

Caracterización del proceso fermentativo de *Lasiodiplodia Theobromae* mediante cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Grolamys Castillo-Portela, Felipe Eng-Sánchez, Clara Nogueiras-Lima*, Georgina Michelena-Alvarez, José Sánchez-Bravo** y Manuel Acosta-Echeverría**

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Apartado Postal. 4026, La Habana, C.P. 11000, grolamys.castillo@icidca.edu.cu

Recibido: 2 de diciembre de 2013. Aceptado: 31 de marzo 2014.

Palabras clave: *Lasiodiplodia theobromae*, Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, Cromatografía gaseosa, caldo fermentado, biomasa.

Key words: *Lasiodiplodia theobromae*, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry, Gas Chromatography, fermentation broth, biomass.

RESUMEN. *Lasiodiplodia theobromae* es un hongo que ha sido informado por varios autores como un productor de gran rendimiento de la fitohormona ácido Jasmónico (AJ). Una cepa autóctona de este hongo ha sido utilizada en el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar para la obtención de un caldo fermentado con un gran contenido de AJ, el cual ha sido registrado como BIOJAS[®]. Este caldo ha sido aplicado en diversos cultivos agrícolas y ha demostrado su factibilidad agronómica, como regulador del crecimiento vegetal y en el control biológico de diferentes microorganismos fitopatógenos y plagas. Tanto el caldo como la biomasa, obtenidos a partir del proceso fermentativo de este hongo, contienen otros metabolitos que presentan interesantes propiedades bioactivas, entre los que se encuentran los ácidos grasos como componentes fundamentales de la biomasa. En este trabajo se muestra el estudio realizado para cuantificar los ácidos grasos presentes en el extracto obtenido de la biomasa del hongo por Cromatografía de Gases y la identificación del perfil de sustancias presentes en la fracción apolar del caldo fermentado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Los ácidos grasos más abundantes en la biomasa fueron los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y α -linolénico, sobresaliendo el ácido oleico, como el componente mayoritario. En la composición del caldo fermentado se encontró un contenido de 2,32 % de ésteres de ácidos grasos; 2,47 % de alquenos; 14,40 % de alcoholes; 30,15 % de aldehídos y 21,73 % de parafinas.

ABSTRACT. *Lasiodiplodia theobromae* is a fungus, which has been reported by some authors as a high yield producer of the phytohormone jasmonic acid (JA). An indigenous strain of this fungus has been used for producing a fermentation broth with a high JA concentration by the Cuban Research Institute for Sugar Cane Derivatives (ICIDCA), registered as BIOJAS[®]. The broth has been applied to some agricultural crops and demonstrated its economic feasibility as plant growth regulator and biological control of various phytopathogenic microorganisms and pests. Both fermentation broth and biomass from this fungus contain some other metabolites having bioactive properties, for instance, fatty acids. This paper shows the composition and quantification of fatty acids in the biomass using Gas Chromatography (GC) and the identification of substances profile in fermentation broth by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The most fatty acids in the biomass are palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, being oleic acid the major component. On the other hand, 2,32 % of fatty acid esters; 2,47 % of alkenes; 14,40 % of alcohols; 30,15 % of aldehydes and 21,73 % of paraffins were detected in the composition of fermentation broth.

chemical composition of aerial parts of *Portulaca oleracea* L. growing in Cuba, informing the FAs content of its lipid extract.

INTRODUCCIÓN

La producción de ácido jasmónico (AJ) a partir de hongos por vía fermentativa, surgió como una alternativa promisoría para solucionar el problema de los elevados costos de su producción, a partir de la extracción de flores de jazmín y té, donde este se encuentra en concentraciones de trazas.¹ Esta fitohormona se aisló por primera vez en 1971² a partir de sobrenadantes de cultivo del hongo *Lasiodiplodia theobromae*, también conocido como *Botryodiplodia theobromae*. La obtención de elevados rendimientos de esta fitohormona con este hongo ha sido informado por varios autores.^{1,3-6} El AJ fue identificado inicialmente como un potente inhibidor del crecimiento y senescencia de las plantas, sin embargo, se han encontrado otros efectos en plantas, como la estimulación de la formación de tubérculos y la maduración de frutos, entre otros. La función mejor documentada se relaciona con su papel regulador en la respuesta de defensa, al fomentar los sistemas defensivos de las plantas contra patógenos y plagas (estrés biótico), así como ante el estrés abiótico.³

