



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias

**UTILIZACIÓN DE DOS MEDIOS DE
CULTIVO CON FORMULACIÓN
ECONÓMICA PARA LA PRODUCCIÓN
DEL INÓCULO DE *Ustilago maydis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA BIOTECNÓLOGA

PRESENTA

MARÍA DEL ROSARIO BELTRÁN LEYVA

CD. OBREGÓN, SONORA

JULIO DE 2004

ÍNDICE

	Página
INDICES DE CUADROS Y TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	4
A. General.....	4
B. Específicos	4
1.4 Hipótesis	4
II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 <i>Ustilago maydis</i>	5
2.1.1 Ciclo de vida	6
2.1.2 Síntomas de infección	10
2.1.3 Taxonomía.....	11
2.2. Cinética de crecimiento	13
2.2.1. Fase de latencia	14
2.2.2. Fase logarítmica o exponencial.....	14
2.2.3. Fase estacionaria	15
2.2.4. Fase de muerte	15
2.3 Huitlacoche	17
2.3.1 Características alimenticias.....	18
2.4 El maíz (<i>zea mays</i>).....	19
2.4.1 Importancia del maíz	20
2.4.2. Harina de maíz.....	21
2.5. La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	23

2.5.1 Composición química de la papa	23
2.5.2 Importancia de la papa	24
III MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Descripción y localización del área de trabajo	26
3.2 Cepas de <i>U. maydis</i>	26
3.3 Obtención de los medios de cultivo hechos a base de harina de maíz y papa	26
3.3.1. Medio de cultivo a base de harina de maíz (HM)	27
3.3.2. Medio de cultivo elaborado a base de papa (MP)	28
3.4. Proceso de preparación del inóculo <i>U. maydis</i>	29
3.4.1 Análisis preliminar para el tiempo de adaptación de <i>U. maydis</i> al medio de cultivo	29
3.4.2. Preparación del inóculo	30
3.4.3. Método de inoculación y crecimiento celular	31
3.5. Azúcares reductores	31
3.6 Método de reacción del yodo	32
3.7 Análisis para la caracterización de la harina de maíz y la papa.....	32
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Análisis preliminar para el tiempo de adaptación de <i>U. maydis</i> al medio de cultivo	33
4.2 Obtención de los medios de cultivo.....	34
4.2.1. Medio de cultivo en base a harina maíz (HM)	34
4.2.2. Medio de cultivo a base de papa (MP)	40
4.3 Método de inoculación y crecimiento celular.....	43
4.4 Prueba cualitativa del yodo	43
4.5 Análisis para la caracterización de la harina de maíz y papa.....	45
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
APENDICE I.....	54

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>U. maydis</i>	12
Cuadro 2. Composición proximal del Huitlacoche	19
Tabla 1. Composición nutrimental de harinas de maíz nixtamalizado y con fortificación y suplementación.....	22
Tabla 2. Composición química proximal de la papa	24
Tabla 3. Presencia de almidón en los medios de cultivo de harina de maíz y papa con mayor concentración de harina de maíz y papa	44
Tabla 4. Presencia de almidón en los medios de cultivo de harina de maíz y papa con menor concentración de materia prima	45
Tabla 5. Composición proximal de la harina de maíz y papa	46

ÍNDICE DE FIGURAS Y FOTOS

	Página
Figura 1. Fotografía microscópica de <i>U. maydis</i>	6
Figura 2. Teliospora en germinación.	7
Figura 3. Ciclo biológico del carbón del maíz producido por <i>U. maydis</i>	9
Figura 4. Curva de cinética de crecimiento celular	16
Figura 5. Huitlacoche en la parte aérea del elote	18
Figura 6. Medio de cultivo de formulación económica hecho a base de harina de maíz	28
Figura 7. Medio de formulación económica hecho a base de papa	29
Figura 8. Cámara de Neubauer	31

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de las cepas ITSON C2 e ITSON C3.....	33
Gráfica 2. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de harina de maíz en base a 100 g.....	35
Gráfica 3. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de harina de maíz en base a 100 g.....	36
Gráfica 4. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de harina de maíz en base a 10 g.....	37
Gráfica 5. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de harina de maíz en base a 10 g.....	38
Gráfica 6. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio caldo dextrosa de papa (PDB) comercial.....	39
Gráfica 7. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio caldo dextrosa de papa (PDB) comercial.....	39
Gráfica 8. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de papa en base a 200 g	40
Gráfica 9. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de papa en base a 200 g	41

Gráfica 10. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de papa en base a 20 g	41
Gráfica 11. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de papa en base a 20 g	42

RESUMEN

Ustilago maydis, es el hongo que se desarrolla en las partes aéreas de la planta de maíz (*Zea mays*) formando agallas; es el causante del carbón del maíz, también llamado huitlacoche o cuitlacoche. Este hongo es consumido desde tiempos prehispánicos, siendo un platillo exquisito. Se utiliza para preparar una gran variedad de platillos gourmet, debido a su sabor característico y a su contenido nutricional. Es muy consumido en el centro y sur del país. En el valle del Yaqui no es consumido de manera habitual, y para la mayoría de los productores de maíz ha sido siempre un problema por las pérdidas que representa.

El objetivo del trabajo es determinar las características de crecimiento de *Ustilago maydis* en dos medios de cultivo con formulación económica, para la producción de células que sirvan como inóculo para la producción masiva de huitlacoche.

La investigación se realizó en la Dirección del área de Recursos Naturales, del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), durante el período de Noviembre de 2003 a Marzo de 2004.

Se utilizaron 2 cepas de *U. maydis* ITSON C2 e ITSON C3, obtenidas de estudios anteriores. Las células fueron inoculadas en 2 diferentes medios, uno preparado a base de harina de maíz y el otro a base de papa. Se comparó con un testigo caldo dextrosa de papa (PDB). Se determinó la cinética de crecimiento y la concentración de azúcares reductores a cada medio de cultivo inoculado con el hongo. Se detectó la presencia de almidón utilizando la prueba cualitativa del

yodo. Otros aspectos a considerar fueron la medición de pH y el análisis proximal a las materias primas utilizadas.

Se determinó que *U. maydis* crece perfectamente en ambos medios, ya que cumplen con las condiciones para su óptimo desarrollo. Se observó una disminución en la concentración de azúcares reductores al ser consumidos por *U. maydis*. Los primeros medios estaban compuestos con una alta proporción de almidón; lo cual dificulta la interpretación de la cinética de crecimiento. Para ello se diluyó el medio de cultivo buscando la estabilidad de *U. maydis* y se observó un mejor aprovechamiento manifestado en las cinéticas de crecimiento, apreciándose sus fases de desarrollo (adaptación, logarítmica o exponencial, estacionaria y de muerte).

La composición de los medios de harina de maíz y de papa son adecuados para el crecimiento de *U. maydis*, ya que se observó en el análisis proximal que los componentes principales de cada uno de ellos cumple con las características nutricionales que el hongo requiere para su óptimo crecimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos conforman uno de los grupos más diversos de la naturaleza. Se calcula que existen unas 250,000 especies, entre las que pueden encontrarse variedades micro y macroscópicas (Paredes, 2001).

Actualmente se conocen en el mundo una gran diversidad de especies de hongos comestibles, de los cuales solo algunos se han cultivado, los que destacan entre los más importantes es el champiñón (*Agaricus bisporus*) y las setas (*Pleurotus ostreatus*).

Además de los mencionados un hongo que se consume desde la época prehispánica es el carbón común del maíz conocido en México como huitlacoche ó cuitlacoche; es consumido tradicionalmente como alimento o condimento. Es producido por el basidiomiceto *Ustilago maydis*, que infecta la parte aérea del maíz formando agallas en cualquiera de sus órganos; incluyendo mazorcas, espigas y hojas. El número, tamaño y localización de las agallas que produce el carbón sobre la planta, afecta el monto de las pérdidas productivas (Agrios, 1991, Banuett, 1992, Cano-Canchola *et al*, 2000).

El carbón del maíz aparece en cualquier lugar que se cultive esta planta. Sin embargo, aparece con mayor frecuencia en las áreas cálidas y moderadamente secas, donde ocasiona daños graves en las variedades susceptibles (Agrios, 1991).

Generalmente se recolecta la agalla en forma manual y se vende en estado fresco, aunque ahora también se comercializa envasado, deshidratado, liofilizado y en menor medida como extracto; existe una buena cantidad de formas para la preparación culinaria de este hongo (Paredes, 2001).

Las pérdidas debidas al carbón del maíz *U. maydis*, varían ampliamente de una localidad a otra y puede ir desde un valor característico hasta un 10 % o más en áreas localizadas. Algunos campos de maíz dulce pueden mostrar pérdidas, que se aproximan a un 100%, ocasionada por dicha enfermedad (Agrios, 1991).

La producción de huitlacoche se da mayormente al sur del país, pero hoy en día está tomando importancia en el norte; principalmente en el Valle del Yaqui, donde se han realizado una serie de investigaciones con gran éxito.

En la actualidad el carbón común ha causado gran expectativa, ya que es un alimento de suma importancia por su valor nutricional y más que una pérdida, es una elección económica y alimentaria. Debido a esto, el aumento en su producción y rendimiento podría considerarse una prioridad para obtener alimento de contenido proteico para la población. De ahí la importancia de obtener y propagar este hongo a bajos costos en medios económicos y de fácil adquisición; lo cual se traduciría en un producto más económico tanto para el productor como para el consumidor.

1.1 Justificación

La presente investigación, busca contribuir en la obtención de huitlacoche, en grandes cantidades y de una manera económica. El hongo *U. maydis* es precursor para la formación de las agallas, por lo que requiere de cuidados para su producción masiva a nivel laboratorio.

Al producir huitlacoche por inoculación artificial, se requiere una gran cantidad de hongo, el cual tiene que ser inoculado a la planta por lo que necesita desarrollarse en un medio de cultivo, este medio de cultivo comercial es costoso. El poder sustituir el medio comercial por uno de bajo costo formulado en el laboratorio, ayudaría a los productores a disminuir costos de producción.

1.2 Planteamiento del problema

En México, se está dando mucha importancia a la producción de huitlacoche, esto debido al valor alimentario y su sabor característico. Actualmente la demanda de este hongo ha aumentado considerablemente, tanto en ámbito nacional como internacional, es por eso que se busca una manera más económica y factible para obtenerlo. Si se quiere producir a gran escala es necesario tomar en cuenta cómo y cuánto se va a producir, cuáles son las condiciones que se requieren para obtener gran cantidad de inóculo y de qué forma va ser introducido al jilote.

El medio de cultivo es de gran importancia ya que debe de cumplir con las condiciones y características que el hongo prefiere para su reproducción. El caldo dextrosa de papa comercial ha sido utilizado por mucho tiempo para reproducir *U. maydis*. Sin embargo, a una producción a gran escala, este medio de cultivo resultaría muy costoso. Es así que se trata de buscar la manera de sustituir el medio comercial por uno más económico.

1.3 Objetivos

A. Objetivo general

Determinar las características de crecimiento de *Ustilago maydis* en dos medios de formulación económica, para la producción masiva de células como inóculo para la producción de huitlacoche.

B. Objetivos específicos

- Elaborar un medio económico a base de harina de maíz.
- Elaborar un medio económico a base de papa.
- Determinar una cinética de crecimiento de la cepa ITSON C2 e ITSON C3, en los medios de cultivo de harina de maíz y papa.

1.4 Hipótesis

Los medios de cultivo formulados a partir de papa y harina de maíz aportan los nutrientes necesarios para la producción de inóculo de *U. maydis*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ustilago maydis*

En la taxonomía tradicional, los hongos estaban clasificados dentro del reino de las plantas: sin embargo, Whittaker, 1969, (citado por Paredes, 2000) los separó en un nuevo reino, el reino *Mycetea*, debido a que presenta muchas diferencias con respecto a las plantas. Son organismos heterotróficos que viven como parásitos, simbioses o saprófitos. Además de ser eucariontes sin clorofila, se producen en forma sexual y asexual; son pluricelulares de aspecto filamentoso y sus células se encuentran típicamente rodeadas de una pared que contiene quitina y/o celulosa (Paredes, 2000).

Los *Ustilaginales* constituyen un grupo de patógenos importantes para las plantas, ya que producen una gran variedad de enfermedades en monocotiledóneas alrededor del mundo. Estos patógenos tienen el potencial de causar daños severos a la semilla y la planta a pesar del tratamiento químico, de la existencia de cultivares altamente resistentes y de los diversos métodos de arado empleados. De todos los *Ustilaginales*, *Ustilago maydis* es el miembro mejor conocido del grupo. Es un patógeno específico para el Maíz (*Zea mays*) y Teosinte (*Zea mexicana*), este último es considerado el ancestro del maíz que se cultiva en la actualidad (Ruiz y Martínez, 1998).

