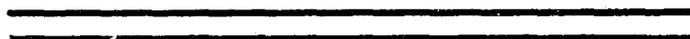


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO**

**Estudio de la contaminación de frutas  
procesadas por Byssochlamys fulva.**

**S U S T E N T A N T E:**

**María de Lourdes Gutiérrez Coronado**

**CARRERA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO**



**AÑO 1983**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

### OBJETIVO

### CAPITULO I

#### 1.- Introducción

#### 2.- Generalidades

##### 2.1 Características generales de mohos

##### 2.1.1 Definición

##### 2.1.2 Caracteres morfológicos

##### 2.1.3 Condiciones favorables de crecimiento

##### 2.1.4 Clasificación e identificación

##### 2.1.5 Distribución

#### 3.- Microbiología de alimentos enlatados

##### 3.1 Microorganismos asociados con la descomposición de alimentos enlatados ácidos.

##### 3.2 Definición de microorganismos termodúricos

##### 3.3 Factores responsables de descomposición en alimentos enlatados.

### CAPITULO II

#### 1.- Características del género *Pysochlamys*

##### 1.1 Propiedades generales

##### 1.2 Morfología y clasificación

### CAPITULO III

#### 1.- Importancia económica de *Pysochlamys*

##### 1.1 Descomposición de alimentos enlatados

##### 1.2 Producción de toxinas

#### CAPITULO IV

1.- Métodos de laboratorio involucrados en la determinación-  
microbiológica de *Byssochlamys*

1.1 Aislamiento

1.2 Identificación

1.3 Métodos de recuento

1.3.1 Métodos de recuento en jugos de fruta

1.3.2 Métodos de recuento en concentrados de fruta

#### CAPITULO V

1.- Medidas de control

1.1 Agentes físicos

1.1.1 Curvas de destrucción térmica

1.2 Agentes químicos

#### CAPITULO VI

1.- Resumen y comentarios

#### CAPITULO VII

1.- Bibliografía

## CAPITULO I

## 1.- INTRODUCCION

Las frutas constituyen una importante fuente de nutrientes para el hombre. Son fuentes importantes de carbohidratos digeribles y no digeribles; los carbohidratos digeribles estan presentes bajo la forma de azucares y féculas; en tanto que las sustancias no digeribles se encuentran celulósica, necesarias para una digestión normal.

También son fuente importante de minerales y vitaminas, especialmente A y C.(15, 72)

Es por lo tanto necesario hacer todo el esfuerzo posible para que durante todo el año se disponga de ellas para el consumo humano, ya sea en estado fresco o en conserva. (33)

La composición química de las frutas no solo varía de acuerdo con las variedades botánicas, las prácticas de cultivo y el estado atmosférico sino que cambia con el grado de madurez antes de la cosecha y la condición de madurez posterior y progresiva después de la cosecha, la cual es fuertemente influenciada por las condiciones de almacenaje. (24)

No obstante, se pueden presentar algunas generalizaciones. La mayoría de las frutas contienen proporciones altas de agua, bajas de proteínas y bajas de grasas. El contenido de agua es por lo general mayor del 70% y frecuentemente mayor del 85%. El contenido de proteínas no es mayor del 3.5% y el de grasas del 0.5%. (72)

Desde el momento en que las frutas se cosechan, comienzan a pasar por una serie de etapas de descomposición progresiva y es aquí cuando surge la necesidad de preser -

varlas.(55)

Entre los diversos medios de conservación los que emplean calor son usados ampliamente. El fundamento principal de la preservación de frutas en latas o en botellas es el sellado hermético del recipiente que las contiene y sometidas posteriormente a una esterilización.(55, 96)

La destrucción de los microorganismos por el calor se debe a la coagulación de sus proteínas y especialmente a la inactivación de las enzimas necesarias para su metabolismo.  
(24)

La experiencia ha demostrado, que como una regla, los mohos y las levaduras son destruidos por el calentamiento de las latas por un tiempo dado produciendo un producto palatable de apariencia atractiva y que las bacterias termorresistentes permanecen inocuas debido a su inhabilidad para crecer en medios ácidos como son los jugos de fruta.  
(29, 40)

Es decir, que la descomposición de las frutas procesadas por actividad microbiológica raramente ocurre y puede ser atribuida a fallas de rutina durante el proceso de calentamiento, o a microorganismos que se introducen al recipiente después de la esterilización debido a un sellado insatisfactorio.(30)

No obstante, el moho Byssochlamys fulva ha sido encontrado como un factor importante en la descomposición de - frutas enlatadas y embotelladas, causando una completa desintegración de la fruta debido al rompimiento del material péctico; también las latas infectadas presentan, algunas -

Veces, abombamiento por la producción de dióxido de carbono.(4, 35, 36)

En comparación con otras especies de mohos presenta una termoresistencia inusual atribuida a sus ascosporas.(91)

El Byssochlamys nivea ha sido también encontrado, pero sus ascosporas son menos termoresistentes y normalmente no sobrevive a los procesos de enlatado.(5, 99)

El primer reporte de contaminación por este moho ocurrió en Gran Bretaña durante la década de los treinta, y por algún tiempo se pensó que se restringía solo a este país. Sin embargo, este microorganismo ya ha sido aislado de otras áreas incluyendo el Continente Europeo(Suiza, Yugoslavia, Holanda), Canadá, Australia, Sudamérica y la costa oeste de Estados Unidos.(73, 74, 90, 93)

## 2.- GENERALIDADES

### 2.1 Características generales de mohos.(24, 90)

Debido a que el crecimiento de los mohos es lento-comparado con el de las bacterias y levaduras, cuando las condiciones son favorables al desarrollo de todos estos microorganismos, los mohos se encuentran en condiciones desfavorables de competencia y a menudo se manifiestan en alimentos en que las condiciones son menos favorables para el crecimiento bacteriano, como son:

- a) alimentos con un bajo pH.
- b) alimentos con un contenido de baja humedad.
- c) alimentos almacenados a baja temperatura.
- d) alimentos expuestos a irradiación.
- e) alimentos conteniendo antibióticos.

En general, los mohos pueden utilizar sustratos tales como pectinas y otros carbohidratos, ácidos orgánicos, - proteínas y lípidos.

Los mohos son perjudiciales ya sea: a) porque son capaces de sintetizar metabolitos tóxicos, b) por su resistencia al calor o a bajas temperaturas, c) por su resistencia a irradiaciones, d) por su resistencia a antibióticos. También pueden causar alteraciones de olor, sabor y decoloraciones de la superficie de los alimentos.(45)

#### 2.1.1 Definición

Se dá el nombre de moho a ciertos hongos(latín, fun - gus=hongos) multicelulares, filamentosos, que no poseen - hojas, troncos ni raíces, carecen de clorofila y cuyo cre-

cimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. La parte principal del hongo en crecimiento generalmente es blanca; más puede también estar coloreada u oscurecida.

Ciertos mohos maduros presentan esporas coloreadas típicas que dan color a parte o a toda la masa en crecimiento.

(1, 11, 24)

### 2.1.2 Caracteres morfológicos

La morfología, es decir, la forma y estructura macro- y microscópica de los mohos, es una de las bases para su identificación y clasificación.

**HIFAS Y MICELIO.**- El elemento principal de crecimiento o forma vegetativa de un moho es la hifa (griego, hiphe=caña) estructura tubular ramificada, de 2-10 $\mu$  de diámetro, es decir mucho mayor que una bacteria. Las hifas forman al crecer un conjunto de ramificaciones entretejidas, denominadas micelios, que originan una colonia o talo.

Las hifas crecen por elongación de sus extremos (crecimiento apical) y por producción de ramas laterales. (14, 24)

Las hifas que penetran en el interior del medio cuyas sustancias nutritivas absorben se denominan colectivamente micelio vegetativo y se le conocen como hifas sumergidas, mientras que las que crecen hacia la superficie constituyen el micelio aéreo; como esta últimas contienen a menudo las células reproductivas o esporas, se le denomina también micelio reproductor. (1)

Un pequeño grupo de mohos produce esclerocios, que -

son masas de hifas fuertemente apelotonadas, a menudo con paredes gruesas, dentro del micelio. Dichos esclerocios son mucho más resistentes al calor y a otras condiciones adversas que el resto del micelio, por lo que resultan muy interesantes en cierto tipo de alimentos sometidos a tratamiento térmico. (38, 65)

El examen microscópico de las hifas proporcionan caracteres muy útiles para la identificación de los diferentes géneros de mohos. Estos se dividen en dos grupos: septados, con tabiques transversales que dividen la hifa en varias celdillas, y no septados, cuyas hifas cilíndricas carecen de tabiques transversales.

Las hifas no septadas poseen núcleos diseminados en toda su longitud, por lo que se consideran como multicelulares. Se ha observado así mismo que las hifas de casi todos los mohos son claras, aún cuando existen algunos con hifas oscuras. Las hifas carecen de color en visión microscópica y lo poseen cuando se observa macroscópicamente una gran masa de las mismas. (24)

Las hifas septadas aumentan en longitud por división de la célula apical (crecimiento apical) o por fragmentación de la hifa (crecimiento intercalar). El tipo de crecimiento es característico de las distintas especies. (44)

**ESTRUCTURAS O PARTES REPRODUCTORAS.**— Los mohos pueden desarrollarse a partir de un fragmento de micelio, pero es raro que esto ocurra. Generalmente la reproducción se realiza por medio de esporas asexuales. Algunos hongos forman también esporas sexuales y reciben el nombre de "perfectos".

Las hifas de estos últimos pueden ser tabicadas (Asco-

micetos y Basidiomicetos) o no tabicadas(Oomicetos y Zigo- micetos). Los hongos llamados imperfectos(típicamente ta - bicados) forman solo esporas asexuales.(65)

ESPORAS ASEXUALES.- Las esporas asexuales, que se producen en gran cantidad, son pequeñas, ligeras y resistentes a la desecación. El aire las disemina fácilmente, originando - nuevos mohos en donde encuentran condiciones favorables.

Los tres tipos más importantes son:

- 1) Conidios
- 2) Artrosporas u oidios
- 3) Esporangiosporas  
(44)

Los conidios se desprenden o crecen en hifas fértiles especiales denominadas conidióforos; generalmente son a - biertos, es decir, no están incluidos en ningún receptácu - lo especial, contrariamente a lo que sucede con las espo - rangiosporas, que se encuentran encerradas en un esporan - gio o saco, en la extremidad de una hifa fértil que se lla - ma esporangióforo.(44)

Las artrosporas se forman por fragmentación de una hi - fa cuyas células se convierten en artrosporas. Tienen gene - ralmente forma rectangular con pared doble y gruesa.(38)

Muchas especies forman un cuarto tipo de esporas, las clamidiosporas, al almacenar, ciertas células del micelio, alimentos de reserva, hincharse y rodearse de una pared - más gruesa que las células que la rodean. La clamidiospo - ra, o célula latente, es más resistente a las condiciones-

desfavorables que el micelio ordinario, originando nuevos individuos cuando las condiciones vuelven a ser favorables.  
(98)

La morfología de las esporas asexuales es de interés en la clasificación e identificación de los géneros y especies fúngicos. Las esporangiosporas difieren en tamaño, forma y color. Los conidios no solo presentan estos caracteres diferenciales, sino que también se distinguen por ser lisos o rugosos y mono, bi o multiceulares. También ayuda a la identificación de los mohos el aspecto de las hifas fértiles y las esporas asexuales en ellas existentes. (24, 65)

Cuando existen esporangiosporas debe observarse si los esporangióforos son simples o ramificados, tipo de ramificación y tamaño, forma, color y localización de los esporangios. El extremo protuberante del esporangio, la columela, que generalmente se proyecta hacia el interior del esporangio, tiene formas típicas en las distintas especies de mohos. (98)

Los conidios crecen individualmente en los conidióforos o formando cabezas de esporas de disposición y complejidad diversas. Ciertos mohos tienen conidios en cadena dispuestos como eslabones, y formados a partir de una célula especial llamada esterigma o fiálide, situada en el ápice del conidióforo. Otros presentan masas irregulares de conidios que se desprenden de la porción apical del conidióforo sin que existan esterignas aparentes, tales masas están escasamente apetonadas, intimamente unidas o incluso cubiertas por una especie de mucilago. (24, 65)

**ESPORAS SEXUALES.**- La clasificación de los mohos que producen esporas sexuales se basa en la forma en que éstas se producen y en el tipo originado.

Existen cuatro tipos principales:(24)

- 1) Ascosporas
- 2) Basidiosporas
- 3) Oosporas
- 4) Zygosporas

Los ascomicetos(septados) producen esporas sexuales - llamadas ascosporas por la unión de dos células del mismo micelio o de dos micelios separados. Las ascosporas, formadas al dividirse las células después de la conjugación se encuentran en un asca o saco, en número generalmente de ocho por asca. Las ascas pueden ser simples o agrupadas dentro de una cubierta denominada ascocarpo, formado por la ramificación y entrecruzamiento de las hifas adyacentes.  
(65)

Los basidiomicetos, en los que se incluyen los hongos comestibles y la mayoría de los fitopatogénos, elaboran la basidiospora, la que se forma en una estructura especial llamada basidio. (1, 98)

Los ficomicetos(no septados) que originan Oosporas se denominan Oomicetos, generalmente son acuáticos y raros en los alimentos. Las oosporas son el resultado de la fusión de un gameto pequeño masculino y de uno femenino grande.  
(14)

Los zigomicetos producen zigosporas al unirse las porciones apicales de dos hifas, frecuentemente semejantes, -

que pueden proceder del mismo o de diferentes micelios.

