

APLICACIÓN DE MÉTODOS RÁPIDOS EN MICOLOGÍA ALIMENTARIA

M. A. Calvo Torras

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona)
mariangels.calvo@uab.es

Resumen

En este estudio se aportan métodos rápidos de detección fúngica en alimentos como alternativa al recuento clásico, que permiten una mayor rapidez a la hora de analizar muestras de alimentos. Este hecho disminuye considerablemente el tiempo de inmovilización de los mismos permitiendo, por lo tanto, su rápida introducción a mercado.

Palabras clave: métodos rápidos, micología alimentaria, ergosterol.

Abstract

In this study fungal detection rapid methods are provided as an alternative to classic colony counting, and it allows a higher speed when analysing food samples. This fact reduces considerably their storage time, allowing therefore, their fast introduction into the market.

Key words: rapid methods, alimentary micology, ergosterol.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas clásicos de recuento de hongos filamentosos y levaduras en placa implican un tiempo de lectura que no debe ser inferior a tres días. Este período de tiempo, excede, sin duda del deseable para que el producto analizado pueda salir a mercado.

Con el deseo de agilizar las analíticas micológicas en microbiología alimentaria, se han propuesto una serie de métodos que se resumen a continuación.

MÉTODOS QUÍMICOS PARA CUANTIFICAR MASA FÚNGICA. POSIBLE CORRELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

En los últimos años se han desarrollado métodos químicos para cuantificar la biomasa fúngica presente en una muestra, que implican la detección y medida de un componente específico de los hongos, entre los que destaca principalmente el ergosterol (Ride y Drydale, 1972; Seitz *et al.*, 1977, 1979; Naewbanij *et al.*, 1984; Lin y Cousin,

1985; Matcham *et al.*, 1985; Patel y Williams, 1985; Jarvis y Williams, 1987; Saxena *et al.*, 2001).

El ergosterol es un constituyente importante de la pared celular de la mayoría de los hongos, siendo un constituyente minoritario de plantas superiores e insectos (Nes, 1977; Weete, 1980).

Método para la determinación de ergosterol (Seitz y Mohr, 1992)

El método para determinar la concentración de ergosterol podemos resumirlo en:

- 1.- Se añaden 40 ml de cloroformo y 10 ml de hexano por cada 10 g de producto.
- 2.- Se somete la mezcla a una agitación en shaker orbital a 180 rpm durante 30 minutos.
- 3.- Se procede a la filtración y recuperación de 30 ml.
- 4.- Se añaden 3 g de hidróxido potásico y se mantiene en baño maría a 55-60°C durante 20 minutos.
- 5.- Se añaden 5 ml de agua y se mezcla por agitación.
- 6.- Se separan las fases y se recupera la fase de hexano
- 7.- Se realiza la extracción con 5 ml de hexano (x2)
- 8.- Se combinan los extractos y se evaporan en corriente de nitrógeno
- 9.- Se disuelven los extractos secos en metanol
- 10.- Se realiza una cromatografía en capa fina, utilizando como líquido de desarrollo tolueno:acetona (99:1).
- 11.- Las placas desarrolladas se exponen a vapores de yodo durante 45 segundos y se observan bajo luz ultravioleta.

Relación entre la cuantificación del ergosterol y la producción de micotoxinas

Seitz *et al.*, 1979 indicaron asimismo que el ergosterol no sólo puede ser considerado un indicador del crecimiento fúngico sino que su detección cuantitativa permite establecer una posible correlación con la síntesis de micotoxinas. En este mismo orden de ideas, Zill *et al.*, en 1988 aportaron datos indicando que la formación de zearalenona se inicia cuando el nivel de ergosterol alcanza la concentración de 50 mg/Kg e incrementa rápidamente en la fase de crecimiento estacionario que se caracteriza por un descenso en el nivel de formación del ergosterol.

Gourama y Bullerman en 1995 determinaron que la detección de ergosterol puede ser un indicador de la producción de aflatoxinas ya que en medio sólido la producción de aflatoxina B₁ sigue el mismo patrón que la presencia de ergosterol, en el caso de cepas de *Aspergillus parasiticus*.