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno, denominado suciedad del cuervo o carbón común. *U. maydis* existe en forma haploide no patogénica, y como dicariótico patogénico resultado de la fusión de dos células haploide compatibles

(en la figura 1 se presenta *U. maydis* al observarse microscópicamente). Después de la infección de la planta, inducen la formación de los tumores en los cuales las hifas fúngicas distinguen y generan esporas diploides. Estas dos formas llevan a cabo diferentes funciones durante el ciclo de vida de *U. maydis* (Kämper, 2003, Banuett y Herskowitz, 1988).

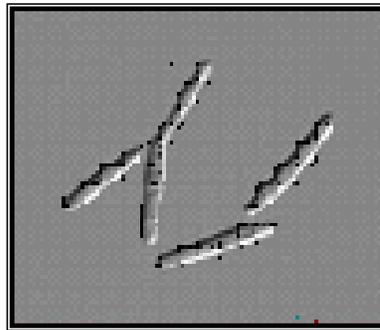


Fig. 1 Fotografía microscópica de *Ustilago maydis*
http://www.broad.mit.edu/annotation/funqi/ustilago_maydis/

2.1.1 Ciclo de vida

Ustilago maydis presenta un ciclo de vida complejo, el cual requiere de su hospedero para poder llevar a cabo la infección y reproducirse.

El hongo produce un micelio dicariótico, cuyas células se transforman en teliosporas, negras, esféricas o elipsoidales que presentan protuberancias prominentes y en forma de espina. Estas teliosporas germinan produciendo un basidio de cuatro células (el promicelio), cada una de las cuales se transforman en una basidiospora halina, ovalada y nucleada (Ruiz, 1999). En la figura 2 se presenta la teliospora en germinación.

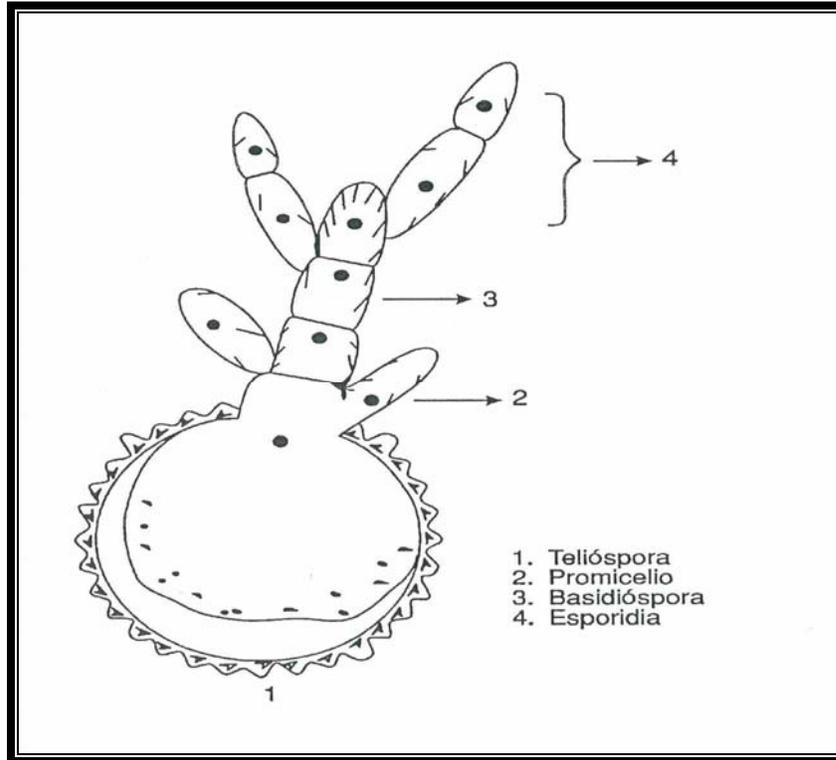


Fig. 2 Teliospora en germinación. Álvarez, 1999.

Este hongo hemibasidiomiceto muestra un ciclo de vida complejo, requiriendo de la planta para poder completarlo. En su estado saprofitico el hongo crece en forma de levaduras haploides (esporidias). Las esporidias de tipos de apareamiento diferente (también denominados como sexo) se fusionan, dando origen a la fase dicariótica la cual es la forma infectiva. *Ustilago maydis* crece como micelio en los tejidos del hospedante; éste eventualmente se septa y forma las teliosporas. La cariogamia ocurre en este punto. Millones de teliosporas llenan las agallas características de la enfermedad, las cuales son depositadas en el suelo. Después de la germinación que da lugar a una estructura denominada promicelio, ocurren la meiosis y la mitosis, dando origen a la basidiosporas. Las basidiosporas o esporidias se reproducen por gemación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida (Martínez y Ruiz, 1998).

La resistencia del anfitrión, es el método más eficiente para controlar el carbón común. La resistencia ha sido otorgada al maíz del campo. El maíz dulce es menos resistente que el maíz común, probablemente a menos cuidados de los creadores de maíz dulce a quitar líneas sintomáticas, y debido a una carencia de la resistencia en el plasma del germen del cual se derivan los híbridos modernos del maíz dulce (Toit y Pataky, 1999).

El ciclo de vida de *Ustilago maydis* es corto y se pueden producir teliosporas en plantas que no han alcanzado la madurez sexual. El tiempo requerido para inocular plantas y obtener progenie haploide es aproximadamente de tres semanas (Banuett y Herkowitz, 1998). El ciclo de vida de *U. maydis* se presenta e la figura 3.

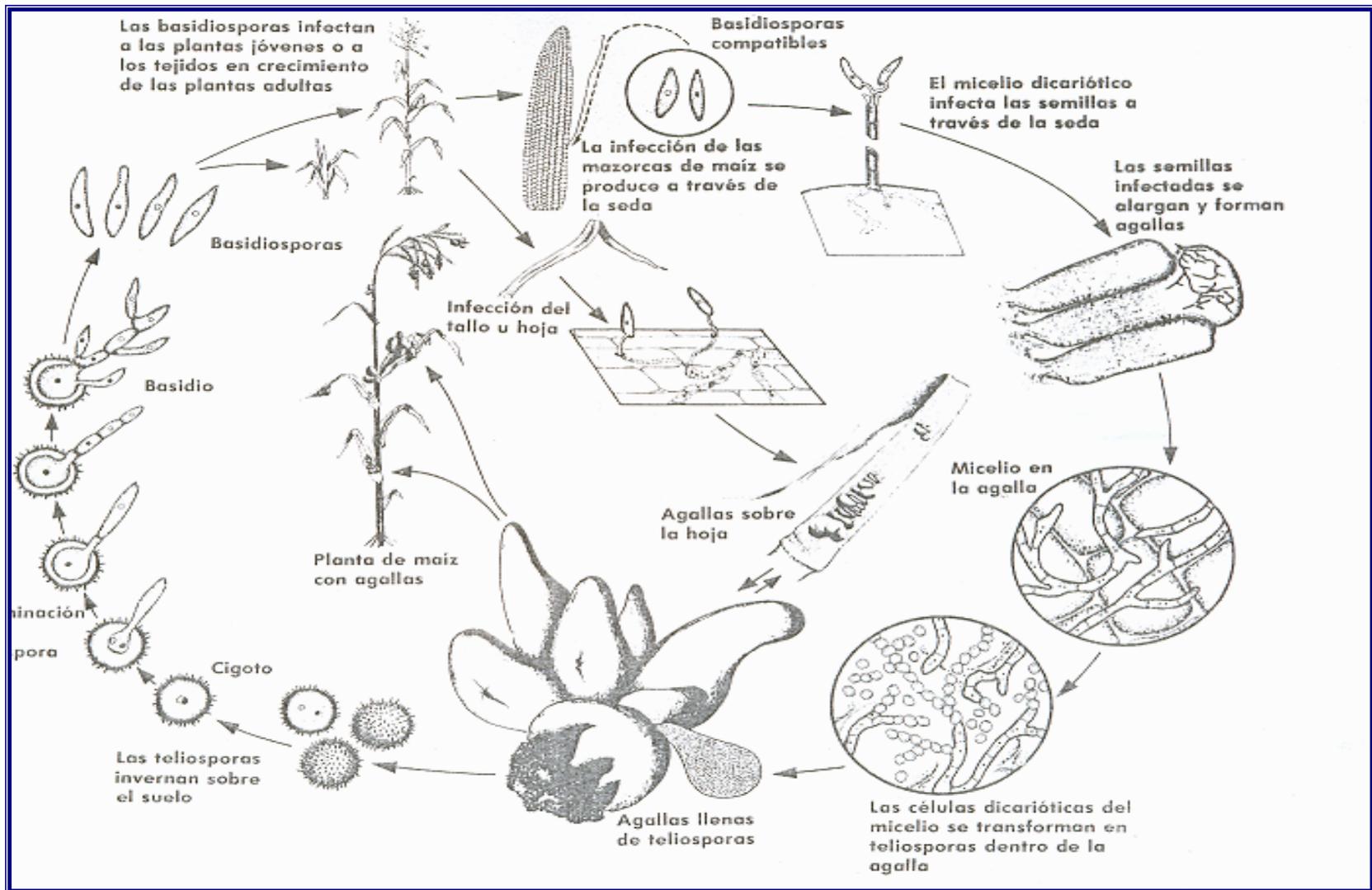


Fig. 3. Ciclo biológico del carbón del maíz producido por *Ustilago maydis*. (Agrios, 1991).

2.1.2 Síntomas de infección

La infección por *Ustilago maydis* produce cambios morfológicos en la planta de maíz y todas las partes aéreas, particularmente los tejidos en crecimiento activo o meristemáticos son susceptibles a la infección. La infección desarrollada no es sistemática sino localizada, aunque se enfoca en centros de actividad meristemática, también se desarrolla clorosis en zonas de la planta donde hay micelio, atribuyéndose esto, a la producción de algún tipo de toxina por parte del hongo que puede ser distribuida por el sistema vascular de la planta (Ruiz y Castro, 2002).

Una planta de maíz puede ser infectada por el hongo en cualquier tiempo de los niveles tempranos de desarrollo de la planta, temporadas calientes o secas con una lluvia ocasional favorece el crecimiento de la suciedad del maíz. La suciedad florece y forma agallas, las cuales se pueden desarrollar en cualquier parte aérea de la planta, donde el patógeno encuentra tejido meristemático (Kealey y Kosikowski, 1981).

Ustilago maydis, es un ejemplo de cómo algunos parásitos pueden adaptarse perfectamente a sus huéspedes. *U. maydis* es el causante de la enfermedad del maíz; donde se ha observado que si hay uno hay otro o varios; para muchos agricultores es pérdida económica y es por esa razón que se busca la manera de erradicar el hongo de algunos cultivos, por lo que han creado algunos mecanismos de defensa para esta enfermedad, pero sin el maíz *U. maydis* no podría llevar a cabo su ciclo de vida, entonces este no afectaría a su huésped (Kahmann, 2002).

Kahmann, 2002, menciona que aunque la agalla producida por *Ustilago maydis* es comestible tiene poco significado económico, como parásito es sin embargo uno de los organismos modelo más importantes de la fitopatología molecular. El hongo es fácil de cultivar y de investigar en el laboratorio y en invernadero. Se

puede realizar una amplia gama de experimentos en algunas semanas con *U. maydis*, que tomarían meses con otros hongos, También dice que la interrelación del patógeno con la planta, asume que mucho de lo que se aprende con *Ustilago maydis*, también se puede aplicar a otras enfermedades fúngicas que sean más difíciles de estudiar.

2.1.3 Taxonomía

Whittaker en 1969, (citado por Ulloa, 2002), menciona que la posición taxonómica del hongo *Ustilago maydis* pertenece a la división Amastigomycota, que es la correspondiente a los hongos verdaderos y a la subdivisión Basidiomycotina caracterizada por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios. Corresponden a los Basidiomycetes, en donde las esporas sexuales, al germinar, se forman externamente sobre una estructura denominada basidio constituida por una o cuatro células de tipo levaduriformes, capaces de desarrollarse en medios de cultivo; por lo que presumiblemente estos hongos son capaces de vivir como saprófitos en la naturaleza. En el Cuadro 1 se presenta la taxonomía y clasificación de *Ustilago maydis* según Ainsworth (citado por Paredes y Valverde, 1999).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Ustilago maydis*

TAXÓN	CARACTERÍSTICAS
División Amastigomycota	Hongos que perdieron el estado móvil. No se adaptan a sistemas acuáticos. Producen mucho micelio. Hifas septadas o aseptadas.
Subdivisión Basidiomycotina	Producen basidios y basidiosporas Estado diploide muy corto (basidio). Estado dicariótico muy prolongado.
Clase Teliomycetes	No forman basidiocarpo. Forman esporas de resistencia con pared gruesa. Las esporas están en grupos (soros). Hongos conocidos comúnmente como carbones. Parásitos de plantas.
Orden Ustilaginales	Atrapan principalmente las estructuras reproductoras. Producen poco micelio. Promicelio septado transversalmente. Basidiosporas terminales y transversales. Soros con teliosporas café oscuro o negras
Género <i>Ustilago</i>	Esporas lisas, con espinas o reticuladas.
Especies <i>maydis</i>	Ataca al maíz y al teocinte.