Tanto las oosporas como las zigosporas están recubiertas por una fuerte membrana que les permite resistir la desecación durante largos períodos de tiempo. (11, 14)

### 2.1.3 Condiciones favorables de crecimiento.

ACTIVIDAD DE AGUA.- En general, la mayoría de los mohos necesitan menos humedad que la mayoría de las levaduras y bacterias.

La tolerancia de solutos puede expresarse como actividad de agua ( $a_w$ ) que se define como la presión de vapor de la solución (de los solutos en el agua en la mayoría de los alimentos), dividida por la presión de vapor del disolvente (generalmente agua). La  $a_w$  estará en equilibrio con una humedad relativa (H.R.) de la atmósfera en torno al alimento-100 veces superior, si la H.R. se expresa como porcentaje. Cuando la H.R. que rodea al alimento corresponde a una  $a_w$  inferior a la del propio alimento, tenderá a desecar su superficie; y a la inversa, cuando la H.R. es mayor que la  $a_w$  del alimento ésta tenderá a aumentar en la superficie de dicho alimento. (24, 53)

Los mohos difieren entre sí considerablemente respecto a la  $a_w$  óptima y al intervalo de  $a_w$  que permiten la germinación de las esporas asexuales. Este intervalo es más amplio a temperaturas cercanas a las óptimas de germinación de las esporas y en los mejores medios de cultivo. La  $a_w$  mínima necesaria para la germinación de las esporas es en algunos mohos de 0.62, mientras que para otros es de 0.93- Cada moho posee también una  $a_w$  óptima y un intervalo de  $a_w$

en el que puede crecer. (1, 14)

A valores de  $a_w$  inferiores a 0.62 cesan todas las posibilidades de crecimiento de los mohos, una  $a_w$  inferior a 0.70 es suficiente para inhibir a la mayoría de los mohos-productores de alteraciones alimenticias. La reducción de la  $a_w$  por debajo de la óptima de crecimiento, retrasa la germinación de las esporas y reduce la velocidad de crecimiento, siendo por lo tanto un factor importante en la conservación de los alimentos. (24, 38, 44)

**TEMPERATURA.**- La mayoría de los mohos son mesófilos, es decir, crecen bien a la temperatura ambiente. La temperatura óptima para la mayoría de ellos es de 25 a 30°C, pero algunos crecen bien a 35-37°C o incluso a más. Cierta número de mohos son Psicrófilos, esto es, crecen bien a temperaturas de refrigeración. Unos cuantos son termófilos y su temperatura óptima es elevada. (1, 24, 38, 44)

**NECESIDADES DE OXIGENO Y pH.**- Los mohos necesitan oxígeno para desarrollarse, por tanto son aerobios, al menos los que crecen en alimentos. La mayoría crecen en un intervalo de pH muy amplio, de 2 a 8.5, pero casi todos lo hacen mejor a un pH ácido.

**LUZ.**- Aunque la luz no es requerida para el crecimiento de los mohos, algo de ella es esencial para la esporulación en algunas especies. Sin embargo, es interesante que el efecto de la luz en algunas especies aparece estar localizada y no es transferida a través del micelio a porciones no iluminadas de el talo. (1)

La luz juega un importante papel en la dispersión de las esporas ya que los órganos diseminadores de esporas de muchos mohos son fototrópicos y descargan sus esporas hacia la luz. (93)

NECESIDADES ALIMENTICIAS.- En la naturaleza los mohos obtienen sus alimentos por infección de organismos vivos como parásitos o por el ataque de materia orgánica muerta como saprófitos. Algunos también por relaciones simbióticas con plantas.

Los mohos requieren alimentos elaborados ya que al carecer de clorofila son incapaces de sintetizarlos por ellos mismos. Pero si se les dá carbohidratos en alguna forma, - preferiblemente glucosa o maltosa, la mayoría de los mohos sintetizan sus propias proteínas utilizando fuentes inórganicas u orgánicas de nitrógeno y varios elementos minerales esenciales para su crecimiento.

Estudios de laboratorio han establecido que el C, H, O, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe y Zn son requeridos - por muchos mohos y otros elementos tales como el calcio son requeridos solo por algunos. (1, 34, 44)

Como una regla general, la glucosa es la mejor fuente de carbono y compuestos orgánicos nitrogenados la mejor - fuente de nitrógeno siguiéndole los compuestos amoniacales y nitratos. (55)

La mayoría de los mohos almacenan reservas alimenticias en la forma de glicógeno o de lípidos. (1)

#### 2.1.4 Clasificación e identificación

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos inferir que los criterios seguidos para la clasificación e identificación de los mohos son los siguientes:

- a) Que las hifas sean septadas o no.
- b) Que el micelio sea claro u oscuro.
- c) Que el micelio presente color o sea incoloro.
- d) Que se produzcan esporas sexuales o no y, en caso de - que se produzcan, de que tipo: oosporas, zigosporas, ascosporas o basidiosporas.
- e) Clase de esporas asexuales: esporangiosporas, conidios- o artrosporas(oidios).
- f) Caracteres de las cabezuelas de esporas:
  - i) Esporangios: tamaño, color, forma y localización.
  - ii) Conidios: conidios simples o en cadenas, conidios - formados por gemación o en masas; forma y disposi - ción de los esterigmas o fiálides; apelmazamiento de los conidios.
- g) Aspecto de los esporangióforos o conidióforos: simples- o ramificados, tipo de ramificación. Tamaño y forma de la columela apical del esporangióforo. Si los conidiófo- ros están aislados o agrupados en haces.
- h) Aspecto microscópico de las esporas asexuales, especial- mente de los conidios: forma, tamaño, color; lisos o rugosos; mono, bi o multice-lulares.
- i) Presencia de estructuras (o esporas) especiales: estolo- nes, rizoides, células basales, apófisis, clamidiospo- ras, esclerocios, etc.

(24)

### 2.1.5 Distribución

Los mohos se encuentran ampliamente distribuidos en -

el medio ambiente, y se encuentran como parte de la flora normal de productos alimenticios, en equipo inadecuadamente saneado, o como contaminantes ambientales. Son también los agentes responsables de la desintegración de materia orgánica, contribuyendo enormemente a la estabilidad química de la biósfera al degradar los restos de las sustancias orgánicas del suelo. (1, 11)

Afectan directamente a la destrucción de alimentos, y otros productos manufacturados a partir de materia prima sujeta a ataques fúngicos; son también causa de la mayoría de las enfermedades de plantas conocidas y muchas enfermedades de animales y humanos. (1, 14)

Sin embargo, el conjunto de todos los efectos que los mohos producen en relación con la vida humana, tal vez sea más beneficioso que perjudicial. Sus capacidades biosintéticas se utilizan en la producción industrial de un gran número de antibióticos como la penicilina, de algunas drogas como ergometina y cortisona; en la preparación de algunas vitaminas y en la producción de muchos ácidos orgánicos, como cítrico y oxálico. (65, 93)

Además, intervienen en la elaboración de ciertos quesos, pan y bebidas alcohólicas, ayudando al aporte de gran número de calorías a los alimentos humanos. (8, 44)

### 3.- MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS ENLATADOS.

El procedimiento térmico utilizado en alimentos enlatados depende de muchos factores asociados a:

- tipo de producto
- pH normal
- consistencia
- tamaño del envase
- tipo de cocción

El factor más importante que determina el grado del procedimiento térmico para lograr productos estables es el pH, debido al efecto inhibitorio de la acidez en la sobrevivencia y crecimiento de microorganismos. Por esta razón, los alimentos procesados son divididos en función de su pH. Así tenemos que la "National Cannera Association" los ha dividido en dos grandes categorías: Alimentos de baja acidez teniendo un pH por arriba de 4.5 y alimentos ácidos con un pH de 4.5 o más bajo. Cameron clasifica los alimentos vegetales enlatados en cuatro grupos, según su pH:

Grupo I            Alimentos de acidez baja, con un pH por arriba de 5.3.

Grupo II           Alimentos de acidez media, con un pH oscilando entre 4.5 y 5.3.

Grupo III          Alimentos ácidos, con un pH oscilando entre 4.5 y 3.7.

Grupo IV           Alimentos muy ácidos, con un pH inferior a 3.7.

### 3.1 Microorganismos asociados con la descomposición - de alimentos enlatados ácidos.

Una gran variedad de microorganismos ácido tole -  
rantes pueden sobrevivir al proceso. Su sobrevivencia, ge -  
neralmente depende de una contaminación excesiva antes del  
proceso y/o por dar al producto un proceso térmico leve pa  
ra preservar textura(principalmente en productos de fruta).  
Tratamientos impropios de tiempo-temperatura, también pue -  
den ser responsables.

Estos microorganismos caen dentro de los siguientes -  
grupos:

- a)"Bacterias anaérobicas", tal como el Clostridium pasteurianum(mesofílico), el cual produce ácido butírico, di -  
óxido de carbono e hidrógeno.
- b)"Acidúricos", particularmente el Bacillus coagulans, en -  
productos de tomate. Este microorganismo crece a 30, 35,  
y 55°C.
- c)"Mohos termoresistentes", principalmente en el caso de -  
la contaminación de concentrados de jugos y frutas. El -  
microorganismo responsable usualmente es Byssochlamys -  
fulva, o especies similares que producen ascosporas muy  
termoresistentes. La alteración o descomposición se ma -  
nifiesta por un gusto y olor mohoso, decoloración, pre -  
sencia de micelio en el producto y algunas veces por li -  
gero abombamiento del bote o lata.
- d)"Levaduras y/o bacterias asporogénicas", especialmente -

en el caso de proceso insuficiente. (12, 44, 59)

### 3.2 Definición de microorganismos termodúricos.

Los microorganismos termodúricos son definidos como a aquellos microorganismos que sobreviven a una medida significativa de tratamiento térmico. La sobrevivencia puede consistir solo de un pequeño porcentaje de la población inicial; o bien de la mayoría de las células que sobreviven. (12)

La diferenciación entre microorganismos termofílicos y termodúricos, está en la base en que estos últimos, no solo sobreviven al tratamiento térmico, sino también a las temperaturas elevadas usadas. (11)

Las bacterias son los principales microorganismos ter modúricos encontrados, pero mohos tales como el Byssochlamys fulva y algunos tipos de Aspergillus sp y Penicillium sp presentan la cualidad de ser termodúricos bajo algunas circunstancias.

Los géneros Micrococcus sp, Streptococcus sp, Microbacterium sp, Arthrobacter sp, Lactobacillus sp, Bacillus sp, y Clostridium sp, son reconocidos generalmente como géneros que contienen algunas especies termodúricas.

Debido a las características extremadamente diversas de los microorganismos involucrados, pocas generalizaciones concernientes a sus acciones en alimentos son hechas. Ellas pueden ir desde cambios no detectables, hasta producción considerable de ácido, proteólisis y lipólisis. (12

La probabilidad de sobrevivencia después del calentamiento depende de muchos factores. Aún dentro de una misma especie, la sensibilidad al calor varía marcadamente entre los diversos tipos. Grandes poblaciones incrementan considerablemente la probabilidad, que una sola célula, o unas pocas células, de sobrevivir a un tratamiento térmico dado.

Las características del alimento que está siendo sometido a tratamiento térmico, particularmente el pH, y la presencia de materiales protectores tales como azúcares, grasas y proteínas, tienen influencia en la sobrevivencia en un grado considerable.(59)

### 3.3 Factores responsables de descomposición en alimentos enlatados.

Los alimentos enlatados son clasificados como descompuestos o alterados, cuando por alguna razón han sufrido un cambio perjudicial o por la condición de que el recipiente que los contiene hace posible tal cambio.

Las principales causas de alteración en alimentos enlatados pueden ser señaladas de la manera siguiente:

a) Microbiológica: Durante el proceso

Enfriamiento inadecuado

Infección resultante de fugas a través de las grietas de los botes o latas.

Contaminación después del proceso.

b) Química:

Abombamiento por gases

- c) Física:                    Fallas de técnica en la operación del -  
autoclave.  
Durante el agotado.  
Sobrellenado
- d) Otras:                    Emohecimiento  
Daños

#### DURANTE EL PROCESO:

La actividad de los microorganismos sobrevivientes se manifiesta por la producción de gas que causa un abombamiento de la lata, por la acidificación del contenido o por algún otro cambio indeseable que afecte la calidad del producto aunque no haya producción de gas.

Cuando el crecimiento de microorganismos ocurre sin producción de gas, las latas afectadas tienen una apariencia externa normal y la descomposición solo es detectable después de que la lata ha sido abierta.(24)

La descomposición de alimentos ácidos, generalmente es debida a mohos y levaduras o a bacterias acidúricas esporuladas o no esporuladas. Formas esporuladas no acidúricas también suelen estar presentes, pero estos microorganismos no tienen significancia, ya que normalmente son incapaces de crecer en medio ácido.(59, 69)

#### ENFRIAMIENTO INADECUADO:

La termoresistencia de los microorganismos termófilos determina que un proceso térmico suficiente para asegurar su destrucción a menudo de como resultado algún deterioro-

en la calidad del alimento, su control consiste principalmente en la eliminación o reducción de la contaminación - mediante enfriamiento rápido y almacenamiento a temperaturas relativamente bajas de estos productos susceptibles a descomposición termofílica.

