashington : American Chemical Society , 1993 : 1-10.
66. Doyle J, Persley G. Enabling the safe use of biotechnology principles and practice, United States American :The international Bank, 1996: 61-65.
67. Acree T, Teranish R. Flavour science sensible principles and techniques, Washington : American Chemical Society 1993: 1-19; 137-164; 169-197; 225-241.
68. Berger R, Drawert F. Biotechnology in flavour research: achievements, needs and perspectives, flavour science and technology, New York : John Wiley and Sons, 1987: 199-213.
69. Koller W., Flavour science and technology, New York : John Wiley and Sons, 1987: 181-185.
70. Robins. Rhodes, Manipulating Secondary Metabolism, Great Britain : Cambridge University Press, 1988: 155-167.

71. Reineccius G., *Source Book of Flavours, second edition*, New York : Chapman and Hall, 1994: 1-2; 44-52.
72. Cromococo J, Evans J, Bravo F. *Biotechnology of plants and microorganisms*, United States American : Ohio State University Press, 1986: 3-8.
73. Elsevier C, King R. *Food Biotechnology, 2nd*, Northern Ireland : The Universities Press, 1997: 59-81.
74. Heath, Reineccius. *Flavour Chemistry and Technology*, New York : Van Nostrand Reinhold Company, , 1986:145-157.
75. Casida L., *Industrial Microbiology*, New York : John Wiley and Sons, 1968: 117-135; 142-149.
76. Lancaster B., *Changing food technology: a view of the future*, New York : White Plains, 1989:73-83.
77. Beuchat L., *Food and beverage mycology, 2nd*, New York : AVI Book, 1987: 51-65; 70-77.
78. Smith J., *Biotechnology, 2nd*, Great Britain : Galliard Printers, 1988: 1-32; 42-43; 82-92.
79. Quintero R., *Prospectiva de la biotecnología*, México : CONACYT, 1985: 115-128; 130-14
80. Marx J., *A revolution in biotechnology*, Great Britain : Scotprint Lts. Musselburgh, 1989: 56-70.
81. Harlander S, Theodore L. *Biotechnology in food processing*, New Jersey : Noyes Publication, 1986: 209-219; 228-246; 249-251.
82. Lindsay R, Willis B. *Biotechnology challenges for the flavour and food industry*, New York : Applied Science, 1989: 13-24; 145-151.