Ainswoth, 1973, (citado por Paredes y Valverde, 1999).

2.2 Cinética de crecimiento

Es importante conocer la cinética de crecimiento de un cultivo microbiano porque es necesario poder predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo se va a ir consumiendo el sustrato por los microorganismos y cómo aumentan estos.

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para generar nuevos microorganismos.

El crecimiento de los microorganismos es una parte integral de casi todos los procesos de fermentación. Los hongos crecen por extensión de las hifas y la morfología de su micelio puede variar en función del medio ambiente. Cuando un hongo crece en la superficie de un medio sólido produce una red micleana, cuya naturaleza refleja la composición del medio. En los cultivos sumergidos, las células fúngicas pueden crecer unidas a partículas de nutrientes suspendidas en forma de micelios filamentosos difusos o como masas densas. La morfología del crecimiento influye invariablemente en la velocidad del crecimiento y en la formación de productos. Debido a las limitaciones de difusión de nutrientes y productos dentro de las masas fúngicas, el crecimiento y el metabolismo se producen predominante en la periferia de éstas (Ward, 1991).

Una fermentación discontinua (batch) puede ser considerada como un “sistema cerrado”, donde se lleva a cabo una cinética de crecimiento. A un tiempo cero $t=0$, la solución esterilizada de nutrientes se inócula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la inoculación en condiciones óptimas de fermentación. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células. Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos y su cultivo en condiciones fisiológicas, se observan

cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte, (para ver la representación gráfica de la cinética de crecimiento ver figura 4) (Crueger, 1993).

2.2.1 Fase de latencia

Cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo, normalmente no se produce un aumento inmediato del número de células y por ello, este período se denomina fase de latencia. La célula se adapta al medio de cultivo, tras un cierto periodo de tiempo; consumiendo poco a poco los nutrientes menos complejos.

La duración de esta fase varía considerablemente según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio. Esta fase puede ser bastante larga si el inóculo procede de un cultivo viejo o de uno que haya sido refrigerado. La inoculación de un cultivo en otro químicamente diferente provoca también una fase de latencia mayor. Por otra parte, cuando se transfiere un cultivo en fase de crecimiento exponencial vigoroso a un medio nuevo de la misma composición, la fase de latencia se acorta o no se produce (Prescott, *et al*, 1999).

2.2.2 Fase logarítmica o exponencial

El crecimiento de la masa celular puede ahora ser descrito cuantitativamente en función de la duplicación del número de células por unidad de tiempo (levaduras y bacterias) o por la duplicación de la biomasa por unidad de tiempo (organismos filamentosos como estreptomicetos y hongos). Representando el número de células o la biomasa frente al tiempo en una gráfica semilogarítmica se obtiene una línea recta, de ahí el nombre de “fase logarítmica” (Crueger, 1993, Ward, 1991).

Aunque las células alteran el medio debido a la toma de sustratos y a la secreción de productos metabólicos, la velocidad de crecimiento permanece constante durante la fase logarítmica. La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato en tanto que exista exceso de sustrato (Crueger, 1993).

2.2.3 Fase estacionaria

Tan pronto como el sustrato es metabolizado o se han formado sustancias tóxicas, el crecimiento se detiene completamente. La biomasa aumenta sólo gradualmente o permanece constante. Durante esta fase estacionaria, no hay incremento neto (o decremento) del número de células. Sin embargo, aunque en esta fase no tiene lugar crecimiento, todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos organismos puede incluso tener lugar crecimiento lento durante la fase estacionaria; algunas células crecen y otras mueren, siendo el balance total de ausencia de incremento en el número de células (Madigan *et al*, 2000, Crueger, 1993).

2.2.4 Fase de muerte

En esta fase las reservas de energía de las células se agotan. Cuando se representan en forma semilogarítmica los supervivientes frente al tiempo, puede ser obtenida una línea recta, lo que indica que las células mueren a una velocidad exponencial. La longitud de tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del organismo y del proceso utilizado (Crueger, 1993).

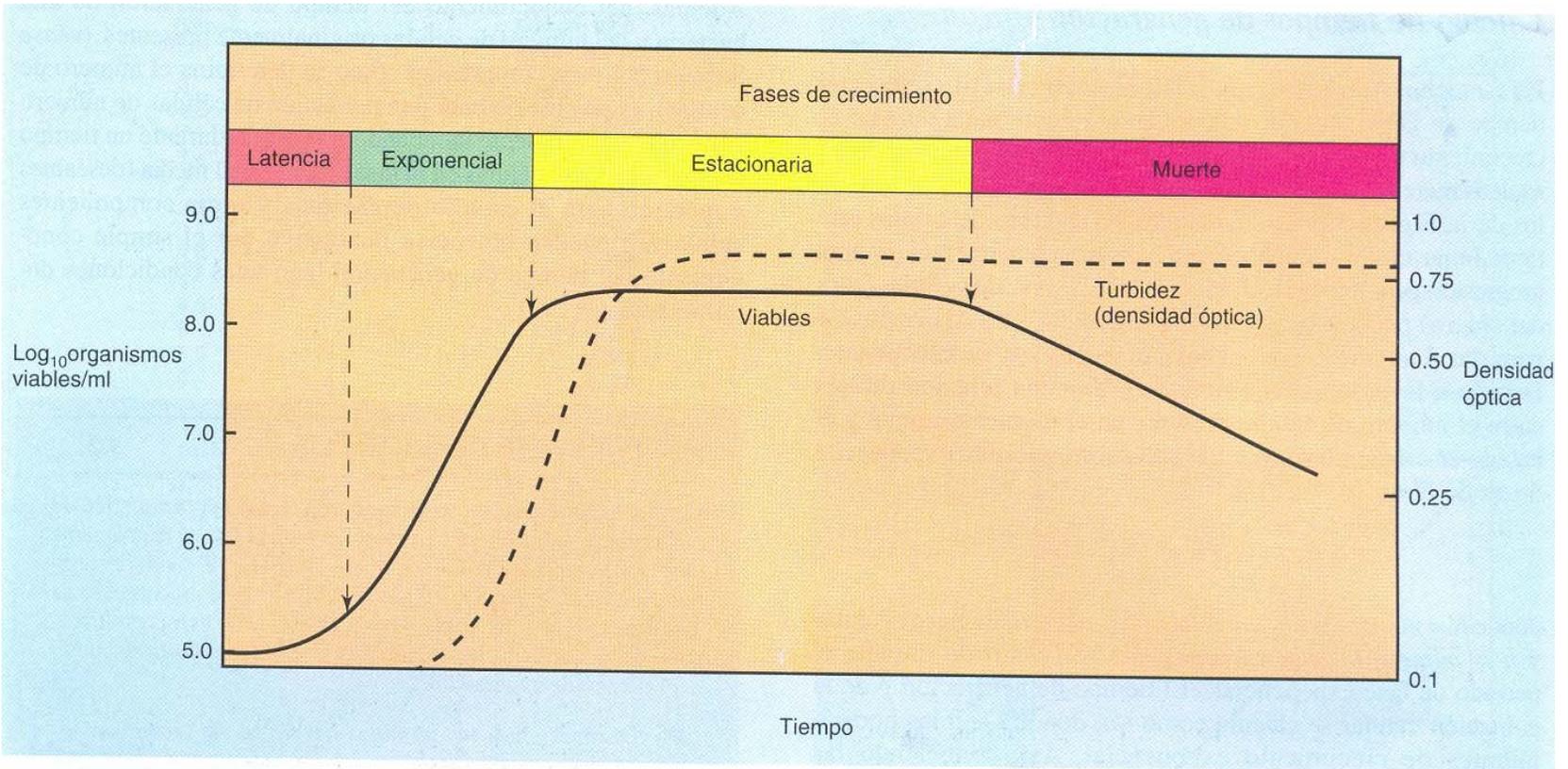


Figura 4. Curva de cinética de crescimento celular.

(Madigan *et al*, 2000).

2.3 Huitlacoche

El carbón común del maíz (*Zea mays*), se conoce en México como Huitlacoche y se ha consumido tradicionalmente como alimento o condimento desde tiempos prehispánicos. Actualmente la demanda de este hongo ha aumentado considerablemente, tanto en el ámbito nacional como internacional.

El huitlacoche como alimento típico mexicano, debe su creciente popularidad a su sabor característico, que no se parece a ningún otro alimento conocido (Paredes y Valverde, 1999).

El carbón común o huitlacoche del maíz aparece donde quiera que se cultive esta planta, presentándose con mayor frecuencia en las áreas cálidas y moderadamente secas. Cuando las plantas jóvenes (plántulas) del maíz son infectadas por el hongo, sobre sus hojas y tallos aparecen diminutas agallas, de ahí que dichas plántulas pueden permanecer achaparradas o incluso pueden ser destruidas por el patógeno (Agrios, 1991). La manifestación de la agalla en la parte aérea del elote se presenta en la figura 5.



Fig. 5. Huitlacoche en la parte aérea del elote (Kahmann, 2002)

2.3.1 Características alimentarias

En el cuadro 2 se puede observar que el huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas que contribuyen a su valor nutricional. Se considera que el huitlacoche contiene proteínas de muy buena calidad, la cual es superior a la de las proteínas del maíz y de otros vegetales. El contenido de carbohidratos y fibra es muy alto, pero contiene poca grasa, por lo que se le considera un alimento bajo en calorías. No obstante, contiene gran cantidad de ácido linoléico, el cual es esencial para la nutrición humana (Paredes, *et al*, 2000).

Lo que es más interesante desde el punto de vista nutricional, es que la proteína del huitlacoche contiene un balance de aminoácidos esenciales adecuado. Las proteínas del huitlacoche contienen cantidades apropiadas de todos los aminoácidos esenciales para la dieta de un adulto; pero es deficiente en isoleucina, leucina, treonina y aminoácidos azufrados para la dieta de niños. Se considera, por

lo tanto, que el huitlacoche contiene proteínas de muy buena calidad, con un alto contenido de lisina (6.6 g/100 g proteína); el cual es muy elevado en relación a lo que se ha reportado para el maíz y otros vegetales. Vale la pena notar que el aminoácido lisina, es el componente esencial de las proteínas deficiente por excelencia en el maíz. Es decir, es un inteligente acierto nutricional la complementación histórica que han hecho las distintas culturas mexicanas al consumir huitlacoche con tortilla (Paredes y Valverde, 1999).

Cuadro 2. Composición proximal del Huitlacoche.

Componente	g/100g de base seca
Proteínas	2.3 – 7.4
Grasas	1 – 2
Cenizas	1 – 4.2
Fibra	7.5 – 26.6
Carbohidratos	53 – 65

(Paredes y Valverde, 1999)

2.4 El maíz (*Zea mays L.*)

La evidencia arqueológica indica que el maíz existió en América en forma silvestre hace 8,000 años. Dos mil años después este cereal jugaba un papel vital en el desarrollo de las grandes civilizaciones que se establecieron en América, particularmente la Azteca y la Maya; primero, por la decisión de utilizar la cal para cocer el grano, que incrementó el mensaje nutritivo del maíz en la alimentación y segundo por la importancia de este cultivo en términos de las calorías aportadas a la dieta (Paredes *et al*, 2000).

El maíz (*Zea mays L.*) actual, es una planta de alta productividad ya que una sola semilla puede producir de 600 a 1000 granos. Su estructura muy especializada entraña la pérdida en el letargo de numerosas potencialidades características de otros cereales, tal como el ahijamiento y el desarrollo de espigas suplementarias,

que le privan de la capacidad de poder regular y compensar su densidad de establecimiento (López, 1991).