Los termófilos se multiplican rápidamente en un rango de temperaturas de 120-160<sup>o</sup>F(48.9-71.1<sup>o</sup>C), y fallas al enfriar las latas inmediatamente después del proceso a una temperatura baja ocasionan serios problemas de descomposición. Es costumbre enfriar las latas a una temperatura aproximada de 95<sup>o</sup>F(35<sup>o</sup>C), las latas entonces retienen suficiente calor para secar rápidamente, pero si ellas son apiladas en grandes bloques a esta temperatura, el enfriamiento se lleva a cabo en forma más lenta y existe el riesgo de descomposición del empaque. Por lo tanto, latas recientemente procesadas, deben ser almacenadas en bloques pequeños y en almacenes fríos y bien ventilados.(40, 71)

#### INFECCION POR FUGAS A TRAVES DE GRIETAS:

Los microorganismos que penetran en los botes o latas a través de las grietas son de varios tipos y no necesariamente termoresistentes. La infiltración y posterior alteración puede ser el resultado de algún daño mecánico que haya sufrido el bote vacío y que hace que las juntas sean defectuosas; una manipulación brusca después del llenado - también puede estar a las latas.

Los microorganismos penetran en el interior de la lata procedentes de la superficie externa que se ha contaminado a partir del equipo, especialmente si las latas - están húmedas, o bien proceder del agua que se emplea para

enfriar después del tratamiento térmico.

Las grietas también ocasionan pérdida de vacío en el bote, haciendo de este modo más fácil la alteración química o microbiana del alimento. Por tanto, la alteración debida al agrietamiento del recipiente es causada por cualquier microorganismo o mezcla de ellos que hayan penetrado. La presencia de microorganismos que se sabe tienen poca resistencia al calor, especialmente si hay más de un tipo de ellos, es prueba evidente de agrietamiento.

#### ALTERACION DESPUES DEL PROCESO:

Un tratamiento térmico ligero puede ser suficiente para permitir un almacenamiento de los alimentos durante períodos limitados, con ayuda de otro método de conservación tal como la refrigeración. Los microorganismos sobrevivientes, serán de varios tipos y entre ellos pueden hallarse incluso formas vegetativas.

Ejemplos típicos de estos tratamientos ligeros son los que se dan a algunos fiambres de carne y la pasteurización de la leche. Los alimentos ácidos tales como las frutas, frecuentemente se enlatan en caliente o se tratan a temperaturas próximas a los  $100^{\circ}\text{C}$ , lo que determina la muerte de todas las formas vegetativas bacterianas, de las levaduras, de los mohos y sus esporas y de algunas esporas bacterianas. Las únicas que generalmente sobreviven son esporas bacterianas, que no son capaces de desarrollarse en un medio muy ácido. (24, 71)

#### ABOMBAMIENTO POR GASES:

Dentro de estos se encuentra el abombamiento por hi -

drógeno que es favorecido por:

- a) La acidez de los alimentos.
- b) Las temperaturas de almacenamiento elevadas.
- c) Imperfecciones en el estañado y barnizado interior del bote.
- d) Evacuación insuficiente.
- e) Presencia de compuestos sulfurados y fosfatados solubles.

El abombamiento por hidrógeno es una consecuencia de la producción y almacenamiento de hidrógeno a presión, liberado por la acción de un alimento ácido sobre el hierro del bote o lata. (40, 53)

#### OPERACION INCORRECTA DEL AUTOCLAVE:

Una reducción rápida de la presión de vapor al final del proceso dá como resultado una alta presión dentro de la lata, y esto causa una severa deformación y distorsión de las latas, las que al enfriarse tienen una apariencia general de abombamiento. Se ha encontrado que latas deformadas producidas de esta manera no tienen una presión positiva, y que sus uniones pueden ser forzadas más o menos a su posición normal.

Aunque latas deformadas moderadamente no pueden ser clasificadas como descompuestas, debe hacerse un esfuerzo posible para eliminarlas, ya que tal deformación es altamente conductiva a una descomposición por agrietamiento.

(53)

#### DURANTE EL AGOTADO:

Durante el proceso de calentamiento, un agotado impropio de las latas dá lugar a una severa deformación de las

misas debido a la presión interna excesiva alcanzada por la expansión de los gases atrapados. La apariencia de las latas después del proceso de agotado varía desde una ligera a una severa distorsión, dependiendo de la cantidad de aire residual y gases desarrollados, de los contenidos y el tamaño del espacio libre; pero aún en latas severamente distorsionadas la presión interna después del proceso y en enfriamiento rara vez excede a unas pocas lb/in<sup>2</sup>. Tales latas, por supuesto, no son vendibles.

Un agotado moderado dá como resultado un bajo vacío en las latas y estas latas ocasionan dificultades al ser distribuidas en lugares de climas calientes o a áreas de altitudes elevadas donde el incremento de temperatura o presión atmosférica reducida resulta en un pandeo de las latas.

#### **SOBRELLENADO:**

Debido a la expansión del contenido de las latas, éstas se deforman durante la operación del autoclave. La ausencia de vacío en tales latas ocasionan el desbordamiento de las mismas.

Un sobrellenado de las latas es poco probable de que ocurra en empaques eficientemente agotados, ya que cualquier exceso del contenido se derramará de las latas como un resultado de la expansión.

#### **ENMOHECIMIENTO:**

La clasificación de latas que muestran una formación externa de moho requiere de una consideración muy cuidadosa

Si después de la remoción del moho, la inspección con un lente de mano revela que el hierro de la lata está definitivamente picado (con hoyuelos), es admisible clasificar a tal lata como descompuesta ya que el daño de la perforación es grande. Latas que son ligeramente enmohecidas sin picadura notable de el hierro pueden ser consideradas aptas para la venta y consumo inmediatos.

La aplicación de una película externa de laca minimiza la formación de moho, y latas destinadas a largos almacenamientos o expuestas a condiciones climáticas severas se les aplica lata externamente como una medida de rutina.

La formación de moho es particularmente propensa a ocurrir bajo la etiqueta, cuando la etiqueta o la adhesión de la misma contiene sustancias higroscópicas. La formación de moho se hace aparente por la deformación de la etiqueta.

Un enfriamiento excesivo de las latas después del proceso también dá lugar a la formación de moho.

#### DANOS:

Aparte de otras consideraciones, una gran significancia bacteriológica debe ser añadida a las latas dañadas por mala manipulación. Los puntos más importantes a considerar son el grado y localización del daño.

Una marcada deformación de las grietas debe ser tomada en cuenta por el riesgo considerable de fugas y latas con este tipo de daño deben ser consideradas como descompuestas. (24, 71)

CAPITULO II

## 1.- CARACTERISTICAS DEL GENERO BYSSOCHLAMYS (7)

El género Byssochlamys pertenece a la clase Ascomyce -  
tes y es caracterizado por la producción de ovho esporas, -  
agrupadas en forma irregular y contenidas en un saco deno-  
minado asca; no presenta un peridio o hifa envolvente ca -  
racterístico del género Gymnoascus.

Se considera un estado transitorio entre las clases -  
Endomycetaceae (con 4 ascosporas) y Gymnoascaceae (con 8 -  
ascosporas).

El estado imperfecto del género lo constituye el gé -  
nero Paecilomyces, cuya especie Paecilomyces varioti es ca -  
si indistinguible del estado conidial del B. fulva.

El género Byssochlamys comprende dos especies: B. ful  
va y B. nivea, ambas capaces de producir ascosporas lo su -  
ficientemente termoresistentes como para sobrevivir al pro -  
ceso térmico dado comúnmente a los alimentos ácidos.

### 1.P Propiedades generales (60, 61)

#### a) Byssochlamys fulva:

El B. fulva fué aislado por primera vez en el año -  
de 1933 por Mamie Olliver y George Smith en frutas proce -  
sadas.

Este moho ha sido cultivado en una gran variedad de -  
medios incluyendo: Czapek-Agar, Papa-Agar, Papa-Sacarosa -  
Agar, Papa-Dextrosa-Agar, Naranja-Suero-Agar.

Para prevenir el desarrollo de bacterias se acidifica el -  
agar o se le agregan sustancias tales como cloranfenicol y  
hexaclorofrno.

Sus colonias crecen bién en la mayoría de los medios -  
sólidos, y mejor en los naturales que en los sintéticos.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C - (86-98.6°F).

Sobrevive al calentamiento por 30 minutos a 85°C y - por 10 minutos a 87.7°C(190°F). (2)

Condiciones de germinación: El tratamiento óptimo para la germinación de ascosporas de B. fulva es dado a 75°C por 10 minutos.

Calor de activación: El calor de activación de las ascosporas de B. fulva es influenciado por la temperatura y el medio nutriente. La máxima activación se obtiene a 60°C y en soluciones de ácido clorhídrico y nítrico. (87)

Producción de ascosporas: Las poblaciones máximas son obtenidas en caldo extracto de malta al 5%, pH=2-3, después de un período de incubación de 7-14 días a 30°C.

Propiedades de ascosporas: Las ascosporas no germinadas son altamente refractiles al ser observadas en el microscopio, pero pierden esta propiedad en la germinación y oscurecen antes de que la hifa emerja.

Las ascosporas varían grandemente en el tiempo requerido para germinar, tal que un campo microscópico cubierto con ascosporas germinadas e hifas, a menudo contiene algunas ascosporas refractiles no germinadas.

(41, 87)

Las ascosporas de B. fulva muestran una resistencia no usual a factores que son letales para la mayoría de los mohos, como son:

a) Baja presión de oxígeno. Pueden crecer en atmósferas a baja presión de oxígeno, tan baja como 0.27% de  $O_2$  a una velocidad de flujo de 10 lts/h; de aquí su habilidad para crecer en latas o botellas de productos de frutas procesadas.

No obstante, no son capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas estrictas.

(86, 91 )

b) Alcohol absoluto. Las ascosporas sobreviven en alcohol absoluto por 30 semanas.

c) Temperaturas bajas. Son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como  $1.7^{\circ}C$ .

d) Sustancias químicas. Se ha reportado que 1,000ppm de solución de cloro, no es suficientemente fungicida para ser efectivo en procedimientos de sanidad normales.

También se ha visto que son resistentes a inmersiones en formaldehído al 10% por 10 minutos, en Lysol al 10% por 30 minutos y en cloruro mercurico al 0.5% por 36 minutos.

(88, 92)

#### Composición química de ascosporas de B. fulva

(3, 57, 70)

#### Composición aproximada

	g/100g de ascospora seca
PROTEINA(cruda)	12.0
PROTEINA(Lowry)	8.1
CARBOHIDRATOS	66.5

LIPIDOS	20.1
CENIZAS	1.4

Como puede observarse los carbohidratos son los mayores componentes químicos, representando aproximadamente un 60% del peso en seco. Los lípidos constituyen aproximadamente un 20% del peso en seco de las ascosporas y las proteínas un 8.1%. El contenido de cenizas representa solo 1.4%.

En la mayoría de los aspectos la composición aproximada de las ascosporas de B. fulva no es diferente a la de otros mohos. Los carbohidratos, por ejemplo, son generalmente los componentes principales de células de mohos. El contenido de lípidos es, sin embargo, comparativamente grande. La mayoría de las esporas de mohos contienen menos de 10% de lípidos, y éstas presentan 20%. (23)

En la tabla 1 se da la composición de ácidos grasos.

Las ascosporas de B. fulva parecen tener un complemento poco usual de ácidos grasos. Muchos ácidos grasos más grandes de  $C_{20:0}$  han sido encontrados en los extractos de esporas. En efecto  $C_{26:0}$ ,  $C_{28:0}$ ,  $C_{30:0}$  y  $C_{32:0}$  son los lípidos predominantes, representando el 57% de los ácidos grasos totales. La mayoría de los lípidos son saturados y tienen cadenas rectas, regularmente con un número par de átomos de carbono. Los lípidos insaturados en las esporas están representados principalmente por  $C_{18:1}$  y  $C_{18:2}$  que dan un 28% del total de ácidos grasos.

La presencia de  $C_{14:0}$ ,  $C_{15:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:0}$ , -

TABLA 1  
 Composición de ácidos grasos de ascosporas  
 de Byssochlamys fulva.

Acido graso	g/g	%FA
14:0	63	0.1
15:0	76	0.1
16:0	1239	1.5
16:1	51	0.1
17:1	23	-0.1
18:0	1054	1.3
18:1	16053	19.3
18:2	6853	8.3
18:3	48	0.1
20:0	118	0.1
21:0	114	0.1
22:0	67	0.1
23:0	143	0.2
23:1	10	-0.1
24:0	1582	1.9
24:1	-	-
25:0	167	0.2
26:0	4701	5.7
27:0	258	0.3
28:0	16260	19.6
28:1	431	0.5
29:0	470	0.6
30:0	19121	23.0
31:0	214	0.3
32:0	7126	8.6
33:0	58	0.1
34:0	4389	5.3
35:0	5	-0.1
36:0	2327	2.8

FA= Acido libre

$C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{18:3}$ ,  $C_{20:0}$  en ascosporas de B. fulva no es sorprendente, ya que estos ácidos grasos son comúnmente encontrados en esporas fúngicas. Sin embargo,  $C_{21:0}$ ,  $C_{23:0}$ ,  $C_{23:1}$ ,  $C_{25:0}$  han sido raramente detectados en esporas fúngicas y  $C_{27:0}$  solo ha sido detectado en esporas de B. fulva. Además, no hay reportes de esporas fúngicas que contengan  $C_{28:0}$ ,  $C_{28:1}$ ,  $C_{29:0}$ ,  $C_{30:0}$ ,  $C_{31:0}$ ,  $C_{32:0}$ ,  $C_{33:0}$ ,  $C_{34:0}$ . En efecto, la presencia de estos ácidos grasos en otros microorganismos es bastante raro.