Una cepa autóctona de este hongo ha sido utilizada en el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) para la obtención de un caldo fermentado con un gran contenido de AJ (100 a 300 mg/L),^{4,5} el cual ha sido registrado como BIOJAS[®] en la Oficina Cubana Central de Fertilizantes. Para la cuantificación del contenido de AJ en los caldos fermentados se ha utilizado un método analítico desarrollado y validado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.⁷ Este caldo ha sido aplicado en diversos cultivos agrícolas y ha demostrado su factibilidad agronómica, como regulador del crecimiento vegetal y en el control biológico de diferentes microorganismos fitopatógenos y plagas.⁸ Sin embargo, hasta ahora el caldo y la biomasa del hongo, obtenidos durante el proceso fermentativo, no habían sido estudiados con el objetivo de identificar otros metabolitos con posibles propiedades bioactivas, como pueden ser los ácidos grasos (AG) presentes en la biomasa y otros metabolitos apolares presentes en el caldo.

La determinación de la composición lipídica, y en especial, la determinación del perfil de AG, ha sido empleada como criterio quimio-taxonómico para la caracterización de hongos.⁹ En el pasado, a este estudio se le daba poco valor taxonómico debido a que los hongos presentan menos diferencia en su composición de AG que las bacterias. Sin embargo, Stahl y Klug¹⁰ mostraron que el mismo tiene potencial para ser usado en la caracterización e identificación de hongos filamentosos.

La Cromatografía de Gases (CG) ha sido utilizada de forma exitosa para la determinación de los AG presentes en una gran variedad de biomásas fúngicas, provenientes de hongos filamentosos que incluyen oomicetos, zigomicetos y basidiomicetos, con vistas a establecer diferencias quimio-taxonómicas.⁹⁻¹² El potencial para producir lípidos y ácidos grasos por el hongo *Cladosporium sp.* fue estudiado,¹³ sin embargo, existe poca literatura sobre la caracterización de fracciones apolares obtenidas a partir de caldos fermentados. La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) ha sido una herramienta útil para caracterizar químicamente fracciones apolares obtenidas de diversas procedencias como plantas, alimentos, hongos, etc. En estas caracterizaciones se ha visto la presencia de diversos tipos de compuestos como hidrocarburos, esteroides, aldehídos, etc.¹⁴⁻¹⁸

El objetivo de este trabajo consistió en cuantificar por CG el contenido de AG presente en la biomasa y caracterizar el perfil de sustancias presentes en la fracción apolar del caldo utilizando la CG-EM, para lograr un mejor aprovechamiento del BIOJAS, considerando las propiedades de las sustancias que sean identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo para la producción de ácido jasmónico

Las muestras analizadas proceden de biopreparados libres de células, obtenidos por fermentación en cultivo estático, utilizando la cepa autóctona *Lasiodiplodia sp.* 2334 procedente de la Colección de Cultivos del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT), la cual fue conservada, en tubos inclinados con extracto de malta-agar (Merck, Alemania) a 4 °C.

Para la fermentación, se utilizó el medio de cultivo informado por Miersch¹⁹ modificado con la adición de extracto de levadura, el cual se ajustó a un pH 5,5. Se inocularon 10 fragmentos del micelio de 8 mm de diámetro obtenidos a partir de siembras realizadas en placas Petri, en erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo Miersch utilizado como preinóculo y se incubó a 30 °C durante 12 d.

Determinación de AG en la biomasa por GC

Preparación de muestra

La determinación del contenido de AG se realizó según el protocolo Bligh y Dyer,²⁰ que se basa en la extracción de estos compuestos con una mezcla cloroformo: metanol (2 : 1) a partir de la biomasa obtenida durante el proceso fermentativo, previamente macerada con nitrógeno líquido. La fracción orgánica se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno y los AG se esterificaron con una mezcla de metanol: tolueno: H₂SO₄ (88 : 10 : 2) a 80 °C por 1 h y finalmente fueron extraídos con n-hexano.⁸

Condiciones cromatográficas para el análisis del extracto de la biomasa

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo gas-líquido 5890 (Hewlett Packard, EE.UU.) con una columna capilar DB-WAX (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espesor de película, Agilent, (EE. UU.) y un detector de ionización de llama. El horno se calentó de 170 °C a 300 °C a 5 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 250 °C y 300 °C, respectivamente. El flujo del gas portador (H₂) fue de 1 mL/min. La determinación del contenido de AG libres (%) se realizó según lo descrito por Wan y col.²¹ mediante el programa HP Chemstation Rev.A.03.06. En los análisis, realizados por triplicado, se emplearon patrones de AG (Sigma, EE. UU.) y reactivos y disolventes (J.T. Baker, EE. UU.) puros para análisis.