La planta de maíz es una gramínea anual, *Zea mays.*, y su grano es el que alcanza la mayor producción en el mundo. En México es el cultivo más importante por área sembrada (más de siete millones de hectáreas en el 2001) y el segundo en términos de producción gruesa (18.6 millones de toneladas en el 2001, incluyendo un millón de hectáreas de maíz híbrido). México es el centro de origen y diversidad de las razas de maíz, con más de 60 razas reconocidas hasta ahora y muchas más sub-razas y variedades locales. En México también crecen varios de los teosintes, parientes silvestres del maíz, entre los cuales se encuentra el ancestro putativo del maíz y el teosinte perenne. Varios de estos teosintes y razas de maíz se encuentran en peligro de extinción por cambios de uso del suelo recientes y degradación ambiental general (Álvarez, 2003)

2.4.1 Importancia del maíz

El maíz ha sido base de la alimentación en México desde tiempo prehispánicos. Actualmente es la principal fuente de calorías y proteínas para los habitantes de las zonas rurales, quienes representan los estratos sociales más pobres. En las zonas urbanas, el patrón de consumo ha cambiado en cierto grado, en parte por la disponibilidad de mayores recursos económicos y en parte por la oferta de otros productos alimenticios. Sin embargo la mayoría de los mexicanos consumen maíz; la cantidad esta en función del ingreso y de la zona geográfica donde viva (Paredes, *et al*, 2000).

El maíz actualmente es el tercer cultivo en importancia en el mundo por su volumen de producción, después del arroz y el trigo. Los últimos cinco años se han producido anualmente poco más de 550 millones de toneladas de maíz en grano, siendo los principales países productores los Estados Unidos, China, Brasil

y la Unión Europea con una participación del 40%, 20%, 6% y 5% respectivamente. La misma fuente señala que por lo menos en 18 países se consume el maíz como principal alimento, y si se considera su consumo directo total, de manera conservadora podría estimarse que al menos una cuarta parte de la población mundial mantiene al maíz como alimento habitual (Escobar, 2002).

2.4.2 Harina de maíz

La industria de harina de maíz nixtamalizado en el país data de 1949, año en que inició sus actividades el grupo industrial Molinos Azteca, S.A.; en 1951 Maíz Industrializado, S.A. (MINSIA) registró la primera patente para la producción de esta harina, la cual fue desarrollada por el Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas (IMIT) (Flores *et al*, 1996).

Actualmente en el país se procesan más de 200, 000 toneladas de harina nixtamalizada por mes, lo que representa un consumo anual de 2 millones 400 mil toneladas. De cada diez tortillas consumidas en México, tres o cuatro provienen de harinas nixtamalizadas. MASECA, la principal empresa productora de harina de maíz en México y en el mundo, cuenta con 17 plantas en el país y abastece el 70% de la demanda nacional y el 32% de las materias primas que consume la industria de la tortilla (SAGAR, 2000).

El consorcio MASECA preparó una harina fortificada/suplementada mezclando 93.5 % de harina de masa seca con 6 % de harina de soya desgranada y 0.5 % de una mezcla que contiene las vitaminas A, B1, B2, niacina, ácido fólico y hierro. Con la excepción del ácido fólico y el hierro, estos micronutrientes fueron añadidos en cantidades tales que aportan entre un 50 y un 75.5 de los recomendados diarios. Además la mezcla de vitaminas y minerales proveen de un 130% y de un 100% de los requerimientos de ácido fólico y hierro, respectivamente (Paredes *et al*, 2000). Para ver la composición química de la harina de maíz ver la tabla 1.

Tabla 1. Composición nutrimental de harinas de maíz nixtamalizadas, con y sin fortificación y suplementación.

Composición química (%)	Normal	Fortificada/ suplementada
Humedad	10.4	10.4
Proteína	8.4	10.5
Lípidos	1.7	1.9
Fibra cruda	4.5	7.1
Cenizas	1.2	1.4
Almidón	73.8	68.7
Aminoácidos (%)		
Fenilalanina	0.41	0.50
Histidina	0.28	0.31
Isoleucina	0.29	0.38
Leucina	1.12	1.17
Lisina	0.25	0.39
Metionina	0.19	0.23
Treonina	0.32	0.38
Trptófano	0.034	0.041
Valina	0.40	0.49
Minerales		
Calcio ^a	106	98
Fósforo ^a	285	290
Hierro ^b	11.5	44.5
Magnesio ^a	102	111
Potasio ^b	315	440
Sodio ^b	325	295
Zinc ^b	20.5	22.5
Cobre ^b	1.0	1.0
Manganeso ^b	5.5	7.0
Vitaminas (mg/100g)		
Vitamina A		NI ^c
Tiamina (B1)	0.36	0.89
riboflavina (B2)	0.11	0.38
Niacina (B3)	1.33	4.17

Bressani *et al*, 1997, (citado por Paredes, 2000)

^a mg/100g; ^b ppm, ^c No se indica la cantidad

2.5 La papa (*Solanum tuberosum* L.)

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cultivo mas importante, después de los cereales, en la alimentación humana; supera al trigo (*Triticum aestivum* L.) arroz (*Orizasativa* L.) y maíz (*Zea mays* L,) en producción de materia seca y de proteína por unidad de área. En México, la papa ocupa el segundo lugar en el volumen de la producción hortícola, después del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), con cerca de 1.17 millones de toneladas anuales, en una superficie de 61 551 ha (Romero-Lima *et al*, 2000).

2.5.1 Composición química de la papa.

Dentro de los componentes nutritivos el que se encuentra en mayoría es el agua que constituye en torno al 80% del total. Le siguen los hidratos de carbono, proteínas, celulosa, cenizas y grasa respectivamente. Las vitaminas como parte esencial en todo alimento también se encuentran presentes en pequeñas cantidades. La composición química se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición química y proximal de la papa.

Agua	75.77 %
Cenizas	1.23 %
Hidratos de carbono	19.83 %
Proteínas	1.56 %
Grasas	0.25 %
Celulosa	1.34 %
Vitamina C	10 – 40 mg/100g
Vitamina A	0
Vitamina B1	100 mg/100g
Vitamina B2	30 mg/100g
Calcio	8 mg/100g
Fósforo	56 mg/100g
Hierro	0.7 mg/100g
Valor energético	72 – 80 mg/100g

(Balderrama, 2002).

2.5.2 Importancia de la papa

La papa es una de las principales hortalizas producidas en México. En 1998 se cosecharon 1.27 millones de toneladas en una superficie de 63,000 ha. El rendimiento promedio nacional fue de 20.2 t/ha. México tiene un consumo anual promedio de papa de 12 Kg. por habitante, el más bajo en América Latina y mucho menor que el consumo promedio en Europa, que es de 86 Kg. por persona. Pero es tal vez el crecimiento de la población el principal factor que explicaría el incremento en la producción que se ha observado en las décadas recientes, y en menor medida, el cambio en los patrones de consumo, con la inclusión de mayores cantidades de papa en la dieta mexicana (García y Santiago, 2001).

Los usos de la papa son múltiples, tanto como producto fresco como industrializado, convirtiéndose en uno de los alimentos más versátiles y generalizados. Debido a su composición nutricional, se industrializa para alimento humano, dando origen a una gran variedad y cantidad de productos procesados, como los congelados, deshidratados, enlatados, licores, etc. La papa también se utiliza para la obtención industrial de almidón, dextrinas, glucosa y otros productos, así como también para la alimentación animal (Robinsón, 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción y localización del área de trabajo

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Dirección y Estudios de Posgrado (DIEP) del Instituto Tecnológico de Sonora, Localizado en Ciudad Obregón Sonora. En un periodo de Noviembre de 2003 a Marzo de 2004.

3.2 Cepas de *U. maydis*

Se obtuvo el inóculo a partir de una cepa pura de *Ustilago maydis* ITSON C2 e ITSON C3 (obtenidas del laboratorio de Biotecnología Ambiental, del área de Recursos Naturales en el Instituto Tecnológico de Sonora).

3.3 Obtención de los medios de cultivo hechos a base de harina de maíz y papa.

Los medios de cultivo de harina de maíz y papa, se formularon con base a materia prima económica. El de maíz se preparó con harina de maíz obtenida de un supermercado. El de papa se preparó con papa fresca obtenida de un supermercado. La formulación de estos medios se basaron en que cumpliera con las características nutricionales que el hongo *U. maydis* requiere para su óptimo crecimiento. Ya que el hongo crece en el medio comercial caldo dextrosa de papa (PDB) y principalmente en el maíz que es donde mejor se desarrolla.

Se prepararon los medios de cultivo a nivel laboratorio, para inocular el *U. maydis*, los cuales requirieron de materias primas económicas. Estos se realizaron en matraz Erlenmeyer de 1 litro, marca KIMAX y matraz volumétrico de 1 litro marca KIMAX.

3.3.1 Medio de cultivo en base a harina maíz (HM)

- a. Se pesaron 100 g* de harina de maíz MASECA (*balanza granataria, Sartorius, handy)
- b. Se agregó 750 ml de agua destilada,
- c. Se agregó 0.5g de la enzima BNZ*700 (que es una mezcla de proteasas y carbohidrasas bacterianas; provenientes de *Bacillus subtilis*, var.)
- d. Se adiciona 20 g de azúcar morena
- e. se coloca todo en un matraz Erlenmeyer de 1L
 - 1) Llevar a 50° C en 20 minutos
 - 2) Mantenerlo a 50° C por 10 minutos
 - 3) Calentar de 50° C a 72° C en 15 minutos
 - 4) Mantenerlo a 72 ° C por 10 minutos
 - 5) Subir la temperatura de 72 ° C a ebullición en 20 minutos
- f. Dejar enfriar
- g. Finalmente se centrifuga (centrifuga, HERMLE Z513K) a 3500 rpm durante 15 minutos, y se obtiene el líquido por decantación.
- h. Se colocaron 100 ml del medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Una vez preparado el medio se esterilizó por 15 minutos a una presión de 15 lb/in², en autoclave. En la figura 6 se presenta el medio de cultivo elaborado a base de harina de maíz.



Fig. 6 Medio de cultivo de formulación económica hecho a base de harina de maíz (HM).

Para los siguientes experimentos se cambió la composición del medio, en lugar de 100 g se agregó 10 g de harina de maíz. Los demás componentes se mantuvieron iguales.

3.3.2 Medio de cultivo a base de papa (MP)

- a. Se pesaron 200g de papa (cruda) en trozos pequeños (aproximadamente 1cm * 1cm), se puso a hervir en 250 ml de agua destilada por 10 minutos, posteriormente, el extracto obtenido se agregó a un matraz volumétrico de 1L
- b. Seguidamente se agregaron 20 g de azúcar
- c. 0.2g de CaCO_3 (carbonato de calcio)
- d. 0.2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- e. y se aforó a un 1L
- f. se colocaron 100 ml del medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 al.

Una vez preparado el medio se esterilizó por 15 minutos a una presión de 15 lb/in², en autoclave. En la figura 7 se presenta el medio de cultivo elaborado a base de papa.



Fig. 7 Medio de cultivo de formulación económica hecho a base de papa (MP).

Para las dos últimas repeticiones de los experimentos se cambió la composición del medio, en lugar de 200 g se agregó 20 g de papa y en lugar de 20 g de azúcar se agregó 2 g, siendo una relación de 10. Los demás componentes se mantuvieron iguales.

3.4 Proceso de preparación del inóculo *U. maydis*

3.4.1 Análisis preliminar para el tiempo de adaptación de *U. maydis* a los medios de cultivo

Con el fin de saber el tiempo en que *U. maydis* se adapta al medio de cultivo, preparado con harina de maíz y papa se realizó una prueba preliminar de cinética de crecimiento. Se inocularon 0.5 ml de las cepas ITSON C2 y C3 a cada medio

de cultivo preparado. Se realizó conteo celular (cámara de Neubauer) cada 4 horas por 12 horas y cada 6 horas por 12 horas hasta que se cumplieron 36 horas. Esto con el fin de observar el tiempo de adaptación del inóculo, que fue preparado con anterioridad, inoculándose una asada de la cepa ITSON C2 y C3 a 10 ml de caldo dextrosa de papa (PDB), el cual se incubó por 24 horas (Incubadora, Shel-Lab, modelo 1525).