Saxena *et al.*, en el año 2001 demostraron que la detección de ergosterol puede ser considerado como un indicador rápido de la producción potencial de ochratoxina A en cepas de *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 y de *Penicillium verrucosum* NRRL 3260.

Otros componentes fúngicos

Matcham *et al.*, en 1985 indicaron que además del ergosterol otros dos constituyentes de los hongos pueden ser también útiles como indicadores de masa fúngica. Estos constituyentes son: quitina y lacasa. Sin embargo el ergosterol fue definido, incluso por estos autores como el indicador más sensible aún en el caso de que la concentración de masa fúngica sea mínima.

En el año 1982 Häggblom determinó una relación lineal entre el peso seco de hongos y el contenido en glucosamina de los mismos.

OTROS MÉTODOS

Los métodos inmunológicos pueden representar una rápida alternativa a los métodos clásicos y en este sentido se han propuesto diversos estudios encaminados a proponer técnicas inmunológicas (Kamphuis *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1986; Notermans y Heuvelman, 1985; Notermans *et al.*, 1986 a y b; Notermans y Kamphuis, 1990; Schwabe *et al.*, 1992) que permitan detectar la presencia de hongos en alimentos.

Entre las técnicas indicadas podemos señalar:

- a.- Aglutinación
- b.- ELISA

En todos los casos es fundamental la preparación de anticuerpos monoclonales que como indican Banks *et al.* en 1994 pueden ser utilizados en un ensayo de amplio espectro para detectar hongos de importancia en alimentos.

MÉTODOS PARA IDENTIFICACIÓN DE GÉNEROS Y ESPECIES

Los métodos clásicos para la identificación de hongos miciliares hasta nivel de género y especie implica un buen conocimiento de las características diferenciales de cada género y el tiempo de desarrollo de las cepas propuesto por los especialistas para su correcta identificación oscila en general entre 10 y 14 días.

Con el fin de facilitar y acortar el tiempo de clasificación de los hongos miciliares se han propuesto las siguientes metodologías:

- 1.- Detección de metabolitos secundarios: micotoxinas y antibióticos
- 2.- Electroforesis de proteínas
- 3.- Análisis de ácidos grasos
- 4.- Método ELISA

Ej.: Ensayo para diferenciar especies del género *Fusarium*

- 5.- PCR y secuencias de ADN ribosómico
- 6.- Análisis de RLFP
- 7.- Micrométodos para identificación de levaduras

1.- Detección de metabolitos secundarios: micotoxinas y antibióticos

La detección de metabolitos secundarios elaborados y acumulados por hongos filamentosos ha sido preconizada por determinados autores entre los que destacan Frisvard y cols., como un parámetro que facilita la identificación de este grupo de microorganismos.

El método se basa en el empleo de técnicas cromatográficas a partir de discos de cultivo obtenidos en condiciones controladas a partir de las cepas en estudio.

El desarrollo de placas de cromatografía en capa fina, en condiciones pre-establecidas, permite establecer perfiles específicos de micotoxinas y de metabolitos secundarios a partir de los Rf establecidos.

También se pueden aplicar técnicas de HPLC.

2.- Electroforesis de proteínas

La electroforesis permite separar y diferenciar proteínas constituyentes de los hongos y facilita el establecimiento de perfiles específicos que son útiles para la identificación de los mismos.

3.- Análisis de ácidos grasos

Al igual que las bacterias, los hongos poseen una membrana citoplasmática que contiene entre sus componentes un 50% de ácidos grasos. La caracterización de estos componentes facilita la identificación de cada cepa.

4.- Método ELISA

Ej.: Ensayo para diferenciar especies del género *Fusarium*.