En la tabla 2 se tiene la composición de aminoácidos.

La lisina es el aminoácido más abundante representando el 14%. Las ascosporas contienen proporciones relativamente más altas de ácido glutámico(10%); tirosina, histidina y metionina son menos abundantes representando c/u menos del 4% del total de aminoácidos. Cantidades moderadas de fenilalanina, glicina, valina, prolina, serina e isoleucina también están presentes. Cisteína no fue detectada aunque pudo deberse a su destrucción durante la hidrólisis ácida. Glucosamina y amoníaco son liberados durante la hidrólisis de las esporas.

En la tabla 3 se tiene el contenido de minerales.

Los minerales más importantes en las ascosporas de B. fulva son fósforo, potasio y sodio representando un 88% del contenido total.

Calcio, magnesio y fierro están presentes en cantidades menores, mientras que solo trazas de zinc y manganeso han sido detectadas.

TABLA 2

Composición de aminoácidos de ascosporas  
de Pyrenochlamys fulva.

Aminoácido	mg/g	%total de aminoácido
Lisina	10.9	14.3
Histidina	2.4	3.1
Arginina	5.4	7.1
Acido aspártico	7.6	10.0
Treonina	4.7	6.2
Serina	3.6	4.7
Acido glutámico	8.0	10.5
Prolina	3.9	5.1
Glicina	4.0	5.2
Alanina	4.5	5.9
Valina	4.0	5.2
Metionina	1.6	2.1
Isoleucina	3.5	4.6
Leucina	5.8	7.6
Tirosina	2.6	3.4
Fenilalanina	4.0	5.2
Total	76.5	
Amoniaco	1.3	
Glucosamina	21.2	

TABLA 3

Composición de minerales de ascosporas  
de Byssochlamys fulva.

Elemento	Me/g
Fosfóro	2284
Potasio	1609
Sodio	1115
Calcio	274
Magnesio	189
Fierro	187
Zinc	29
Manganeso	19
Total	5706

Reportes de estos datos para otros mohos indican que potasio, fósforo y sodio son regularmente los minerales más abundantes.

La presencia de ácidos grasos de cadena larga, permiten a las esporas fúngicas retener el agua necesaria para su sobrevivencia en medio ambientes secos. Los datos aquí recopilados, sugieren que estos juegan un papel en la resistencia de las ascosporas, ya que la resistencia al calor y la presencia de cadenas sustanciales de ácidos grasos de cadena larga son dos propiedades que distinguen a las ascosporas de Byssochlamys sp de la mayoría de las otras esporas fúngicas.

#### Descripción de la especie Byssochlamys fulva Olliver-Smith

Las colonias de B. fulva se extienden rápidamente en Czapek-Agar, cubriendo una caja Petri en siete días, con una profundidad de 0.5 a 1.0 mm a 24°C y de 1.0 a 2.0mm a 30°C; consistiendo al principio de un fieltro basal muy delgado con un crecimiento funiculado superficial fino.

Posteriormente se convierte en una maraña floculosa densa y después se desarrollan unas manchas granulares(ascas) con margen delgado y arácnide durante el período rápido de crecimiento de color amarillo pálido o amarillento a café. Hay exudado escaso o limitado a unas pocas gotas incoloras que al reverso son de color amarillo pálido o pardo.

La estructura de las esporas varía en complejidad, de simples fiálides que nacen directamente en hifas aéreas o bien pueden proceder de hifas ramificadas que terminan -

en simples fiálides, manojos de fiálides o mezcla de ambos; los fiálides se encuentran por arriba de cinco en un manojito, con una porción basal más o menos cilíndrica o abombada.

Las ascosporas son regularmente elipsoidales con dimensiones de  $5.5-7.0 \times 5.0-4.5 \mu$  y la mayoría de  $6.5 \mu$  de longitud.

Conidia ovalada a cilíndrica con dimensiones de  $4.0-9.0 \times 1.5-3.0 \mu$ .

Las colonias en malta-agar crecen algunas veces más rápido que en Czapek y se convierten a menudo en más profundas y más funiculosas.

Las colonias en papa-agar crecen como en Czapek excepto que generalmente son más funiculosas.

Como en el caso de B. nivea el crecimiento es más rápido y típico a  $30^{\circ}\text{C}$  que a  $24^{\circ}\text{C}$ .

(60, 61)

#### b) Byssochlamys nivea (7, 60)

Esta especie fué descrita por Westling en 1909; fué aislada por Gillespy en 1946 de frutas enlatadas y embotelladas, por Lüthi & Hochstrasser en 1952 y Lüthi & Vetschen en 1955 de mosto de uva.

Las ascosporas de B. nivea son menos termoresistentes que las de B. fulva, sobreviviendo 30 minutos a  $75.6^{\circ}\text{C}$  ( $170^{\circ}\text{F}$ ) pero incapaces de sobrevivir 10 minutos a  $82.2^{\circ}\text{C}$  ( $180^{\circ}\text{F}$ ).

Condiciones de germinación: La germinación de ascospo

ras de B. nivea requiere de un choque térmico a 75°C por 5 minutos y de ión acetato. La germinación es incrementada por aereación y pH entre 4.0 y 4.5.

Las ascosporas de B. nivea exhiben distintos requerimientos de ión acetato para estimular la germinación.

Butler ha reportado estimulación de germinación por ión acetato en Sordaria fimicola y se ha encontrado que es debido a un efecto de pH. Sin embargo, Lilly, Barnett y Krause han encontrado que el ión acetato estimula a las esporas de Phicomycetes blakesleeanus y afirman que el acetato entró a las esporas y activó a las reacciones de germinación sin choque térmico.

Esta explicación podría ser aplicada a B. nivea excepto que un choque térmico es necesario, lo cual indica que la permeabilidad de la pared de la espora es alterada antes de que el ión acetato sea capaz de entrar, o que un inhibidor es destruido antes para que el acetato pueda ser utilizado.

El ciclo del ácido tricloroacético (TCA), es sugerido como un sistema clave, debido particularmente al rápido incremento en requerimientos de energía en la germinación y la necesidad de oxígeno, como es mostrado por la reducción de la germinación con el incremento en el nivel de dióxido de carbono. (7)

El acetato, entonces es un compuesto requerido para iniciar el ciclo TCA, el cual producirá la energía necesaria para iniciar la germinación. (6)

Otro tratamiento óptimo para la germinación de ascos-

poras de B. nivea es un choque térmico a 75°C por 5 minutos, el cual es similar al tratamiento dado al B. fulva. (73, 99)

Descripción de la especie Byssochlamys nivea Westling (60)

Las colonias de Byssochlamys nivea cultivadas en Czapek-Agar a 30°C se extienden rápidamente, cubriendo una caja Petri en siete días; consistiendo al principio de un flóculo suelto a un funículo enmarañado, convirtiéndose en una maraña densa con algunos manojos funiculosos ligeros, su apariencia es casi granular con margen delgado y aracnoide durante el período de crecimiento.

Las colonias son blancas o casi blancas, convirtiéndose débilmente amarillosas.

Estructuras conidiales escasas, ascas numerosas y conglomeradas, globosas o subglobosas de 8.5-10.0 $\mu$  X 7.5-9.5 $\mu$  conteniendo ocho esporas; las escosporas son suaves, regularmente elipsoidales de 5.5-6.0 $\mu$  X 3.2-3.8 $\mu$ ; las aleuriosporas son típicas (macrosporas) ligeramente abundantes de 4.7 X 2.5-5.0 $\mu$ .

Las colonias en malta-agar a 30°C son similares a las colonias en Czapek, pero crecen más rápidamente y algunas veces forman flóculos más densos cuando son jóvenes; las estructuras conidiales generalmente son evidentes, las más complejas se desarrollan sobre varias espirales de fiálides; los conidióforos cuando están presentes tienen un diámetro de 2.0 a 3.0 $\mu$  y una longitud de 15.0 a 300.0 $\mu$ , algunas veces divididos; los fiálides con base abombada y conectados a la mitad de su longitud a un tubo largo y del -

gado de aproximadamente  $1.0\mu$  de diámetro, muy variable en longitud, de  $8.0-19.0\mu$  y  $1.6-3.0\mu$  de diámetro en la parte más ancha; conidio ancho, elipsoidal, a menudo con una terminación ligeramente plana de  $3.8-6.0 \times 2.5-5.0\mu$ ; están presentes aleuriosporas pero no muy abundantes; ascas y ascosporas como en Czapek-Agar.

Las colonias en papa-agar a  $30^{\circ}\text{C}$  son similares a las de Czapek excepto que las estructuras conidiales son algunas veces más abundantes.

En todos los medios el crecimiento es mejor y más típico a  $30^{\circ}\text{C}$  que a  $24^{\circ}\text{C}$ ; de aquí que las descripciones hayan sido hechas en cultivos desarrollados a esta temperatura.

## Factores que afectan la termoresistencia de las ascosporas

### a) Medio de calentamiento

La termoresistencia de las ascosporas es influenciada por la reacción del medio en el cual son calentadas.

En la figura 1 se tienen los resultados de varios experimentos en los cuales las esporas fueron calentadas en soluciones amortiguadoras cubriendo un amplio rango de valores de pH.

Como puede observarse en la figura, la termoresistencia es más grande a valores de pH=5.0. Es interesante notar que en el proceso de enlatado de cerezas y de fresas el pH del jarabe tomado a la mitad de la cocción varía de pH=2.9 en cerezas y pH=3.8 en fresas.  
(29, 71)

### b) Concentración de sacarosa (30)

La concentración de sacarosa en la solución en la cual la asca es suspendida tiene un efecto considerable en su termoresistencia.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de germinación, después de 40 horas de incubación, de ascas que han sido tratadas en solución de sacarosa a varias concentraciones. Puede observarse que el incremento en la concentración de azúcar tiene una acción protectora en la asca, tendiendo a ser más resistente en el tratamiento térmico.

## Factores que influyen en la germinación de ascosporas y crecimiento micelial

### a) Temperatura

Los siguientes datos ilustran el efecto de la temperatura de incubación en la germinación de ascosporas precalen-

FIG. 1

Efecto del medio nutriente (pH), en la termoresistencia de ascosporas de *Byssochlamys fulva*.

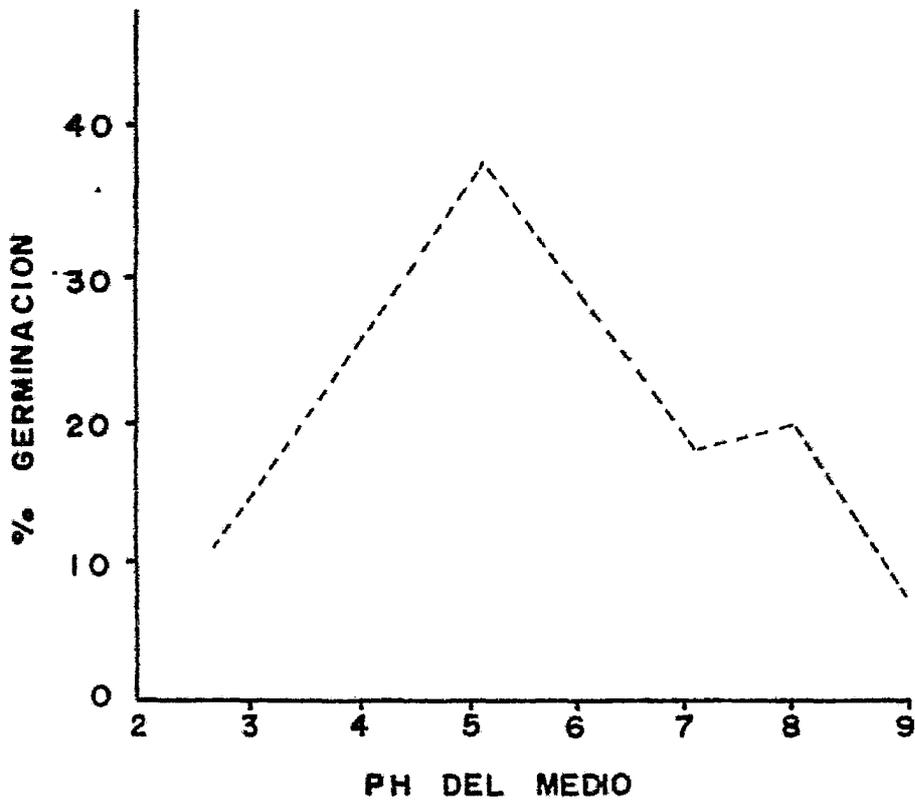


TABLA 4

Efecto de concentración de sacarosa en termorre-  
sistencia de ascosporas de Pyssochlora fulva.

% de sacarosa	% germinación			
	tpo. calentamiento a 84-5°C (min)			
	5	10	20	30
0	-	65	21	1
5	-	62	5	1
10	-	77	16	11
30	-	-	37	15
65	-	-	-	75

tadas a  $75^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

A  $32$  y  $38^{\circ}\text{C}$  la germinación empieza después de 10 y - 15 horas respectivamente, la mayoría de las ascas germinan simultáneamente y las remanentes poco tiempo después.

A  $25$  y  $20^{\circ}\text{C}$  la germinación ocurre dentro de 24 y 43 - horas respectivamente.

A  $15^{\circ}\text{C}$  no hubo germinación en 87 horas.