3.4.2 Preparación del inóculo

Las cepas C2 y C3 se inocularon con una asada en tubos con 10 ml de caldo dextrosa de papa (PDB) de la marca DIFCO, elaborado según indicaciones del fabricante. Se pusieron a incubar (Incubadora, Shel-Lab, modelo 1525) por 24 horas a temperatura de 28 ± 2 °C. Se procedió hacer el conteo de células viables con el objetivo de preparar el inóculo en las mismas condiciones y en la concentración apropiada, y a la vez para asegurar la viabilidad de las células. A este cultivo de células se le determinó la concentración, mediante conteo de células con la ayuda de la Cámara de Neubauer (Neubauer IMPROVED bright-Line, MARIENFELD), para obtener el inóculo inicial de 10^6 . La concentración se determinó mediante la fórmula: (células/ml) = 10000 (X/4). Al agregarse al sustrato de 100 ml cambia su concentración mediante:

$$\text{Concentración inicial}^*(\text{ml de inóculo}) = \text{Cel} / 100\text{ml}$$

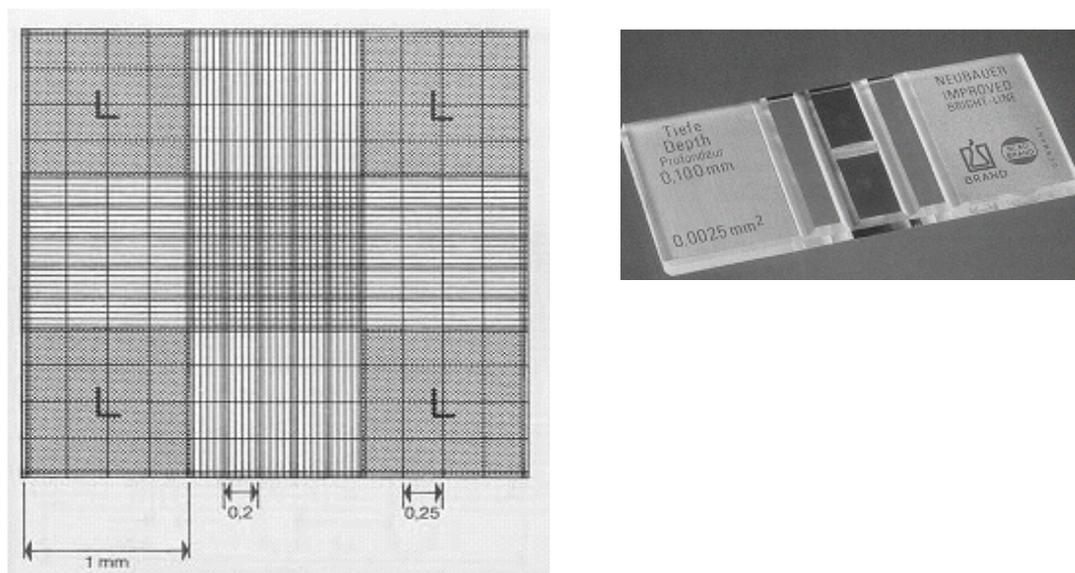


Fig. 8. Cámara de Neubauer

http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/imagenes_de_neubauer.htm

3.4.3 Método de inoculación y crecimiento celular

Se agregó 0.5 ml de inóculo a los matraces (matraz Erlenmeyer de 250 ml, por duplicado) que contenían 100 ml de sustrato (harina de maíz¹ y caldo dextrosa de papa²) estéril (Autoclave Felisa), los cuales se pusieron en baño maría con agitación (Shaker Bath, LAB-LINE) a 200 rpm, a 28 ° C, por 72 horas. Posteriormente a las 12 horas se obtuvo la primera muestra para llevar a cabo el conteo celular en la cámara de Neubauer, con la ayuda del microscopio (Microscopio Invertido ZEISS, Axiovert 135).

3.5 Azúcares reductores

Se determinaron azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959, citado por Navarro, 1992). Para ver metodología ver apéndice I.

3.6 Método de reacción del yodo

Llenar un tubo de prueba de 15 mm de diámetro con muestra, dejando 2.5 cm libres. Cuidadosamente adicionar gota a gota I_2 al 0.02N hasta formar una capa entre la muestra y el I_2 observar de inmediato por luz transmitida, y color desarrollado en la interfase. Color azul indica la presencia de almidón (AOAC Official Method 935.24. Starch (Unconverted) in beer).

3.7 Análisis para la caracterización de la harina de maíz y la papa

Con el fin de determinar las características y contenido de compuestos nutricionales de la harina de maíz y la papa. Se realizó análisis proximal a las muestras de harina de maíz y papa, de acuerdo al manual utilizado en el Laboratorio de Análisis de Aguas del Instituto Tecnológico de Sonora (Standard methods for the Examination of water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 19ed., New York, 1995. pp 4-65 a 4-69. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. United States Environmental Protection Agency. Cincinnati, 1993.).

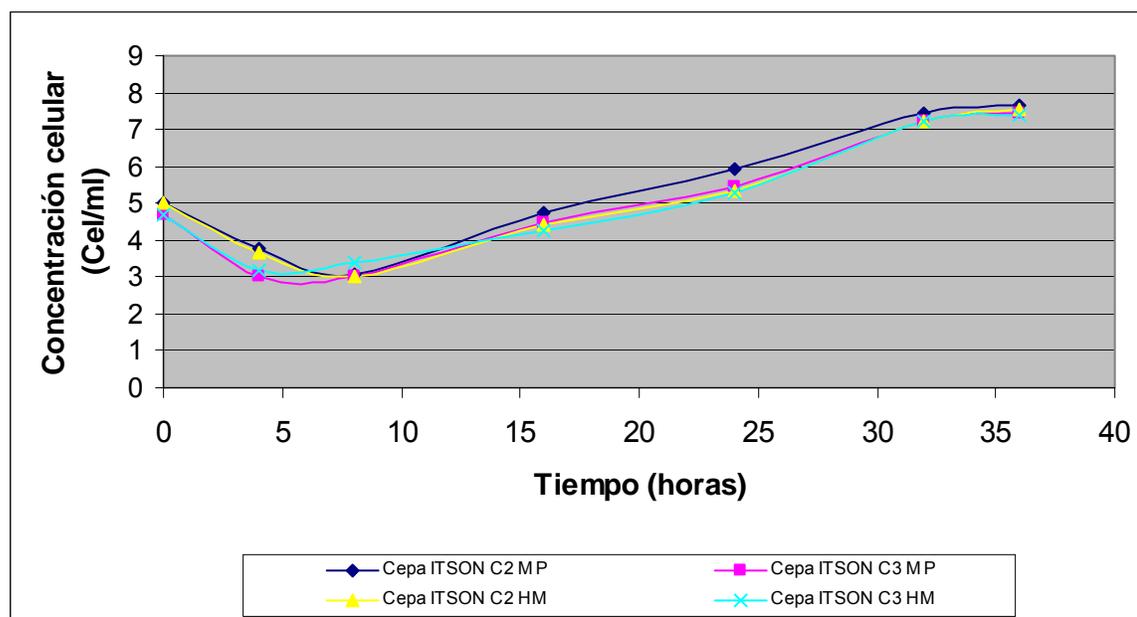
Los cuales fueron:

1. Determinación de humedad
2. Proteína total
3. Determinación de grasas método Soxhlet
4. Determinación de fibra cruda
5. Determinación de cenizas totales.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis preliminar para el tiempo de adaptación de *U. maydis* al medio de cultivo

En la gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de *U. maydis*; se observa que el hongo empieza a crecer a las 24 horas. Esto sirvió de referencia para las siguientes pruebas ya que se ahorra tiempo al momento de hacer el conteo celular. Ya que el hongo empieza a crecer a las 24 horas siendo una etapa de adaptación larga. No siendo necesario hacer mediciones cada 4 y 6 horas al inocularlo. Pero después de pasado el tiempo de adaptación es necesario hacer el conteo celular cada 4, 6 y 12 horas.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de las cepas ITSON C2 e ITSON C3, en los medios de cultivo de HM y MP.

4.2 Obtención de los medios de cultivo

Los nutrientes que están presentes en el medio de cultivo proporcionan a la célula microbiana los ingredientes necesarios para que produzcan más células como ella misma. Además de una fuente de energía, que puede ser un compuesto orgánico e inorgánico (Madigan, 2000).

4.2.1. Medio de cultivo a base de harina maíz.

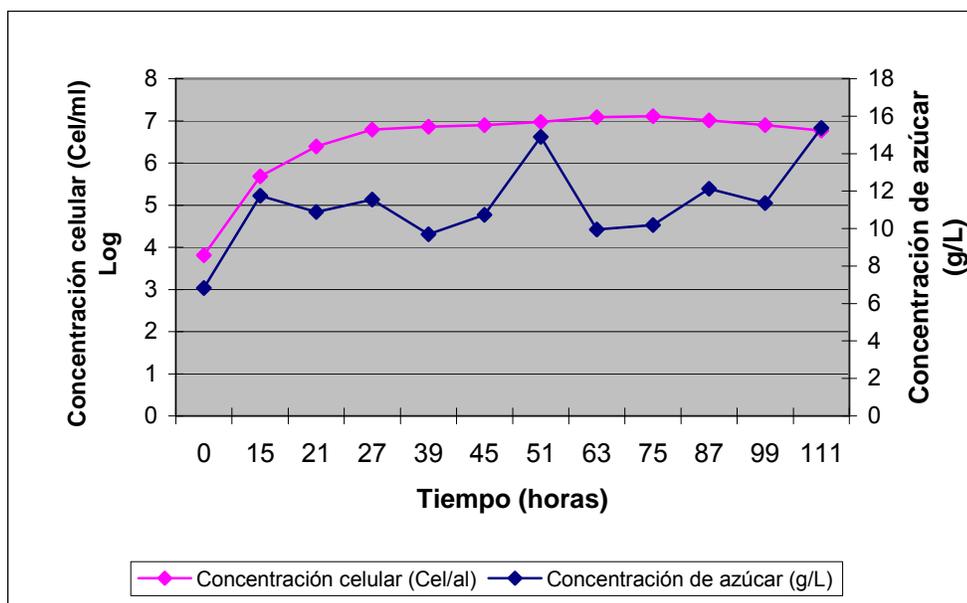
El medio de cultivo elaborado en base harina de maíz se preparó inicialmente con 100 g de harina, lo que proporciona al medio de cultivo alto contenido de almidón. Paredes y *col.* 2000, reportan que el almidón en la harina fortificada está presente un 68.7 %; en mayor proporción que otros componentes. Crueger, 1993, menciona que el almidón puede ser convertido en glucosa por hidrólisis ácida o enzimática. Antes de inocular un microorganismo en un medio de cultivo con alto contenido de almidón es necesario darle un tratamiento, ya sea de hidrólisis enzimática y licuefacción por tratamiento térmico para que el microorganismo lo asimile más fácilmente.

Crueger, 1993, menciona que el almidón se licua por ebullición y luego se hidroliza enzimáticamente. Añadiendo enzimas de diferentes orígenes microbianos que hidrolicen la celulosa, que aumentan la proporción de azúcares reductores en el medio de cultivo.

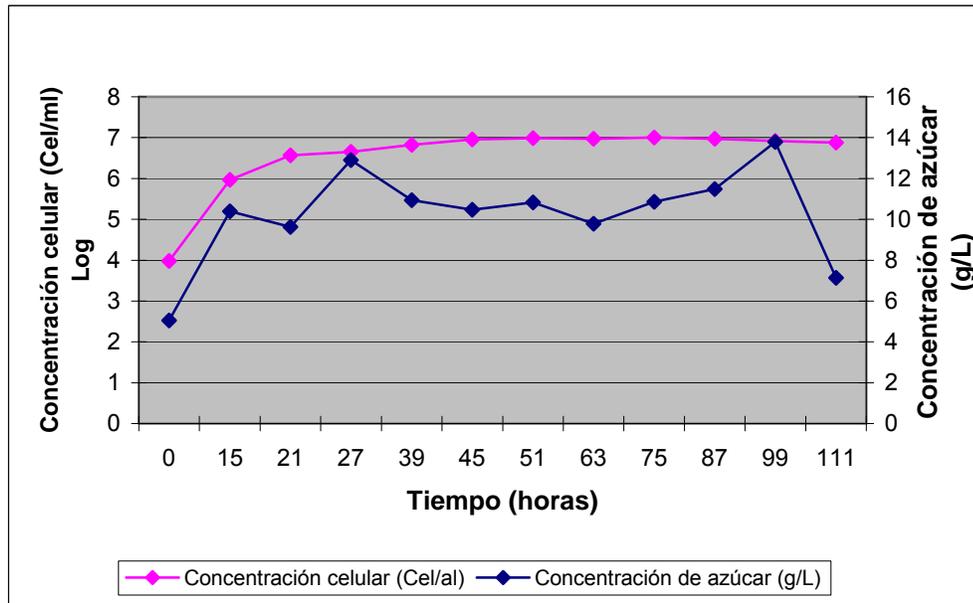
El almidón presente se debe a que durante el calentamiento o esterilización de los gránulos el almidón gelifica, volviéndose extremadamente viscoso; por lo que usualmente se incluye en el proceso la hidrólisis enzimática para que licue o aclare el almidón. La licuefacción puede llevarse a cabo bajo acción de amilasas provenientes de fuentes microbianas o de cereales malteados (Ward, 1991). Debido a que este proceso de hidrolizado no se completa, y las muestras aún

contienen almidón, es la razón por la que el hongo no puede consumir rápidamente el almidón y se observan variaciones, en la concentración de azúcar.