5.- PCR y secuencias de ADN ríbosómico

6.- Análisis de RFLP

7.- Micrométodos para identificación de levaduras

Ej: API 20 Auxonograma

BIBLIOGRAFIA

Banks, J.N.; Con, S.J.; Clarke, J.H.; Shamsi, R.H.; Northway, B.J.- 1992. Progress towards the immunological detection of field and storage fungi. In Modern Methods in Food Mycology. Samson, et al. (Eds.). Elsevier, Amsterdam pp. 247-252.

Gourama, H. y Bullerman, L.B.-1995. Relationship between aflatoxin production and mould growth as a measured by ergosterol and plate count. Lebensm.-Wiss. Technol. 28: 185-187.

Häggblom, P.- 1982. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature and inoculum size. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1205-1207.

Jarvis, B. y Williams, A.P.- 1987. Methods of detecting fungi in food and beverages. En: Beuchat, L.R. (ed.) Food and Beverage Mycology. 2nd. Ed. New York . pp: 599-636.

Kamphuis, H. J. ; Notermans, S; Rombouts, F.M.- 1992. Immunological detection of moulds. In Morgan et al. (Eds.). Elsevier, Barking, pp.393-399.

Lin, H.H. y Cousin, M.A. 1985. Detection of mould in processed food by high performance liquid chromatography. J. Food Prot. 48: 671-678.

Lin, H.H.; Lister, R.; Cousin, M.A.- 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mould in tomato puree. Journal of Food Science 51: 180-183.

Matcham, S.E.; Jordan, B.R.; Wood, D. A.-1985. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 108-112.

Naewbanij, M.; Seib, P.A.; Burroughs, R.; Seitz, L.M.; Chung, D.S. 1984. Determination of ergosterol using thin layer chromatography and ultra-violet spectroscopy. *Cereal Chem.* 61: 385-388.

Nes, W. R.- 1977. The biochemistry of plant sterols. In Paoletti, R. et al. (Eds.) *Advances in Lipid Research*, vol. 15. Academic Press, New York, pp. 233-324.

Notermans, S. ; Heuvelman, C.J.- 1985. Immunological detection of moulds in food by using the ELISA : preparation of antigens. *International Journal of Food Microbiology* 2: 247-258.

Notermans, S.; Heuvelmann, C.J.; Van Egmond, H.P.; Paulsch, W. E.; Besling, J.R.- 1986a. Detection of mould in food by ELISA. *Journal of Food Protection* 48: 786-791.

Notermans, S.; Heuvelmann, C.J.; Beumer, R.R. ; Maas, R.- 1986b. Immunological detection of mould relation between antigen production and growth. *International Journal of Food Microbiology* 3: 253-261.

Notermans, S.; Kamphuis, 1990. Detection of molds in food by latex agglutination: a collaborative study. *Food and Agricultural Immunology* 2: 37-46

Patel, O. y Williams, A. P.- 1985. A note on the estimation of food spoilage yeasts by measurements of ATP after growth at various temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 133-136.

Ride, J.P. y Drydale, R.B.-1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissues. *Physiol. Plant Pathol.* 2: 7-15.

Saxena, J., Munimbazi, C., Bullerman, L.B.- Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 71(1): 29-34

Schwabe, M.; Kamphuis, H.; Trummer, U.; Offenbacher, G.; Kramer, J.- 1992. Comparison of the latex agglutination test and the ergosterol assay for the detection of moulds in foods and feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology* 4: 19-25 .

Seitz, L. M. y Mohr, H. M.- 1992. New ergosterol test procedure. Personal communication.

Seitz , L.M. ; Mohr, H. M. ; Burroughs, R.; Sauer, D.B.-1977. Ergosterol as indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* 54: 1207-1217.

Seitz , L.M. ; Sauer, D.B.; Burroughs, R.; Mohr, H.M.; Hubbard, J.D.- 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69: 1202-1203.

Weete, J.D. -1980. *Lipid Biochemistry of Fungi and other Organisms*. Plenum. New York

Zill, G.; Engelhardt, G; Wallnofer, P.R.- 1988. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si⁶⁰ HPLC. *Z. Lebensm.-Unters.Forsch.* 187: 246-249.