El crecimiento en papa-dextrosa-agar es rápido a  $35^{\circ}\text{C}$  aumentando a 3.6cm en tres días. Con disminución de la temperatura, el crecimiento también disminuye progresivamente y a  $15^{\circ}\text{C}$  es muy lento.

A  $8^{\circ}\text{C}$  no hay crecimiento.

La temperatura óptima para la germinación de ascosporas y crecimiento micelial está en las proximidades de  $35^{\circ}\text{C}$ .  
(30)

#### b) Concentración de sacarosa (36)

Tanto la germinación de ascosporas como el crecimiento micelial se llevan a cabo a altas concentraciones de azúcar - car.

Ascas, previamente calentadas a  $75^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, - fueron colocadas en cajas Petri con agar y conteniendo varias concentraciones de sacarosa hasta un 70%.

Se observó germinación dentro de 18 horas en las cajas Petri que contienen concentraciones de sacarosa hasta de 50%, y en las cajas remanentes después de 37 horas. La germinación fué más rápida en las cajas con concentraciones

de 20% que en las cajas de 0 a 40%.

La concentración de sacarosa en frutas enlatadas es - usualmente del 30%, y esta concentración no causaría una - disminución pronunciada del crecimiento micelial.

#### c) pH

Las ascosporas fueron calentadas en cajas Petri con papa-dextrosa-agar y el medio se ajustó a valores de pH en - tre 1.8 y 8.0. No se observó germinación a pH=1.8 pero sí - en todos los demás valores de pH. La germinación más rápida y el mayor crecimiento micelial se llevó a cabo a pH=3.5 Este valor de pH es cercano al valor de pH=5.0 al cual la - máxima termoresistencia fué obtenida.

#### d) Antisépticos

La asca muestra una resistencia muy marcada a los anti - sépticos.

Una suspensión de esporas fué sumergida en soluciones de varios antisépticos, centrifugada después de un tiempo - dado y las esporas lavadas en agua destilada estéril. Fué observado crecimiento después de la inmersión en:

- Formaldehído 10% por 10 minutos
- Lysol 10% por 30 minutos
- Hipoclorito de sodio 0.5% por 10 minutos
- Cloruro mercúrico 0.5% por 36 minutos

#### e) Concentración de CO<sub>2</sub>

Ascosporas colocadas en cajas Petri con papa-sacarosa - agar y en extracto de manzana en atmósferas con diferentes concentraciones de dióxido de carbono, disminuyeron su -

crecimiento y retardaron su germinación a concentraciones superiores de 60%. El moho es entonces relativamente insensible al dióxido de carbono.

#### f) Deseccación

Las ascosporas no son fácilmente destruidas por la deseccación. Tubos de cultivo conservados en condiciones secas por 4 años han producido crecimiento en subcultivos.

#### Producción de enzimas:(75)

El crecimiento del moho es acompañado por la producción de enzimas pécticas, que causan el rompimiento de los tejidos de las frutas.

Las enzimas producidas son:

- Pectinesterasa
- Poligalacturonasa
- Arabanasa
- Galacturonasa

CAPITULO III

## 1.- IMPORTANCIA ECONOMICA DEL GENERO BYSSOCHLAMYS (7)

El género Byssochlamys y en su forma imperfecta Paecilomyces, ha sido encontrado en una gran variedad de sustratos y en todas partes del mundo.

Su principal importancia económica es el daño que causa a toda clase de materiales orgánicos.

Frutas enlatadas y embotelladas (jugos, bebidas de frutas, concentrados, pudines, frutas en almíbar, rellenos para pies) son dañadas por el Byssochlamys fulva, el cual destruye las pectinas y causa desintegración de la fruta (diversas variedades de: cerezas negras, duraznos, fresas, frambuesas, grosellas, manzanas, melones, uvas).

Se ha observado que el daño se produce en frutas dañadas o lavadas, no así cuando se encuentran enteras.

Se ha encontrado al Paecilomyces varioti, descrito como Penicillium divaricatum en mantequilla Manitoba, como Penicillium mandschuricum en Brandy de sorgo y como Penicillium viniferum en jugo de uva.

Raper & Thom encontraron Paecilomyces sp en huevos de gallina, margarina de nuez, productos de soya en China, pan en Arabia y en soluciones de quinina.

El P. varioti causa una coloración amarilla en la madera de roble.

Bakhtin encontró que el P. varioti descrito como Spicaria elegans causa daños en libros de la Biblioteca Pública del Estado de Leningrado y ha sido usado por Lavers & Illman como un microorganismo de prueba en una investigación del incremento en la transmisión de vapor de agua de materia -

les de empaque causado por el crecimiento de mohos.

También ha sido aislado de papel secante y de papel - filtro, en hilados de algodón y en productos de cuero.(5)

### 1.1 Descomposición de alimentos enlatados

Poco se sabe acerca del efecto de la composición de - las frutas en cambios específicos que ocurren en éstas des - pués de la infección con Byssochlamys.(89, 93)

El crecimiento del B. fulva fué examinado en mitades - de durazno de las variedades "Loring" y "Babygold 6" proce - sadas en un jarabe de sacarosa de 40<sup>o</sup> Bx, separadas de las - latas e infectadas con este microorganismo.

La producción de ascosporas y los cambios en sólidos - solubles, sólidos totales, pH, acidez total, pectinas tota - les, pectinas solubles en agua y textura fueron determina - dos 2, 4, 8.y 16 días después de la infección.

(76)

Los datos del análisis para determinar la producción - de ascosporas son mostrados en la tabla 5.

Se observa que la velocidad de producción de ascosporas y - el número total producido tienden a variar con diferentes - tipos de B. fulva y con las condiciones ambientales.

La concentración de azúcar en la fruta también puede - afectar a la velocidad y al número total de ascosporas pro - ducidas.

En un estudio realizado por Rice & Beuchat observaron que incrementando la concentración de sacarosa de 1% a 5% - en un medio líquido definido la producción de ascosporas →

TABLA 5

Producción de ascosporas por B. fulva en duraznos enlatados.

variedad de durazno	nivel de madurez	tiempo después de la infección (días)				
		2	4	8	16	
Loring	inmaduro	2.5	5	5	660,000	
	maduro	ND	ND	2.5	9,600	
Babygold 6	inmaduro	10	2.5	ND	1,800	
	maduro	110	5	7.5	2,800	

ND= no detectado.

se incrementa también grandemente. Otros investigadores - han observado que la producción de ascosporas por B. fulva puede ser inhibida a altas concentraciones de azúcar(20-30%)

Beuchat y Toledo reportaron que el crecimiento de ascosporas de B. nivea en varios jugos y néctares de frutas - fué retardado por concentraciones elevadas de sacarosa.

Aunque la concentración de azúcar de las mitades de - durazno utilizadas en este estudio fué inicialmente de 17-22%, no se observó inhibición de producción de ascosporas.

La cuantificación inicial de ascosporas en la varie - dad de duraznos Babygold después de dos días de incubación, es relativamente alto y puede ser debido a la presencia de ascosporas no germinadas en el inóculo.

Los cambios en acidez total de los duraznos control - e inoculados son mostrados en la figura 2.

La variedad Babygold madura fué mas baja en acidez que las otras muestras, mientras que la variedad Loring inmadura - fué más alta.

Hubo poco cambio de pH en los duraznos debido al cre - cimiento del B. fulva como puede observarse en la tabla E.

Aparentemente el microorganismo usa primariamente a - zúcares como fuente de energía para su crecimiento y no u - tiliza ácidos orgánicos, debe considerarse la producción - de amoníaco, la cual causaría también cambios en el pH.

La ausencia en cambio de pH confirma las observacio - nes en medidas de acidez total, lo cual indica que el meta - bolismo de azúcares por el microorganismo no resulta en la

FIG. 2

Cambios en acidez total en mitades de durazno infectadas con *Byssochlamys fulva*.

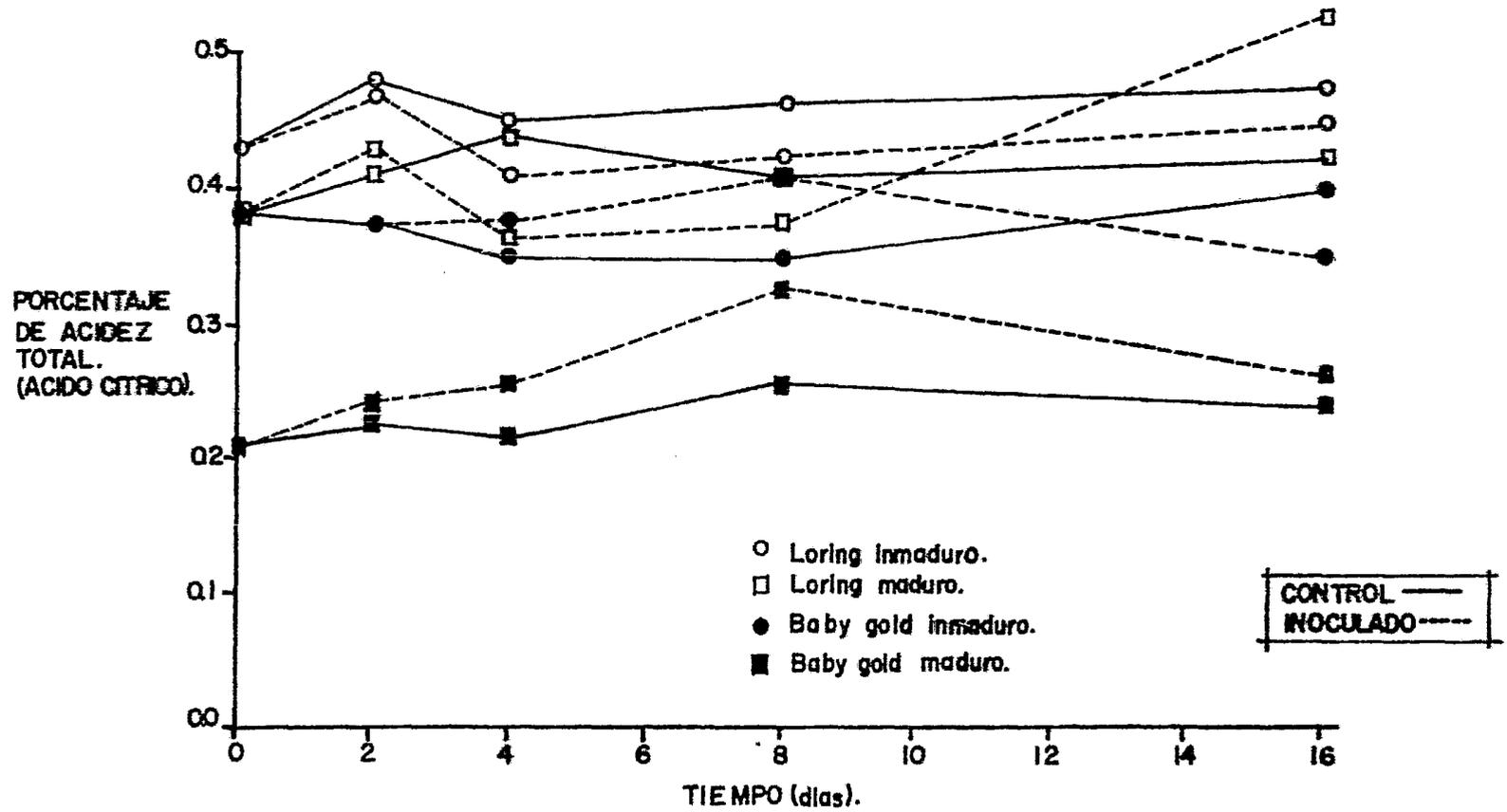


TABLA 6

Medidas de valores de pH de duraznos enlatados infectados con B. fulva.

variedad de durazno	nivel de madurez	tiempo después de la infección(días)				
		0	2	4	8	15
Loring	inmaduro	3.59	3.66	3.75	3.98	4.12
	maduro	3.65	3.65	3.92	4.05	3.82
Babygold 6	inmaduro	3.66	3.70	3.98	4.10	3.99
	maduro	4.03	3.98	4.22	4.05	4.10

acumulación de ácidos orgánicos.

Los cambios en sólidos totales en el control y duraznos infectados son mostrados en la figura 3.

Algunas fluctuaciones se notan en los controles pero los sólidos totales de las mitades de durazno infectadas muestran un decremento considerable con el tiempo. Este decremento es especialmente notable después de catorce días de incubación.

La disminución en sólidos totales es acompañada por un decremento significativo en sólidos solubles, como se observa en la figura 4.

Ya que los sólidos solubles forman un gran porcentaje de los sólidos totales, cambios en uno son acompañados con cambios en los otros.

El decremento en sólidos solubles puede ser atribuido a la utilización de sacarosa por el B. fulva durante el crecimiento y producción de ascosporas.

Los sólidos totales decrecen en parte como un resultado de la volatilización de los sólidos solubles durante el metabolismo.

La variedad Loring presenta niveles más bajos de sólidos totales y solubles, en relación a la variedad Babygold; sin embargo, esto puede ser atribuido en parte a un nivel inicial de sólidos más bajo.

Los cambios en pectinas totales de duraznos enlatados infectados con B. fulva se muestran en la figura 5.

El contenido de pectinas totales declina rápidamente después de dos días y se nivela en aproximadamente 0.06-0.08% después de ocho días. A los cuatro días el porcentaje de

FIG. 3

Cambios en sólidos totales en mitades de durazno infectados con *Byssochlamys fulva*.