Caracterización del caldo fermentado por CG-EM

Preparación de muestra

El caldo fermentado se concentró hasta un tercio de su volumen, del cual se tomaron 5 mL y se sometió a un proceso de extracción líquido-líquido con n-hexano por tres veces de forma consecutiva. El extracto resultante se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida hasta sequedad, en un evaporador rotatorio a 40 °C.

Condiciones cromatográficas para el análisis del extracto del caldo

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo gas-líquido 6890N acoplado a un detector de masas 5975 B inert (Agilent, EE.UU.) con una columna capilar HP-5MS (5 % fenil metilsilicona, 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espesor de película, Agilent, EE.UU.) La rampa de temperatura del horno fue de 2 min desde 150 °C hasta 160 °C, 2 min a 2 °C/min hasta 220 °C y de 5 min a 6 °C/min hasta 300 °C. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo *split 10:1*, se mantuvo a 250 °C. El volumen de inyección fue 0.2 µL. Las temperaturas de la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 300 °C, 230 °C y 150 °C. La energía de ionización fue de 70 eV. La adquisición se realizó desde 30 m/z hasta 600 m/z. La identificación se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los de la biblioteca Wiley-275 y NBS75K.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la composición de AG de la biomasa por GC

Se determinó la composición relativa de AG en la biomasa de cultivo líquido desde el cuarto hasta el decimosegundo día de crecimiento del hongo (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación cuantitativa de AG en la biomasa durante el proceso fermentativo de obtención de BIOJAS

Día	Composición relativa de AG (% p/p)										
	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	Otros
	X ± DS (n = 3)										
4	21,25 ± 0,90	0,52 ± 0,01	2,26 ± 0,04	1,52 ± 0,01	8,46 ± 0,01	23,30 ± 1,31	22,71 ± 0,84	14,22 ± 0,53	0,63 ± 0,10	3,35 ± 0,05	0,23 ± 0,01
6	21,10 ± 0,03	0,82 ± 0,07	1,23 ± 0,05	1,78 ± 0,95	8,12 ± 0,12	27,10 ± 0,58	17,26 ± 0,82c	13,06 ± 0,20	1,35 ± 0,09	1,67 ± 0,07	0,24 ± 0,01
8	16,65 ± 0,31	0,76 ± 0,37	2,21 ± 1,69	1,39 ± 0,36	9,09 ± 2,17	24,84 ± 1,03	17,01 ± 0,46	15,09 ± 0,26	0,96 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,29 ± 0,08
12	14,47 ± 0,02	0,62 ± 0,01	0,47 ± 0,04	1,55 ± 0,12	6,45 ± 0,07	26,28 ± 0,05	21,16 ± 0,27	17,44 ± 0,04		0,73 ± 0,07	0,35 ± 0,03

X Media. DS Desviación estándar.

16:0,+ ácido palmítico; 16:1, ácido palmitoleico; 16:2, ácido hexadecadienoico; 16:3, ácido hexadecatrienoico; 18:0, ácido esteárico; 18:1, ácido oleico; 18:2, ácido linoleico; 18:3, ácido α -linolénico; 20:0, ácido eicosanoico; 22:0, ácido behénico; T: trazas, menos de 0,15%.

La determinación de la composición de AG en la biomasa fue necesaria, además de por su valor quimio-taxonómico, para corroborar la presencia de ácido α -linolénico, como posible sustrato precursor de la biosíntesis del AJ por este hongo a semejanza como ocurre en la biosíntesis de este metabolito en las plantas. Este es el primer estudio de caracterización realizado para una cepa del género *Lasiodiplodia*.

Los resultados mostraron que la cepa produce al menos 10 de los 21 AG detectados en hongos, cantidad que coincide con lo informado para los hongos ascomicetos.¹¹ Se apreció que la longitud de la cadena de los AG varió desde 16 hasta 22 átomos de carbono, siendo los más abundantes durante todos los días muestreados los ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y α -linolénico (18:3), los que representan aproximadamente el 90 % del contenido total de AG, lo cual coincide con lo informado por Jernerén²² para esta cepa.

Se conoce que la edad del cultivo influye en la composición de los AG de los hongos.²³ Con los días del cultivo se modificó el contenido relativo de ellos, las variaciones más pronunciadas en el último día, en el contenido de los ácidos 18:1 y 18:3 que se incrementaron en aproximadamente el 3%; mientras que para los ácidos 16:0, 22:0, 16:2, 18:0, 18:2 y 22:0 sus contenidos disminuyeron. Posiblemente el ácido 16:0 formado se transforma en 18:0 y luego, esta en los ácidos 18:1 y 18:3 fundamentalmente, a semejanza con lo informado para las rutas de biosíntesis de los AG de los hongos pues la concentración del ácido 18:2 se mantiene casi constante y la del 18:0 disminuye en 2 % al día 12 de crecimiento del hongo.²⁴

De los AG insaturados, el 18:1 fue el más abundante, lo cual usualmente ocurre para la mayoría de los hongos y levaduras estudiados. En cuanto a los poliinsaturados, se detectaron el 16:2 y el 16:3, los cuales no son frecuentes en hongos,⁹ aunque en menor proporción que los 18:2 y 18:3.