El aumento de la concentración de azúcares reductores se manifiesta continuamente. El medio de cultivo presenta inestabilidad al momento de hacer la medición de azúcares reductores. Es ésta la razón por la que se pensó en cambiar la composición inicial del medio de cultivo sustituyendo 100 g por 10 g de harina de maíz; al igual que la porción de azúcar que le corresponde que fue de 2 g a 0.2 g. Al hacer esta manipulación al medio de cultivo se puede observar en la gráfica 2 y 3 el comportamiento de las cepas ITSON C2 y ITSON C3 donde se presenta concentración de azúcares reductores y crecimiento celular. También en la tabla 3 (4.4) se presenta la prueba cualitativa con yodo donde se observa como el almidón va disminuyendo, conforme avanza el crecimiento celular.



Gráfica 2. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de harina de maíz en base a 100 g.

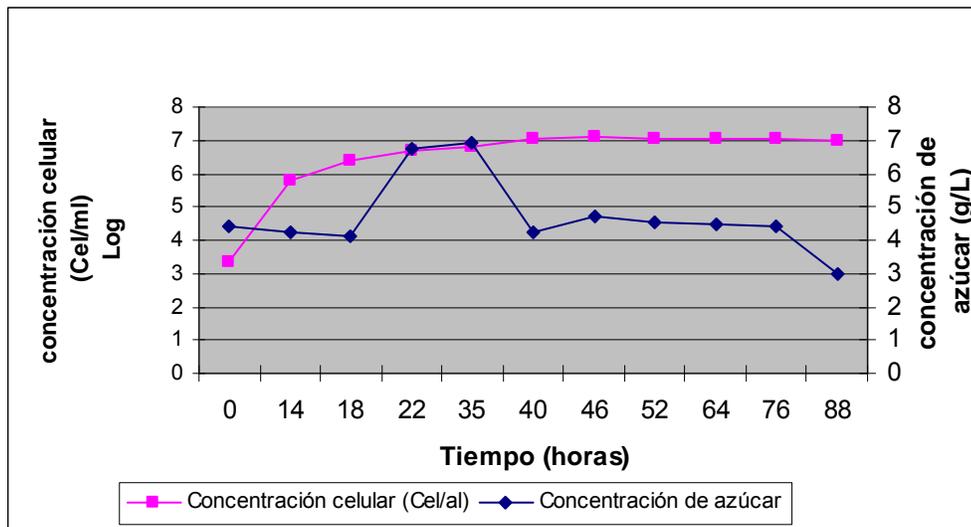


Gráfica 3. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de harina de maíz en base a 100 g.

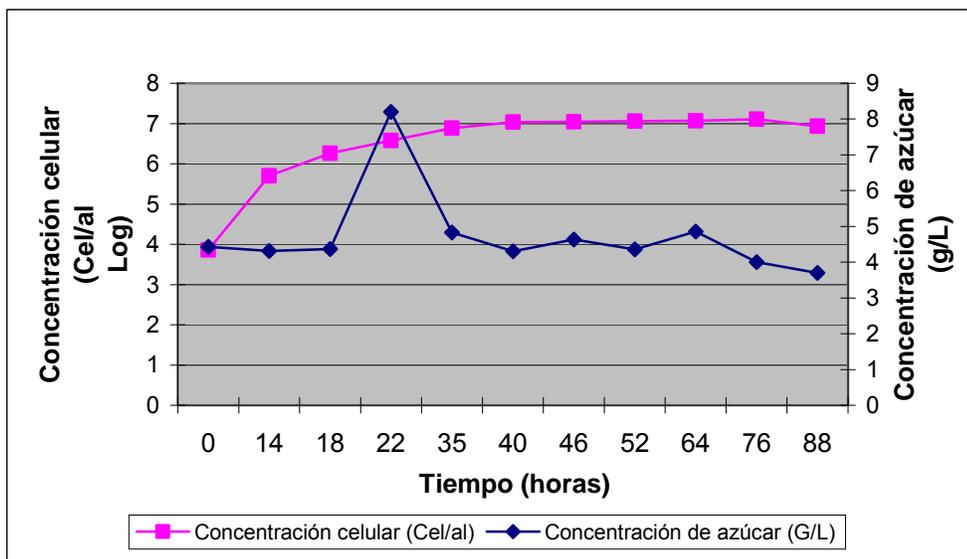
Al realizar esta nueva composición se pudo observar que se presenta mayor estabilidad en la concentración de azúcares reductores y como va disminuyendo la concentración de azúcar poco a poco (para ver como se manifiesta la disminución de azúcar ver gráfica 4).

Un aspecto muy importante del medio de cultivo a base de harina de maíz, con menor proporción de HM, es que no se aprecia turbidez ya que no presenta gran cantidad de gránulos al momento de hacer el recuento en el microscopio. Además la centrifugación ayuda a eliminar los gránulos más grandes. Esto deja ver de manera más clara y precisa la presencia celular al momento de observar en el microscopio. Tanto el medio que contenía 100 g de harina de maíz como el que contenía 10 g., ambos medios proporcionan las mismas características alimenticias al hongo; solamente que el primero está más concentrado al momento que *U. maydis* lo consume. Esto se presenta en las gráficas de crecimiento celular, ya que se puede observar como se da el crecimiento y se manifiesta en sus diferentes fases que son: de adaptación, logarítmica, estacionaria y de muerte.

Debido a los cambios realizados a la fórmula inicial de los medios de cultivo, se pudo observar el crecimiento normal donde se identifican claramente las fases de la cinética de crecimiento que son las mencionadas anteriormente. En la concentración de azúcares reductores se manifestó cómo iban disminuyendo con respecto al crecimiento celular. Se puede observar que al inicio hay un aumento de azúcar pero esto debido a la mínima presencia de almidón, ya que este medio contiene menor cantidad de sustrato en cuanto a la composición y es de más fácil consumo para la célula. Lo mencionado anteriormente se presenta en las gráficas No. 4 y 5 donde se puede observar el crecimiento y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 y C3 en medio de harina de maíz.

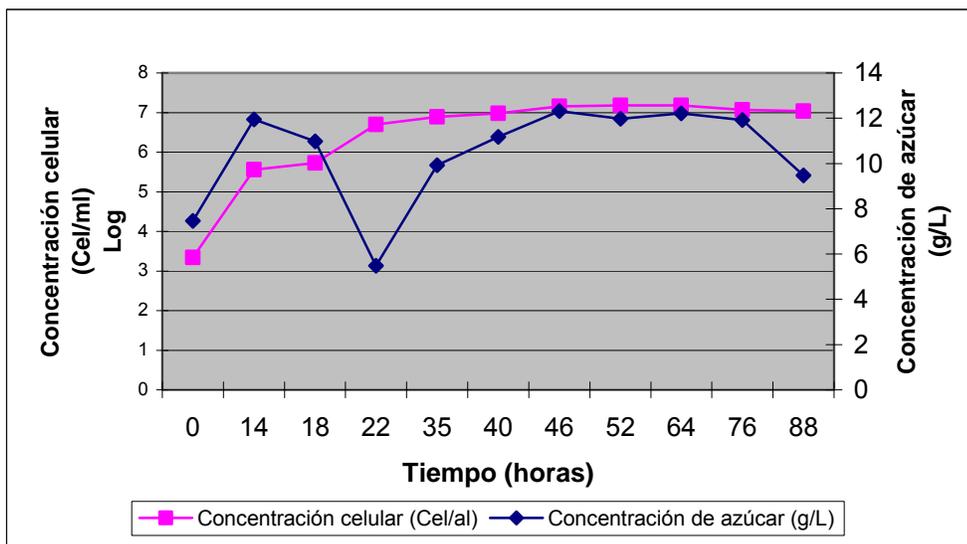


Gráfica 4. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio a base de harina de maíz en base a 10 g.

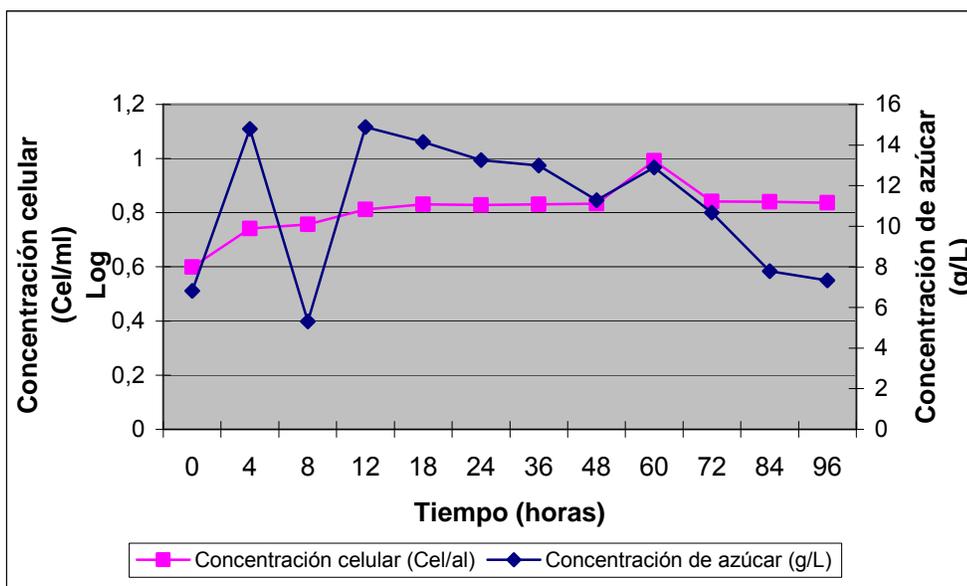


Gráfica 5. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de harina de maíz en base a 10 g.

Al comparar los resultados obtenidos de los medios de cultivo, preparados e inoculados con las cepas ITSON C2 y C3, con caldo dextrosa de papa (PDB) se observa crecimiento celular estable donde se manifiestan las partes de la curva de cinética de crecimiento. La concentración de azúcares reductores es adecuada ya que muestran el consumo de azúcar al igual que los medios de cultivo preparados. Esto se puede observar en la grafica 6 y 7, donde se inocularon las cepas ITSON C2 y C3 en el medio de cultivo comercial.



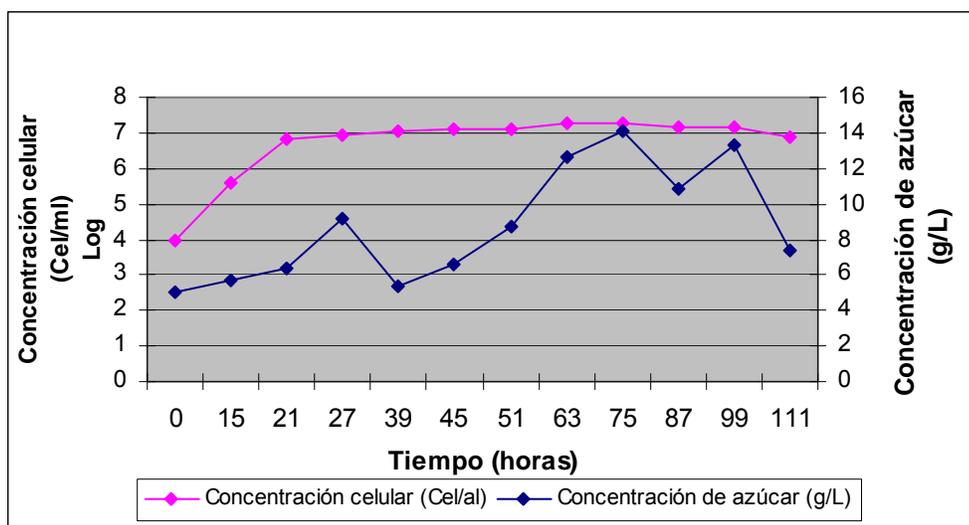
Gráfica 6. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio caldo dextrosa de papa (PDB) comercial.