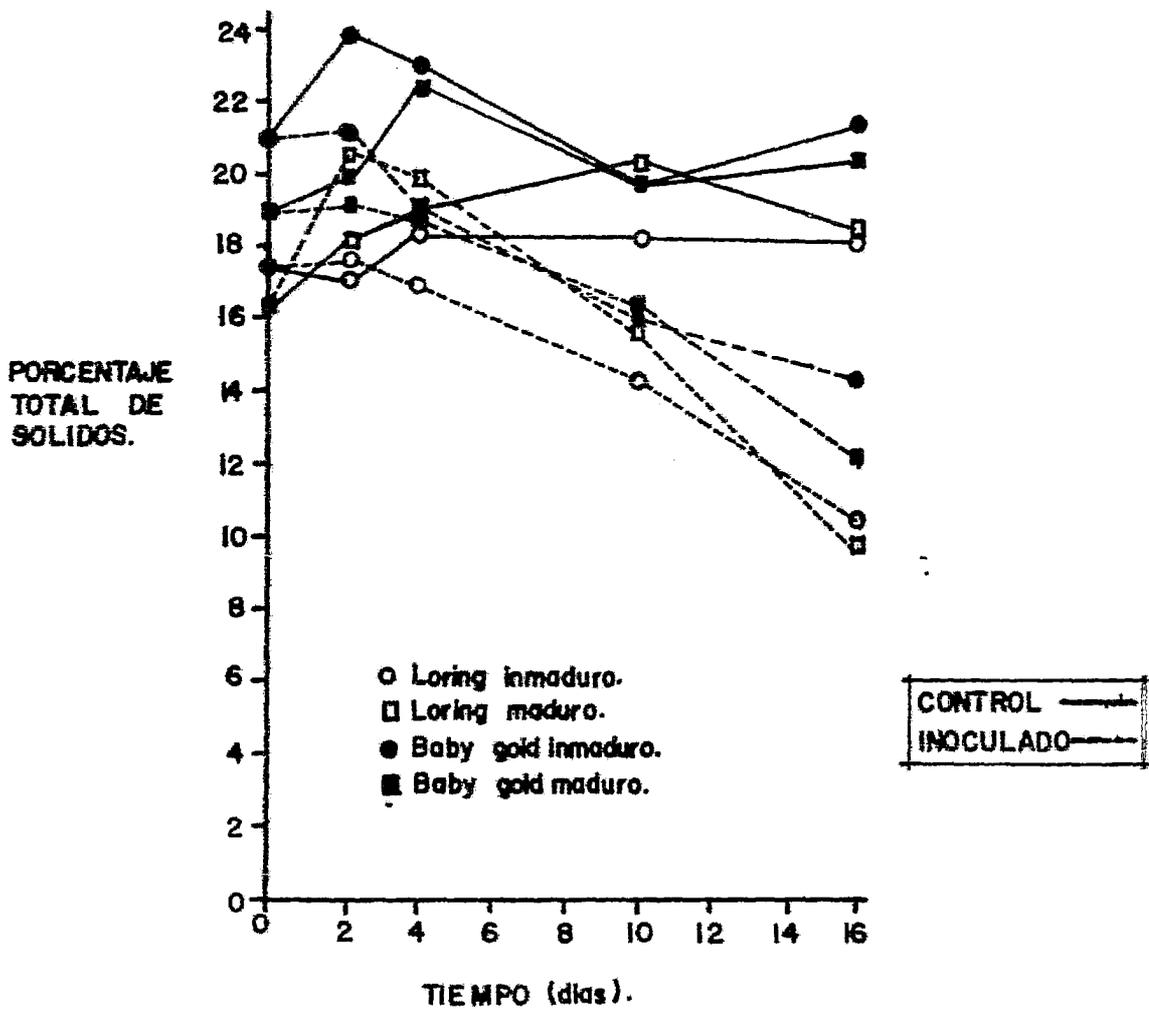


FIG. 4.

Cambios en sólidos solubles en mitades de durazno infectados con *Byssochlamys fulva*.

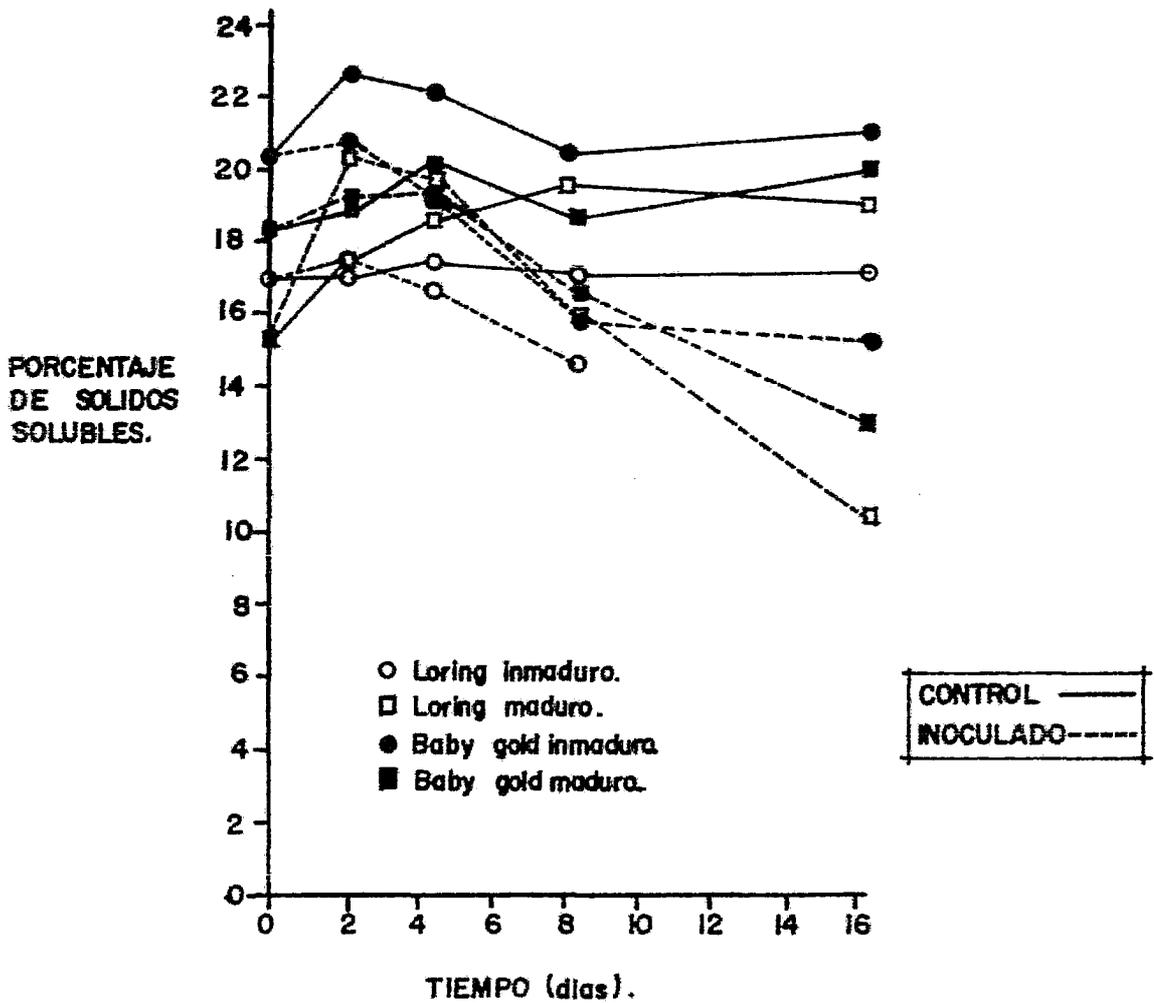


FIG. 5.

Cambios en pectinas totales en mitades de durazno infectados con *Byssochlamys fulva*.

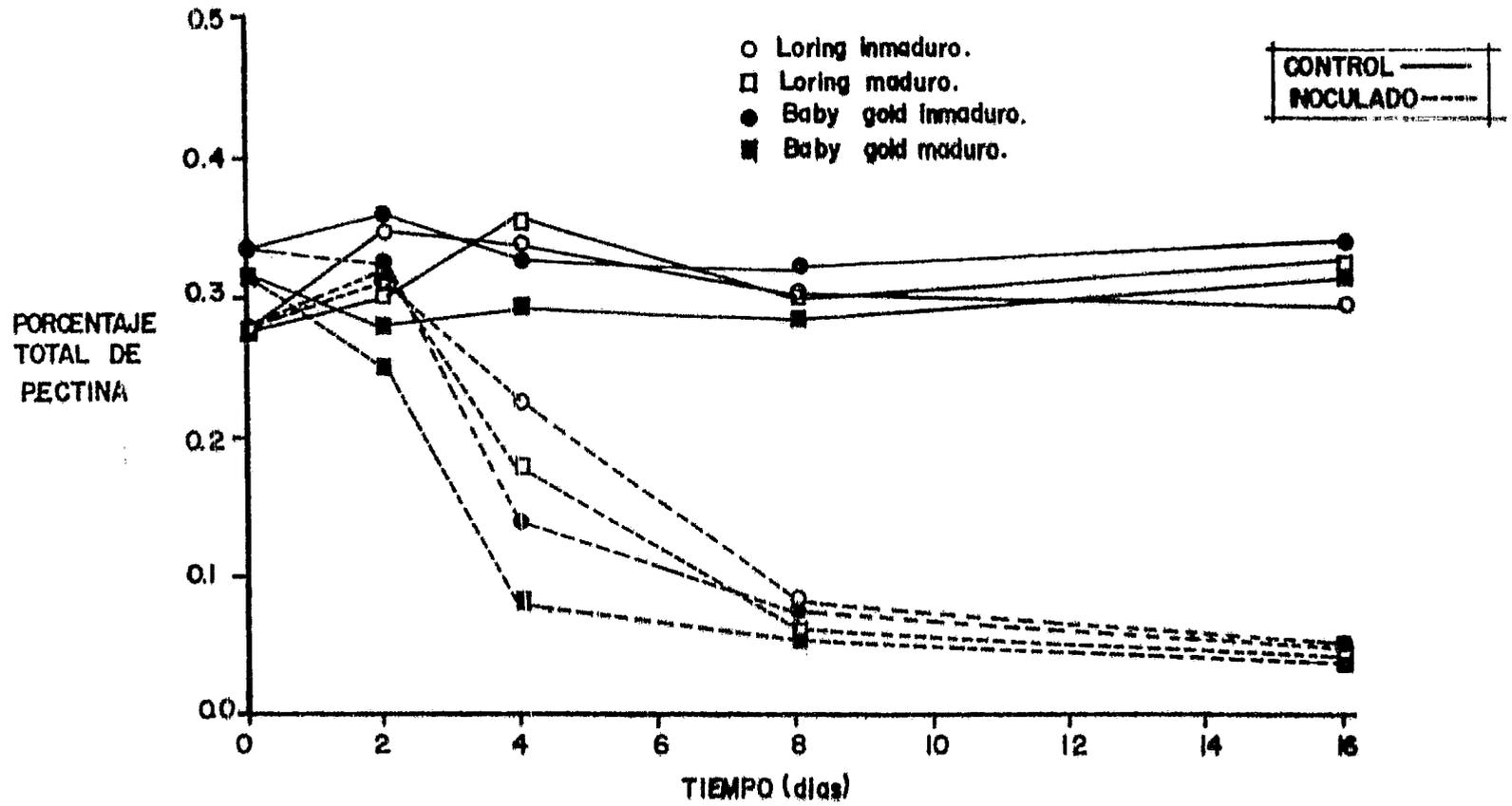
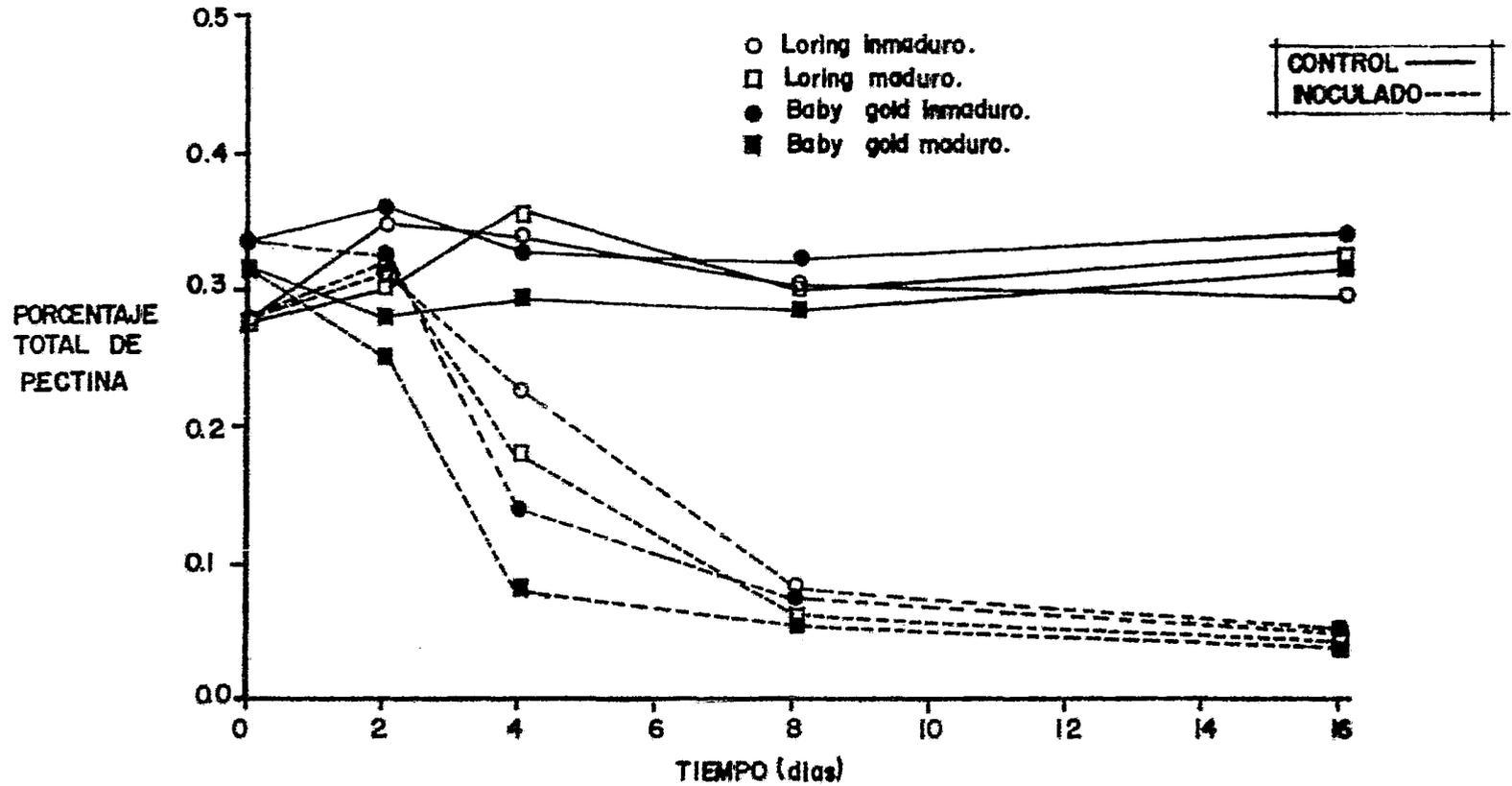