Caracterización del perfil de metabolitos en la fracción apolar del caldo.

No se hallaron reportes de estudios similares sobre el perfil de sustancias en la fracción apolar (n-hexano) de caldos fermentados de hongos. Este es el primer estudio realizado para el hongo fitopatógeno *L. theobromae*. En este estudio fueron identificados diversos compuestos por CG-EM, mediante las bibliotecas de espectros del equipo (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil de sustancias en el extracto de n-hexano del caldo por CG-EM

Tiempo de retención (min)	Tipo de compuesto	de Identificación	% de área
10,96	Aldehído	3-Z-hexenal	0,70
11,74	Alcohol	1-tetradecanol	0,55
13,24	Alcohol	1-dodecanol	0,61
13,60	Alcohol	1- tetracosanol	0,36
14,03	Alcohol	2,4- bis - 1,1-dimetiletilfenol	12,88
15,80	Alqueno	1-hexadeceno	1,22
17,57	Aldehído	3-metoxi-5-metilbenzaldehído	5,45
19,59	Aldehído	4-etoxi benzaldehído	24,00
22,19	alqueno	1-octadeceno	1,25
30,09	Éster de ácido graso	hexadecanoato de etilo	1,60
36,89	Éster de ácido graso	Linoleato de etilo	0,72
42,48	Parafina	NI	1,11
46,42	Parafina	NI	1,99
50,37	Parafina	NI	3,27
53,15	Parafina	NI	4,31
55,25	Parafina	NI	3,88
57,00	Parafina	NI	3,43
58,51	Parafina	NI	2,26
59,87	Parafina	NI	1,48

NI No identificada.

Se encontraron fundamentalmente cuatro tipos de compuestos: alcoholes, aldehídos, parafinas y ésteres de AG, de los cuales presentaron los mayores porcentajes de área relativa, un alcohol y dos aldehídos.

Dentro del grupo de los alcoholes, se detectó como mayoritario al 2,4- bis - 1,1-dimetiletilfenol. Se encontró la presencia de aldehídos como el 3-metoxi-5-metilbenzaldehído y el 4-etoxibenzaldehído, compuestos que forman parte de aromas naturales como el de Sidra y el de uvas.^{25,26} Usualmente, los aldehídos son sintetizados por los microorganismos, como intermediarios en la formación de alcoholes a través de la descarboxilación de los cetoácidos, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa.²⁵

En la mezcla de hidrocarburos lineales no ramificados, se detectaron los homólogos de la serie desde el C14 hasta el C43. Dichos hidrocarburos se identificaron por sus espectros de masas, teniendo en cuenta los iones característicos a m/z 43 (propilo), 57 (butilo), 71 (pentilo), 85 (hexilo) y 99 (heptilo), así como las pérdidas sucesivas de metilenos ($M^+ - nCH_2$) y los consignados en la biblioteca de espectros. Aunque se encontraron coincidencias espectrales mayores del 90 % para estos compuestos, no pudo asignarse una identificación para cada tiempo de retención, por la coincidencia de varias de ellas en el mismo tiempo de retención. Los hidrocarburos de alto peso molecular también han sido identificados por CG-EM en hongos Basidiomicetos como el saprófito *Ganoderma australe*.¹⁴