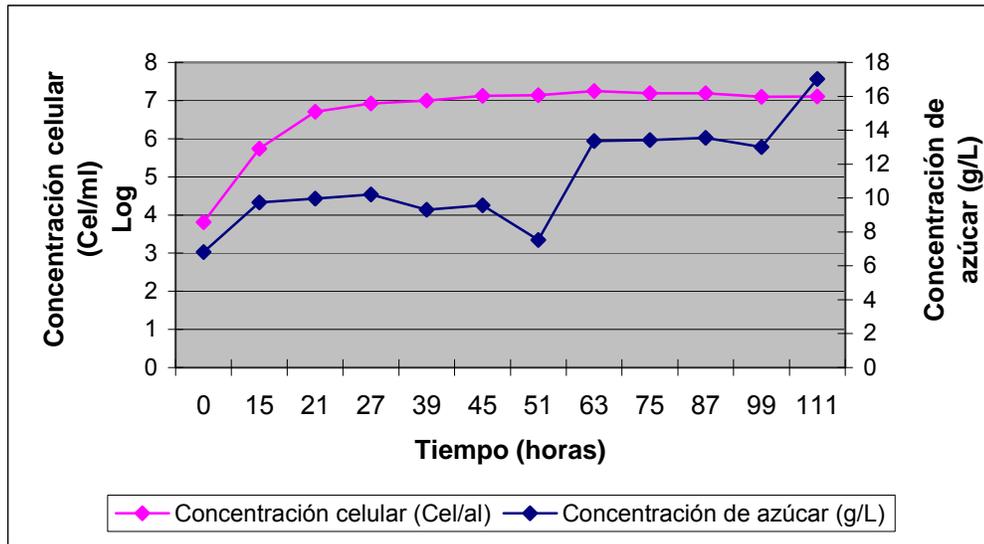
Gráfica 7. Crecimiento celular de la cepa ITSON C3 en medio Caldo dextrosa de papa (PDB) comercial.

4.2.2 Medio de cultivo a base de papa.

En el medio elaborado con 200 g de papa se puede observar cómo la concentración de azúcares reductores presenta las mismas características que qué manifestó el medio de harina de maíz. La papa contiene almidón y en las gráficas se puede observar un poco mas de inestabilidad que en los medios de harina de maíz. A este medio solo se le dio un tratamiento térmico. Según Badui, 1999, la amilasa convierte el almidón en azúcar. Un precalentamiento activa la enzima, lo que produce un aumento de azúcares y de la dulzura. Lo mencionado por el autor se apoya que debido a la actuación de la enzima se produce más cantidad de azúcar que es cuando aumenta la concentración de azúcares reductores. El azúcar liberado es consumido por el microorganismo debido a que es más fácil de digerir, mientras que las enzimas empiezan a hidrolizar el almidón presente con esto se libera más cantidad de azúcar. En la gráfica No. 8 y 9 se presentan las características del comportamiento de crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 y C3 en medio de papa.

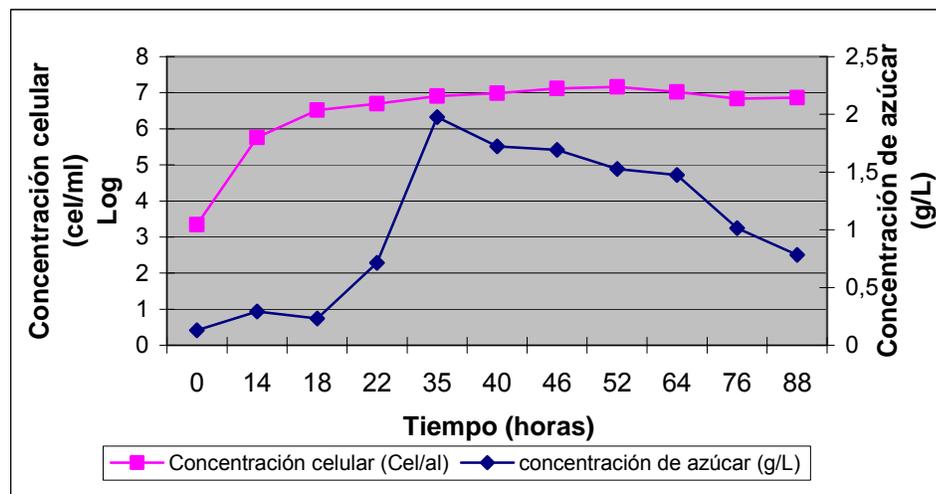


Gráfica 8. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de papa en base a 200 g.

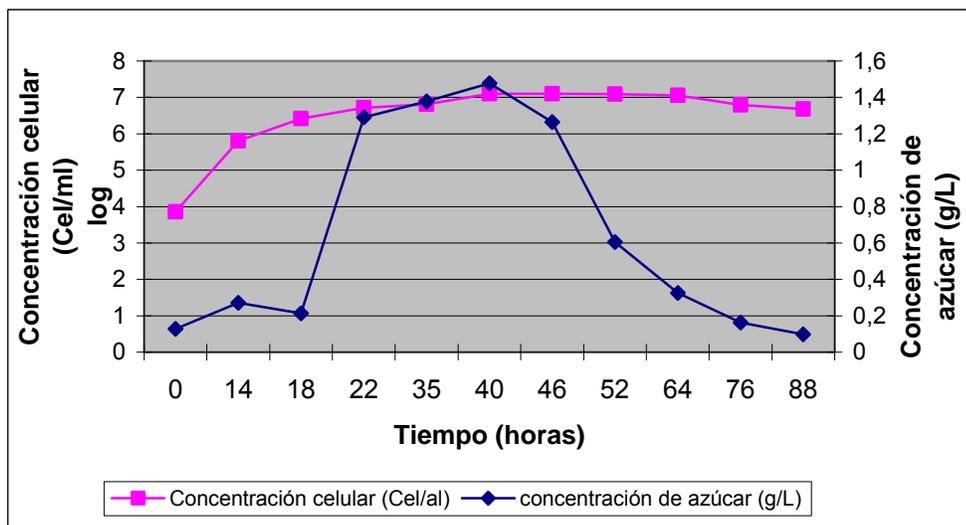


Gráfica 9. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de papa en base a 200 g.

Al cambiar la composición inicial del medio de cultivo, al cual en lugar de 200 g de papa se agregó 20 g., de la misma manera que el contenido de azúcar que fue de 20 g a 2 g. El medio de cultivo presentó mejores características que la composición inicial ya que se observó cómo las células consumían el azúcar más fácilmente. Lo anterior se puede observar en la gráfica No.10 y 11.



Gráfica 10. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C2 en medio de papa en base a 20 g.



Gráfica 11. Crecimiento celular y concentración de azúcar de la cepa ITSON C3 en medio de papa en base a 20 g.

El medio que mayor inestabilidad presenta en la concentración de azúcares reductores es el que está constituido a base de papa, ya que este solamente recibe un tratamiento térmico y no se lleva a cabo un hidrolizado como es el caso de la harina de maíz.

Para la obtención de estos resultados en azúcares reductores fue necesario realizar una curva estándar graficando concentración de glucosa contra absorbancia obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 0.5495x - 0.0006 \quad (\text{Curva estándar 1}^*)$$

$$y = 0,6042x - 0,0208 \quad (\text{Curva estándar 2}^*)$$

*Para observar las curvas estándar de glucosa ver apéndice I.

4.3 Método de inoculación y crecimiento celular

El método de inoculación fue adecuado, ya que se inocularon células viables que se encontraban en una concentración de 10^6 que es la apropiada para que el microorganismo se adapte al medio de cultivo más fácilmente.

El crecimiento microbiano depende de la célula para utilizar los nutrientes de su medio ambiente y sintetizar los compuestos macromoleculares de las estructuras celulares también de los principales compuestos de bajo peso molecular necesarios para la actividad celular (Ward, 1991). Si los nutrientes o compuestos presentes en el sustrato son difíciles de consumir por el microorganismo es ahí cuando la célula empieza a buscar la manera de adquirir esos nutrientes, liberando enzimas que los sintetizan a compuestos más pequeños.

4.4 Prueba cualitativa del yodo (I_2)

Se observó la presencia del almidón por medio de la medición cualitativa del yodo. Por medio de la coloración azul se pudo observar la presencia del almidón. La poca apariencia de coloración azul indicó hubo disminución en la presencia de almidón.

Químicamente el almidón es una mezcla de polisacáridos muy similares, como lo es la amilasa y la amilopectina. El yodo reacciona con la amilasa y genera un fuerte color azul característico debido al complejo que se establece entre una molécula de éste con cada 7-8 glucosas; para desarrollar perfectamente la coloración se requiere un mínimo de 40 residuos de monosacáridos. Aparentemente el complejo amilasa-yodo se establece por la infusión de I_2 en la hélice α de la molécula de almidón. Por otra parte la amilopectina solo acompleja una pequeña cantidad de I_2 y desarrolla una coloración roja (Badui, 1999).

Como ya se indicó el almidón está presente porque el medio de cultivo aún contiene gránulos de almidón los cuales al no ser consumido por los microorganismos es desdoblado por las enzimas presentes en el mismo sustrato. Lo cual se manifiestan al momento de observar la curva, ya que indica como en un principio el almidón está presente y poco a poco va disminuyendo. La disminución del almidón mediante la prueba cualitativa se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Presencia de almidón en los medios de cultivo con mayor concentración de harina de maíz y papa.

Tiempo	Medio a base de papa				Medio a base de harina de maíz					
	C2 T	C2 CDP1	C2 CDP2	C3 CDP1	C3 CDP2	C3 T	C2 HM1	C2 HM2	C3 HM1	C3 HM2
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
18	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
24	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
36	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
48	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

(-) No presencia de almidón

(+) Presencia de almidón

La presencia de almidón se observa en las primeras horas del experimento, ya que aumenta el contenido de azúcar esto debido a las enzimas presentes del medio que reducen las moléculas de almidón formando compuestos menos complejos. En la tabla 4 se puede observar claramente como va disminuyendo el contenido de almidón presente en los medios de cultivo que contienen menor cantidad de materia prima.

Tabla 4. Presencia de almidón en los medios de cultivo con menor concentración de HM y MP

Tiempo	Medio de cultivo a base de papa					Medio de cultivo a base de harina de maíz				
	C2 T	C2 CDP1	C2 CDP2	C3 CDP1	C3 CDP2	C3 T	C2 HM1	C2 HM2	C3 HM1	C3 HM2
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
18	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
24	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
36	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
48	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

(-) No presencia de almidón

(+) Presencia de almidón

4.5 Análisis para la caracterización de la harina de maíz y papa

La composición nutricional de un medio de cultivo es de gran importancia, ya que es el que va a proveer de nutrientes al microorganismo que se desea que crezca y se multiplique. La harina de maíz y la papa son materias primas económicas; además de suministrar al microorganismo los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo, ya que cuentan con azúcares y proteínas.

La composición química de la harina de maíz y papa se determinó mediante análisis de humedad, cenizas, grasas, proteínas y fibra cruda. Los resultados de los análisis se muestran en la tabla 5. En esta tabla se puede observar que los valores obtenidos se asemejan entre sí y varían un poco con los resultados obtenidos en bibliografía (ver 2.4.2 y 2.5.1). Las cantidades que aquí se presentan son en base a materia seca. Solamente la humedad se determina en base a materia húmeda.

Tabla 5. Composición química de la harina de maíz y papa.

Composición química	Composición proximal (%)	
	Harina de maíz (BS)	Papa (BS)
Humedad	7.11	80.60
Proteínas	9.09	8.93
Grasa	4.57	0.47
Fibra cruda	1.33	1.36
Cenizas totales	1.23	3.375
Almidón	76.67	85.87

CONCLUSIONES

- ◆ Los medios de harina de maíz y papa resultaron ser adecuados para el crecimiento óptimo de *U. maydis*, esto comparado con el medio comercial caldo dextrosa de papa (PDB); ya que ambos cumplen con los requerimientos nutricionales y condiciones que el hongo requiere.
- ◆ En la cinética de crecimiento se pudo observar como el hongo creció y se manifestó en todas sus etapas de crecimiento como son: adaptación, logarítmica, estacionaria y de muerte.
- ◆ Los azúcares presentes en cada medio son consumidos por *U. maydis*. Al haber presencia de almidón que es un polisacárido, el hongo libera enzimas que degradan el almidón obteniendo subproductos como la glucosa que es consumida con más facilidad por el hongo.