FIG. 5.

Cambios en pectinas totales en mitades de durazno infectados con *Byssochlamys fulva*.



pectinas totales en las mitades maduras inoculadas de cada variedad decreció más rápido y fueron significativamente más bajas que sus respectivas contrapartes inmaduras. La variedad Babygold mostró un decremento más rápido que la variedad Loring.

En la figura 6 se observa un incremento significativo en pectinas solubles en agua después de dos días del crecimiento del moho, seguido por un decremento, el cual es paralelo al decremento en pectinas totales.

Se observa la misma tendencia en cambios para las pectinas solubles en agua como para las pectinas totales después de cuatro días de la infección con B. fulva.

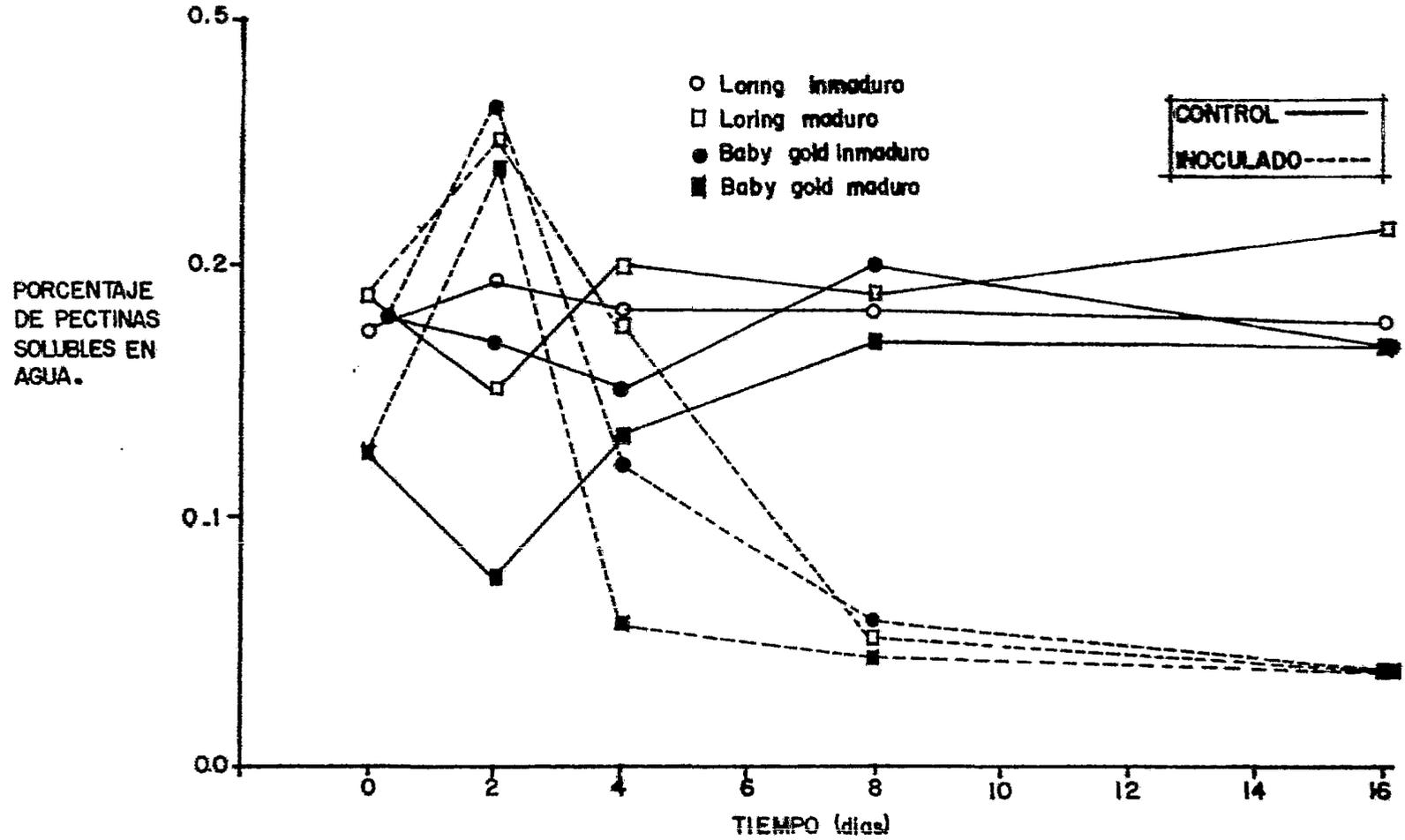
Aparentemente el microorganismo inicialmente produce enzimas pécticas que hidrolizan las pectinas para producir primariamente una fracción soluble en agua sin cambiar el contenido de pectinas totales. Después de dos días el microorganismo ha metabolizado suficientes sustancias pécticas para dar un notable decremento en pectinas totales.

De lo anteriormente expuesto podemos resumir que el B. fulva es capaz de crecer en mitades de durazno enlatadas, causando cambios sustanciales en su composición.

La producción de ascosporas se lleva a cabo después de ocho días de la infección. Se observa poco cambio en el pH y acidez de los duraznos. La suavidad de los duraznos ocurre solo con un incremento en las pectinas solubles en agua. También ocurre un decremento general en pectinas totales.

FIG. 6

Cambios en pectinas solubles en agua en mitades de durazno infectados con *Byssochlamys fulva*.



Parece existir una relación entre la variedad y madurez de los duraznos y la habilidad del B. fulva para alterar el contenido de pectinas y la textura durante la infección. Debido a la acidez más baja y a un valor ligeramente más alto de pH de la variedad Babygold madura, el B. fulva es capaz de crecer más rápidamente en esta variedad, resultando en un decremento más rápido de las pectinas totales.

La velocidad de crecimiento en la variedad Babygold también es favorecida por los niveles iniciales más altos de sólidos solubles. De igual forma, la variedad Loring inmadura con su alta acidez retarda la velocidad de crecimiento del B. fulva y los decrementos en pectinas totales son más lentos.

Muestras de fresas frescas y fresas enlatadas fueron examinadas para detectar la presencia de mohos. (16)

Las fresas frescas fueron seleccionadas de dos sitios conocidos A y B o compradas comercialmente al igual que las fresas enlatadas.

Se encontró que seis de ocho muestras de fresas frescas contienen Byssochlamys o Paecilomyces y las tres muestras de fresas frescas comerciales mostraron la presencia de B. fulva. Seis de dieciocho muestras enlatadas mostraron organismos mohosos viables.

La infección de fresas frescas con B. fulva demostró que los microorganismos solo pueden crecer en frutas que están dañadas, lavadas o que tengan el cáliz removido.

La infección se hace manifiesta por un característico color y sabor desagradables, observándose la desintegración-

de las fresas después de seis y doce meses de procesadas. Esta desintegración es causada por enzimas pectinolíticas - producidas por el crecimiento del moho. (18)

La descomposición de las fresas es acompañada por un lento decremento de vacío pero el pH no cambia significativamente. Estos cambios se observan después de 3, 6 y hasta 25 meses de almacenamiento. (79)

El efecto del medio en la sobrevivencia del B. fulva - fué estudiado por el calentamiento de esporas en agua o jugo de fresas, en ambos casos con y sin adición de sacarosa - en concentraciones menores o igual al 40%.

La completa inactivación de esporas fué alcanzada solo con adición de sacarosa (10-20%) y la más rápida inactivación fué observada en jugo de fresa + 20% de sacarosa. (16,-17)

Sorprendentemente, el moho más comúnmente aislado de latas y botellas de fresas desintegradas fué Byssochlamys nivea, pero dado que las ascosporas de B. nivea son mucho menos resistentes al calor que las de B. fulva, la descomposición por B. nivea no es considerada importante en frutas enlatadas.

Sin embargo, Lüthi & Hochstrasser han demostrado que el B. nivea sobrevive a calentamientos por 2 minutos a 90°C (99)

Investigaciones posteriores han demostrado que la resistencia al calor de las ascosporas de B. nivea es aproximadamente la misma que la de B. fulva (sobrevive después de 10 minutos a 87.5°C, pero se destruye después de 10 minutos a 90°C), por lo que su importancia en la descomposición

de frutas enlatadas ha cobrado relevancia. (72)

Olliver & Rendle observaron que el B. fulva crece fácilmente en jugos de fruta de reacción ácida y de aproximadamente 10% de contenido de sacarosa. Es por tanto, que jugos comerciales libres de preservativos fueron inoculados con este microorganismo para demostrar si su crecimiento se llevaba a cabo; encontrándose que el B. fulva es capaz de desarrollarse en: jugo de ciruela pasa, jugo de piña, jugo de arándanos y néctar de durazno. (36)

Se ha encontrado que el B. nívea es el contaminante más común de las uvas de California, lugar que tiene un nivel preponderante en la producción de vinos.

De un modo general, la descomposición de frutas enlatadas y embotelladas se hace manifiesta por una completa desintegración de la textura debido a las enzimas pectinolíticas del moho; mientras que el crecimiento en jugos o bebidas de frutas se hace manifiesta en forma de pequeños grumos, que no se hacen más grandes debido a la ausencia de oxígeno en las latas. (41)

En las latas afectadas la textura de la fruta es muy suave, y con cualquier agitación del recipiente, tal como sucede en su transportación, causa que los tejidos de las frutas se rompan y se conviertan en una masa pulposa. (36)

La desintegración tiene lugar aún cuando las latas se encuentran en los almacenes de servicio. (86)

Por lo general, no hay suficiente producción de gas en el recipiente como para abombar la lata, de tal forma

que las latas afectadas son identificadas hasta que son abiertas. Esto es de gran importancia comercial, ya que tales latas pueden llegar al consumidor y causar perjuicio contra la compañía elaboradora de estos productos y aún contra buenos enlatados en general. (4, 36, 61, 92)

## 1.2 Producción de toxinas. (42, 45, 74)

El Byssochlamys sp produce una variedad de micotoxinas y otros productos metabólicos, algunos de los cuales son solo ligeramente tóxicos, otros son de baja a intermedia toxicidad como la Byssotoxina A, y algunos de relativamente alta toxicidad como es el caso del ácido Byssoclámico y la patulina.

Las micotoxinas son metabolitos fungales secundarios biológicamente activos que poseen estructuras moleculares complejas, que causan cambios patogénicos o anomalías fisiológicas en el hombre y los animales de sangre caliente. Son especialmente importantes entre las toxinas naturales por las siguientes causas:

a) Los hongos productores de toxinas, están ampliamente distribuidos y pueden contaminar a los alimentos.

b) Las micotoxinas pueden persistir en los alimentos afectados aún después de la erradicación fungal.

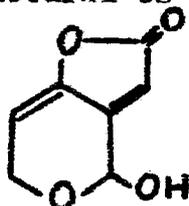
## PATULINA (62, 68, 78, 81, 97)

### a) Propiedades físicas y químicas

La patulina (4-hidroxi-4H-furo-3,2-C-pirano-2(6H)-ona),  $C_7H_6O_4$ , es una lactona heterocíclica  $\alpha$ - $\beta$  insaturada, altamente tóxica y carcinogénica. Es producida por B. fulva,

y B. nivea y por otros mohos tales como Penicillium expansum, P. patulum(P. urticae), Aspergillus clavatus, etc.

Su fórmula estructural es la siguiente:



Su peso molecular es de 154.12 y su análisis proximal -  
C: 54.55% H: 3.93% O: 41.52%.

Son prismas compactos o placas delgadas a partir de éter o cloroformo con punto de fusión de 111°C.