CONCLUSIONES

Se determinó la composición relativa de los ácidos grasos presentes en la biomasa del hongo *Lasiodiplodia theobromae* por cromatografía gaseosa, donde predominan los ácidos grasos insaturados 18:1, 18:2 y 18:3, sobresaliendo el ácido oleico, como el componente mayoritario con un 26,28 %. Además, en el extracto de n-hexano de los caldos fermentados de BIOJAS se encontró un contenido de 2,32 % de ésteres de AG; 2,47 % de alquenos; 14,40 % de alcoholes; 30,15 % de aldehídos y 21,73 % de parafinas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales de la Universidad de Murcia por el análisis de las muestras en el equipo de CG-EM y al Instituto de la Grasa de Sevilla por el análisis de AG por CG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Dhanhukia PC, Thakkaar VS. Standardization of Growth and Fermentation Criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for Production of Jasmonic Acid. *African J of Biotechnology*. 2007; 6: 707-712.
2. Aldridge D, Gatts S, Giles D, Turner WB. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *J Chem Soc*. 1971; Sec C:1623-1627.
3. Wasternack C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*. 2007; 100: 681-697.
4. Eng F, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 1998; 33: 715-720.
5. Eng F, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Rev Iberoam Micol*. 2003; 20: 172-175
6. Saha A, Mandal P, Dasgupta S, Saha D. Influence of Culture Media and Environmental Factors on Mycelial Growth and Sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology*. 2008; 29: 407-410.
7. Castillo G, Eng F, Ortega G, Michelena G. Determinación de ácido jasmónico por HPLC en caldos de fermentación. *Revista ICIDCA*- 2004; 38: 24-27.
8. Eng F. Caracterización de una nueva cepa del hongo ascomiceto *Lasiodiplodia* para la obtención de ácido jasmónico de uso agrícola [Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Biológicas]. La Habana; Universidad de La Habana; diciembre; 2012.
9. Dyk VMS, Kock JL, Botha A. Hydroxy long chain fatty-acids in fungi. *World J of Microb & Biotech*. 1994; 10: 495-504.
10. Stahl PD, Klug MJ. Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl and Environ Microbiol*. 1996; 62: 4136-4146.
11. Da Silva M, Manfio GP, Vanderlei Perez V. Characterization of Selected Strains of Mucorales using Fatty Acid Profiles. *Rev Microbiol (São Paulo)*. 1998; 29: 18-22.
12. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiological Reviews*. 1999; 12: 454-500.
13. De BK, Verma S. Characterization of lipids and fatty acids of the soil derived fungus *Cladosporium* sp. *Grasas y aceites*. 2011; 62: 213-220.
14. Nieto IJ y Valencia MA. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma australe*. *Bol Soc Chil Quím*. 2002; 47: 511-516.
15. Antón Díaz MJ. Descripción del aroma de Sidra Natural de *Nueva Expresión* por Cromatografía de Gases y Olfatometría, [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Químicas]. España Universidad de Oviedo; junio; 2012.

16. Ogunlesi M, Okiei W, Ademoye M, Osibote EA. Analysis of Essential Oil from the Stem of *Chansmanthera dependens*. Journal of Natural Products. 2010; 3:47-53.
17. Gohar YM, El-Naggar MA, Soliman MK, Barakat KM. Characterization of marine Burkholderia cepacia antibacterial agents. Journal of Natural Products. 2010; 3:86-94.
18. Bratu A, Mihalache M, Hanganu A, Chira NA, Todașcă MC, Roșca S. Quantitative determination of fatty acids from fish oils using GC-MS method and ¹H-NMR. UPB Scientific Bulletin, Series B. 2013; 75:23-32.
19. Miersch O, Preiss A, Sembdner G, Shreiber K. (+)-7-isojasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. Phytochemistry. 1987; 26:1037-1039.
20. García Regueiro JA, Díaz López I. Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. IRTA. Recerca i Tecnologia Agroalimentàries 2006. [consultado: 3 de octubre de 2013] Disponible en: <http://hdl.handle.net/2072/4751>
21. Wan PJ, Dowd MK, Thomas AE, Butler BH. Trimethylsilyl Derivatization/Gas Chromatography as a Method to Determine the Free Fatty Acid Content of Vegetable Oils. J Am Oil Chem Soc. 2007; 84: 701-708.
22. Jernerén F, Eng F, Hamberg M, Oliw EH. Linolenate 9R-Dioxygenase and Allene Oxide Synthase Activities of *Lasiodiplodia theobromae*. Lipids. 2012; 47:65–73.
23. Lösel DM. Fungal Lipids. En: Ratledge C and Wilkinson SG Eds., Microbial Lipids, vol. 1. London UK; Academic Press Ltd.: 1988: p.699-806.
24. Archer DB. Biotechnology of Filamentous Fungi. Applications of Molecular Biology, Editorial Cambridge University Press; Cambridge United Kingdom: 1999: p.343-346.
25. Conde González JE, Rodríguez Bencomo JJ, Cabrera Valido HM, Pérez Oliveró SJ, Pérez Trujillo JP, Ferreira González V, Cacho Palomar JF. Determinación de precursores de aroma en uvas de las variedades blancas gual, malvasía y verdello. Jornadas Técnicas Vinícolas Canarias. [consultado: 3 de octubre de 2013] Disponible en: http://www.tenerife.es/Casa-vino/jornadas/indice_jornadas_5.htm
26. Sánchez García Figueroa FL. Estudio de la producción de aromas por el hongo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* en medio líquido [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Biológicas]. D.F. México; Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Julio, 2004.