RECOMENDACIONES

- ◆ Es necesario tomar en cuenta los parámetros a utilizar y hacer una prueba preliminar, para saber las características iniciales que pueda presentar el microorganismo.
- ◆ Observar de alguna manera como los nutrientes presentes en el medio de cultivo pudieran afectar el crecimiento del microorganismo.
- ◆ Seguir investigando acerca del inóculo *U. maydis*, para saber que parámetros requiere para su óptimo crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, Gerge, N. 1991. Fitopatología. Versión Española. Manuel Guzmán Ortiz. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V., México, quinta reimpresión, pp, 440-443.
- Alvarez-Buylla, Elena. 2003. Aspectos Ecológicos, Biológicos y de Agrobiodiversidad de los Impactos del Maíz Transgénico. Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, UNAM. Pp. 1-28
<http://www.cec.org/maize/resources/chapters.cfm?varlan=espanol>
- Álvarez, Cabrales D. N. 1999. Aislamiento y evaluación de la patogenicidad de cepas del hongo *Ustilago maydis* (Huitlacoche) del valle del Yaqui en plantas de maíz. Instituto tecnológico de Sonora. México.
- Badui, Dergal Salvador. 1999. Química de los Alimentos. Pearson Educación. México.
- Balderrama, López, J.E. Evaluación del Ácido Salicilico y Ácidos Policarboxilicos sobre el rendimiento y calidad poscosecha en cultivo en campo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Licenciatura, del Instituto Tecnológico de Sonora. Pag. 7.
- Banuett, Flora. 1992. *Ustilago maydis*, the delightful blight. Reviews. Vol. 8, No. 5. pp 174- 179.

Baunett, Flora y Herskowitz Ira. 1994. Morphological Transitions in the Life Cycle of *Ustilago maydis* and Their Genetic Control by the *a* and *b* Loci. *Experimental Mycology*, 18. pp 247-266.

Bressani,R., Rooney, L.W. y Serna-Saldivar, S.O. 1997. *Fortification of corn masa flour with iron and/or other nutrients*. SUSTAIN. U.S. Agency for international Development. Washintong, D.C. 166 páginas.

Cano-Canchola C. *et al.* 2000. Induction of Lytic Enzymes by the Interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* Tisúes. *Fungal Genetics and Biology* 29. pp. 145-151.

Crueger, Wulf, Crueger, Anneliese. 1993. *Biología, manual de microbiología Industrial*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. Pp. 73- 76.

Escobar, Moreno Dario A. 2002. El cambio tecnológico de las semillas de maíz durante el siglo XXⁱ. La tendencia de la pérdida de la biodiversidad. Universidad Autónoma de Barcelona. Pp. 1-14. Artículo publicado en el Congreso Iberoamericano de Desarrollo y Medio Ambiente, Quito Ecuador Noviembre 2002.

http://www.h-economica.uab.es/tercicle/web_ee/cidma/Dario.doc

FAOSTAT. 1998. *Producción: Uso, consumo y comercialización*. Centro Internacional de la Papa.

<http://www.cipotato.org/market/Potatofacts/papapdf/papaprod.pdf>

Flores-Farias, R., Martínez-Bustos, F., Salinas-Moreno, Y., Ríos, Elvira. 2002. *Caracterización de harinas comerciales de maíz nixtamalizado*.

Agrociencia, Vol. 36 # 5. Colegio de Posgraduados, México. Pp. 557-567.

García, Salazar J. y Santiago, Cruz M. 2001. Economía de la Agro industrialización de la papa en México. Revista Latinoamericana de la Papa. ALAP. Lima Perú.

Kahmann, Regine. 2002. Fungus Drains Resistance. Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology. Pp. 32-39.

Kämper, Jörg. 2003. Regulation of pathogenic and sexual development in *Ustilago maydis*. Max Planck-Institute Terrestrial Microbiology. Department of Organism Interactions.

Kealey, K. S. y Kosikowski. 1981. Potencial del Cuitlacoche como posible fuente alimenticia. CRC Crit. Rev Food Sci. Nutrición. Vol. 15, Núm. 14, pp. 321-330.

López, B. L. 1991. Cultivos herbáceos. Volumen I. Cereales. Mundi-prensa. Madrid, España. Pp. 307-320.

Madigan, Michael; Martinko, John; Parker, Jack. 2000. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. Octava edición revisada. Pp. 153-155.

Martínez-Espinoza, A., Ruiz-Herrera, J. 1998. El Hongo *Ustilago maydis*, de la época prehispánica al tercer milenio. Fitopatología, Vol. 33 CINVESTAV Irapuato, Guanajuato. pp. 194-206.

- Navarro, Ramos Laura E. (1992). Determinación de los parámetros óptimos para el tratamiento alcalino de la paja de trigo con NH_4OH . Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora. Pp. 25-27.
- Paredes, L. O., Serna, S. S. guzmán, O. 2000. Los alimentos Mágicos de las culturas Indígenas de México- El caso de la Tortilla. INIFAP. Tecnológico de Monterrey, Culiacán Sinaloa. 107 pp.
- Paredes, López O. y Valverde, Ma. Elena. 1999. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas de México-El Caso del Huitlacoche. Culiacán, Sinaloa. Pp. 50.
- Prescott, Lansing; Harley, John; Klein, Donald. 1999. Microbiología. 4ta edición. Mc Graw-Hill-Interamericana. Pp. 115-118.
- SAGAR. 2000. *Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México*. 1990-1999. Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR. 50 pp.
- Robinson, David, S. 1991. Valor Nutritivo de los Alimentos. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.
- Ruiz-Hernández, Castro-Espinoza, (2002). Efecto del período de fecundación del maíz (*Zea mays*) en la infección y producción de Huitlacoche (*Ustilago maydis*) en el valle del Yaqui. ITSON-DIEP VOL. III Num. 11. pp. 39-52.
- Ruiz-Herrera, J. y Martínez- Espinoza, A. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*; 1:149-158.

Toit, J. Lindsey, Pataky, J.K. Effects of Silk Maturity and Pollination on Infection of Maize Ears by *Ustilago maydis*. Department of Crop Sciences, University of Illinois. Plant Disease. The American Psychopathological Society. Pag. 621.

Toit, J. Lindsey, Pataky, J.K. Variation Associated with Silk Channel Inoculation for Common Smut of Sweet Corn. Department of Crop Sciences, University of Illinois. Plant Disease. The American Psychopathological Society. Pag. 727.

Ward, Owen P. 1991. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. España. Pp. 27-28.

http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/

http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/imagenes_de_neubauer.htm

APENDICE I

Determinación de azúcares reductores

Método del ácido dinitrosalicílico (DNS)(Miller, 1959, citado por Navarro 1992):

- Composición del reactivo DNS

Reactivo	%
Hidróxido de sodio	1.4
Ácido 3-5 dinitrosalisílico	0.75
Tártato de sodio y potasio	21.6
Fenol	0.54
Metabisulfito de sodio	0.59

Los reactivos se diluyen en agua destilada y se prepara según el volumen a utilizar. El reactivo debe mantenerse en un frasco ámbar.

- Técnica

1. en un tubo de ensaye colocar 1.00 ml de muestra
2. 3 ml de ácido dinitrosalísílico (DNS*)
3. Colocar en baño maría
4. mantener a ebullición por 5 minutos
5. enfriar
6. aforar a 20 ml con agua destilada
7. leer absorbancia en espectrofotómetro a 550 nm
8. Comparar con curva estándar de glucosa (0.02-2.2g/l)

Curva estándar de la glucosa

Para la determinación de la concentración de azúcares reductores, se elaboró una curva estándar (ver figura 1-A) cuyo procedimiento es el siguiente:

- 1) Preparar una solución que contenga 2.2 g/L de glucosa

- 2) Tomar alícuotas en matraces volumétricos de 0.02, 0.08, 0.1, 0.3, 0.8, 1, 2, 2.2
- 3) Se afora al volumen requerido
- 4) Seguir el método DNS.

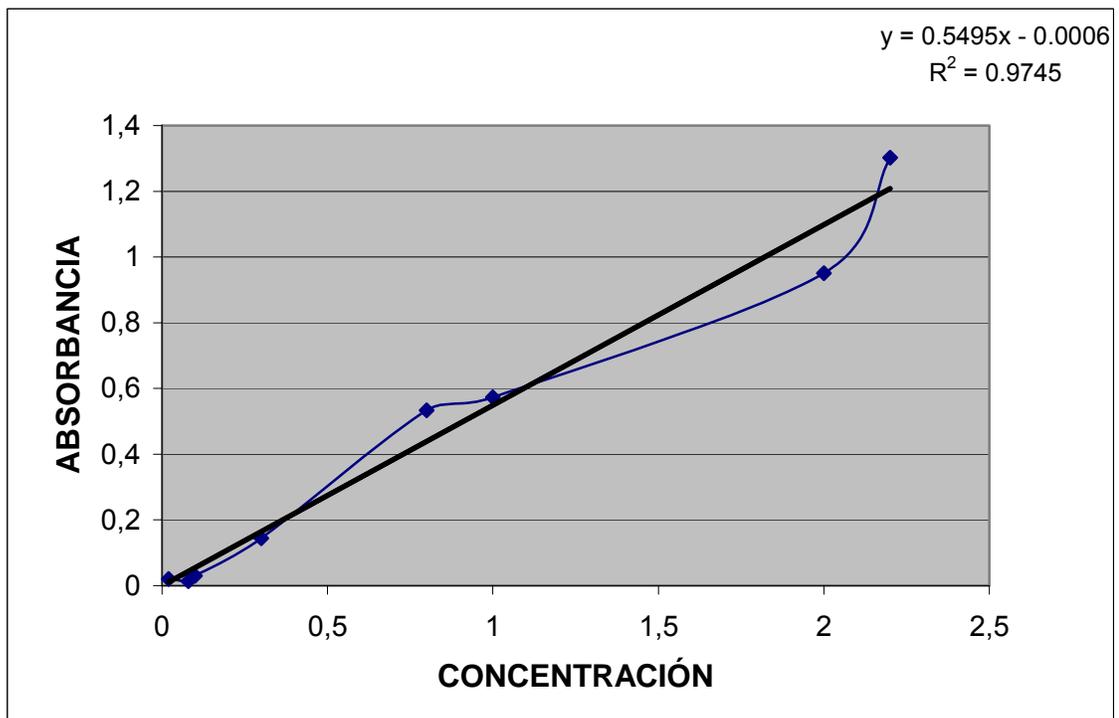


Figura 1-A. Curva estándar de la glucosa.

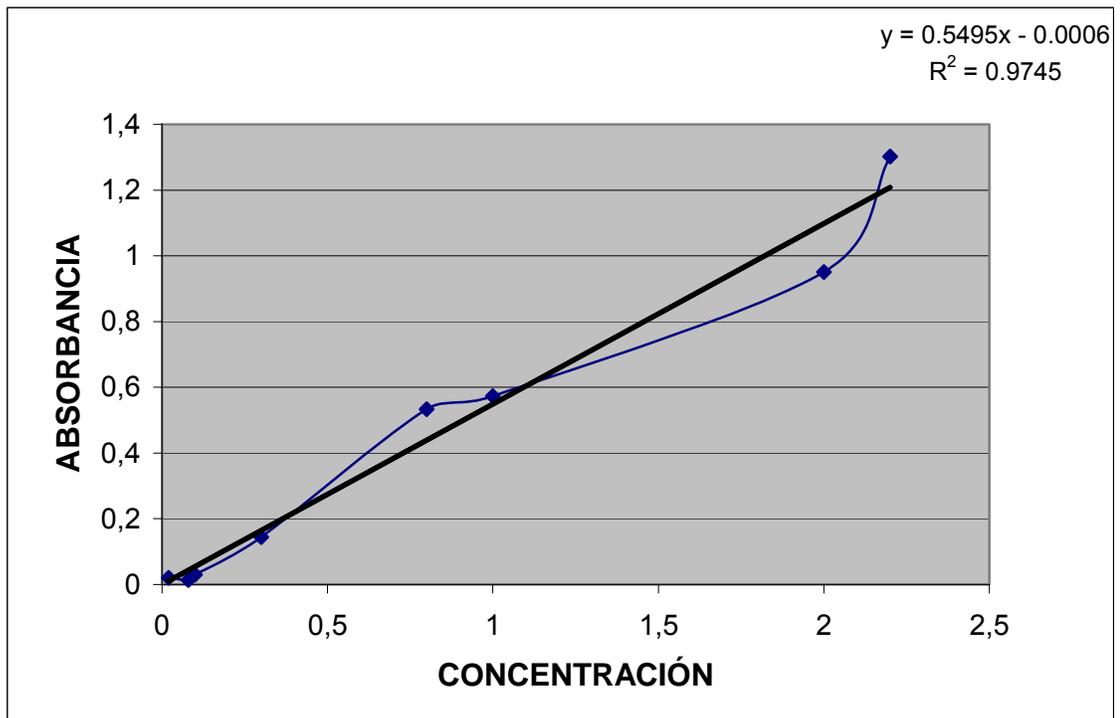


Figura 1-B Curva estándar de la glucosa.