Es soluble en agua y algunos solventes orgánicos excepto éter de petróleo. Es muy soluble en acetato de amilo o de etilo siendo este último un solvente eficiente para la extracción de la patulina en soluciones acuosas.

Cristalizaciones repetidas en éter, benceno, cloroformo, alcohol o acetona transforman a la patulina en un material amorfo insoluble en todos estos solventes así como en agua y ácido acético glacial.

La patulina tiene actividad óptica nula y su UV  $\lambda_{\max}^-$   $\text{HCCl}_3 = 276.5\text{nm}$ .

#### b) Producción de patulina (51, 83, 85)

La producción de patulina en alimentos por microorganismos depende de la temperatura, tamaño de la lesión y material del huésped, también varía entre cepas aisladas de diferentes huéspedes y otros factores ambientales.

Así tenemos que la producción de patulina por los mohos es afectada por el tipo de fruta usada como sustrato.

Por ejemplo, P. expansum fué reportado que produce menos patulina en cerezas dulces y ciruelas que en duraznos y albaricoques.

El B. nivea produce patulina en manzanas dañadas y melones dulces, pero no así en peras dañadas o tomates. (49)

Del mismo modo se ha observado que el B. fulva no produce patulina en jugo de tomate y ciruela pasa; esto puede ser debido a varios factores:

- El jugo de tomate tiene un pH apreciablemente más alto y más bajo contenido de sólidos solubles que otros jugos.
- El jugo de ciruela pasa es hecho por extracción de la fruta seca con agua, y un jugo preparado de esta manera contiene sustancias tales como productos de reacción de os - curecimiento que posiblemente afectan la producción de patulina.

Es también posible que la patulina sea menos estable en jugo de tomate y ciruela pasa en comparación a los otros jugos (uva, pera, manzana, fresa, piña, durazno). Scott y Somers han encontrado que la patulina es más estable en jugo de uva y manzana que en jugo de naranja.

Influencia de la temperatura en producción de patulina

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la temperatura en la producción de patulina por B. fulva en jugo de uva.

De las temperaturas de incubación estudiadas, 18°C resultó ser la temperatura óptima para la producción de patulina después de aproximadamente 25 días. Incrementando la temperatura se redujo marcadamente la cantidad de patulina-

producida.(80)

Somer y colaboradores encontraron que el Penicillium - expansum produce más cantidad de patulina a 5°C que a 20 y 30°C, aunque no se sabe porque la formación de patulina es favorecida por temperaturas bajas. (10)

La biosíntesis de patulina ha sido determinada y aun - que algunas de las enzimas involucradas en su síntesis han sido parcialmente caracterizadas, no se sabe si estas enzimas tienen temperatura óptima que pueda explicar esta observación.

Alternativamente, la explicación puede ser más compleja involucrando el desarrollo de otros sistemas metabólicos secundarios. (83)

Influencia del oxígeno en la producción de patulina.

En una investigación realizada para determinar los efectos de diferentes niveles iniciales de oxígeno y temperaturas en la formación de patulina por B. nivea en jugo de uva Concord embotellado, se encontró que las cantidades mayores de patulina(0.31mg/50ml) se formaron después de 28 días en botellas con un espacio libre de 5.1cm e incubadas a 20°C, y que cultivos de B. fulva y B. nivea produjeron menos patulina en jugo de uva envasado en botellas con espacios libres de 2.5 y 1.3cm.

### c) Biosíntesis de patulina

La ruta metabólica propuesta para la patulina se ha estudiado profusamente, incluso se considera como un sistema-modelo de la biosíntesis policétida y de la biosíntesis de metabolitos secundarios en general. La ruta metabólica pro-

puesta por Sekiguchi y Gaucher corresponde solo a la porción post-gentisaldehyídica, la porción inicial fué propuesta por Forrester y Gaucher.

La ruta metabólica se muestra en la figura 7.(26, 49,- 54)

d) Toxicidad (21, 22, 28, 50)

Para el estudio de la toxicidad de la patulina se ha hecho uso de los indicadores biológicos. Un indicador biológico es la respuesta medible provocada por el agente en estudio en un organismo o tejido. Entre los indicadores biológicos usados para probar la toxicidad de las micotoxinas se encuentran organismos (animales de experimentación), órganos o tejidos aislados y microorganismos.

Los estudios realizados han dado lugar al descubrimiento de las siguientes características tóxicas:

**Carcinogenicidad:** La patulina induce sarcomas locales en ratas por administración subcutánea en un período prolongado de experimentación. Tiene una potencia carcinogénica - alta-media.(19)

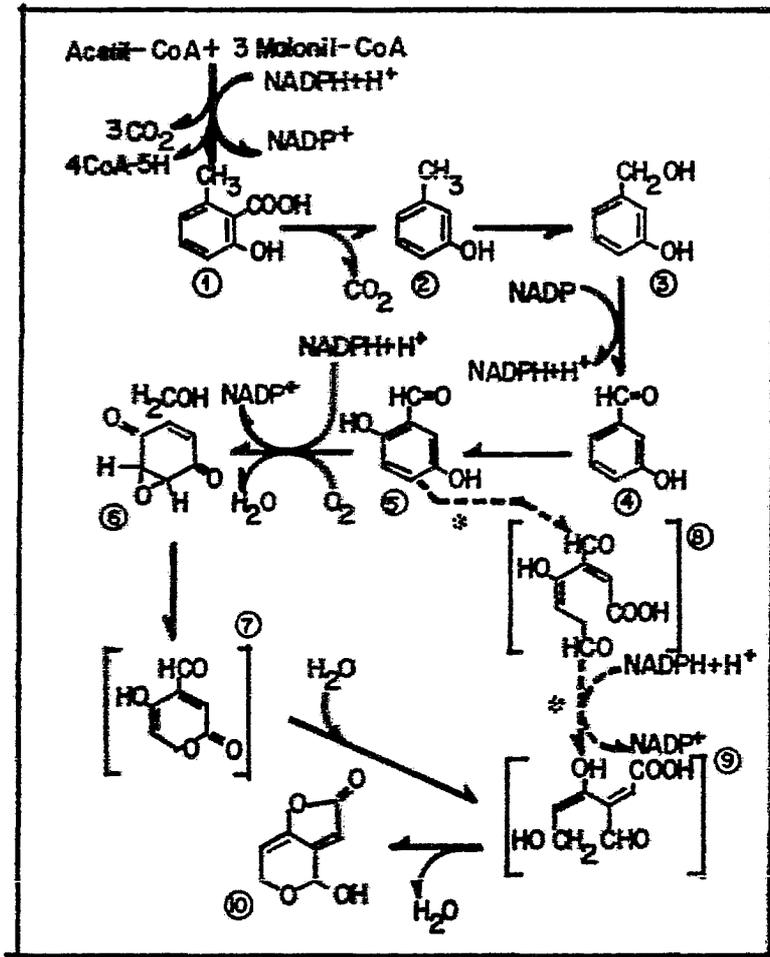
Por vía oral en ratones y ratas no se producen cambios carcinogénicos aparentemente porque estos animales son resistentes a la ingestión de la micotoxina; en pollos se han inducido lesiones hepáticas por ingestión prolongada de patulina. (13)

**Mutagenicidad:** Las propiedades mutagénicas de la patulina se han demostrado mediante el uso de microorganismos y cultivos de células de tejidos animales, vegetales y humanos.

La acción mutágena de la patulina se debe a la inacti-

Fig. 7.

Biosíntesis de Patulina.



- 1.- Acido 6 metil salicílico.
- 2.- *o*-cresol.
- 3.- Alcohol  $\alpha$ -hidroxibencílico.
- 4.-  $\alpha$ -hidroxibenzaldehído.
- 5.- gentisalaldehído.
- 6.- Filostina. (fitotoxina).
- 7.- Intermediario propuesto.
- 8.- Intermediario propuesto.
- 9.- Intermediario propuesto (pre-patulina).
- 10.- Patulina.

\* Las líneas punteadas indican la ruta propuesta anteriormente. Las líneas continuas la ruta propuesta por Sekiguchi y Gaucher.

vación o mutación del material genético.

Entre los efectos más notables se encuentran: la patulina inhibe la división celular, la división nuclear o ambas en bacterias, plantas y cultivo de tejidos, principalmente en la mitosis; en la mitosis de huevos de salamandra causa ruptura cromosomal y alteración de los husos mitóticos; inhibe la síntesis de DNA y RNA, esto se ha demostrado por experimentos con presensores marcados, a un nivel de 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibe la síntesis de RNA en un 30% en el número de hepatocitos de rata, este efecto se explica por la inhibición de las enzimas RNA polimerasa I (31% de inhibición), de la RNA polimerasa II (87% de inhibición) y de la RNA hibridasa (62% de inhibición con 50  $\mu\text{g/ml}$ ), con esto se afecta el proceso de transcripción en la síntesis de proteínas.

También inhibe el paso de elongación, y probablemente el paso de iniciación de la traducción en células HeLa y de Chang de hígado humano y en lisado de reticulitos de conejo. Se ha observado la inhibición de la síntesis de proteínas in vivo, aunque este efecto se debe al impedimento del transporte de aminoácidos a través de la membrana, que produce la patulina.

Otro efecto de la micotoxina es la inducción de un alto porcentaje de células poliploides de leucocitos humanos cuando se exponen a niveles de 0.54  $\mu\text{g/ml}$ .

En forma general, los efectos tóxicos y mutagénicos de la patulina varían con la fase del ciclo de crecimiento de las células tratadas. (95)

Teratogenicidad: El principal indicador biológico empleado para demostrar esta propiedad ha sido el embrión de

pollo en distintas etapas de incubación.

Los efectos teratogénicos se presentan primero en huevos incubados previamente por 4 días, que en los no incubados, la dosis para producir anormalidades es menor para los embriones de 4 días ( $1-2 \mu\text{g}/\text{huevo}$ ) que para los no incubados ( $10 \mu\text{g}/\text{huevo}$ ).

El porcentaje de embriones que muestran efectos teratogénicos es alto (47% de los sobrevivientes) a un nivel de  $1.0 \mu\text{g}/\text{huevo}$ . Los efectos observados varían y predominan el pie deforme, el tobillo volteado, los embriones son más pequeños que el testigo; en casos aislados se presenta exencefalia, exoftalmia y picos cruzados deformes. (9)

En ratas alimentadas con alimentos adicionados de patulina no se han observado efectos teratogénicos marcados, salvo algunos casos de disminución de tamaño en la generación de ratas subsiguiente.

Otros efectos metabólicos y fisiológicos: Las ratas inyectadas con patulina subcutánea e intraperitonealmente sufren edema pulmonar, hemorragia interna y congestión de capilares de hígado, bazo y riñones, elevación de la glucosa sanguínea, edema y degeneración de la corteza cerebral y reducción de la cuenta de linfocitos; en ratones produce síntomas nerviosos, hemorragia cerebral y muerte, así como la producción de tumores en el sitio de aplicación. (13, 19)

La administración oral de patulina en pollos produce: apatía después de una hora de la administración, a las doce horas se produce acumulación de fluido en la cavidad peritoneal y el buche acuoso en el período entre 16 y 48 horas; también se encontró una hemorragia intensa en el tracto

to digestivo, particularmente en proventrículo, molleja e -  
intestino. (49)

Los síntomas en perros después de una dosis oral de -  
10 mg/Kg de peso son: letargia, anorexia, hematemesis, dia-  
rrea, hemorragia pulmonar, edema y hemorragias luminales -  
del tracto gastro-intestinal.

En primates la administración oral de patulina produ -  
ce una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina  
sérica, proporcional a la dosis; se observa también un re -  
chazo de la comida adicionada de patulina a niveles de 5mg/  
Kg que se atribuye a que los monos reconocen el sabor de la  
patulina y lo asocian con una tensión física o un sabor de-  
sagradable. (26)

La patulina causa la inhibición de numerosas enzimas, -  
in vitro e in vivo, entre ellas la adenosin trifosfatasa de  
eritrocitos humanos. Otras enzimas afectadas son: adenosin-  
trifosfatasa  $Mg^{++}$ , la aldolasa y la deshidrogenasa láctica-  
de músculo de conejo, la deshidrogenasa alcohólica de leva-  
dura, la deshidrogenasa succínica, la carboxilasa, la oxi -  
dasa de NADP, la transaminasa sérica del ac. glutámico-oxal  
acetato de ratas y enzimas de la respiración aeróbica. (66)

En general, se tiene que la patulina inhibe reacciones  
de enzimas con grupos sulfhídricos en el sitio activo y con  
el grupo amino de los residuos de lisina. (82)

Existen varios factores que explican el nivel de toxi-  
cidad de la patulina: la hidrólisis de el anillo de la lac-  
tona elimina los efectos inhibitorios de la patulina en la  
enzima y crecimiento celular.

Esta hidrólisis puede resultar de la acción de enzimas digestivas o del pH alcalino del intestino.

Una rápida absorción y división de la toxina y una rápida excreción también son considerados como factores para los bajos efectos tóxicos. Del 30-50% de una dosis oral de patulina es excretada en 24 horas. (77, 78)

Mecanismo de acción: Existen varias hipótesis para explicar el modo de acción de la patulina. Algunos investigadores han propuesto que la patulina reacciona químicamente en los grupos sulfhidrilo de los sistemas enzimáticos o metabólicos vitales. El proceso involucra una reacción de adición tipo Michael del grupo SH al doble enlace de la lactona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada de la patulina. (54)

Se ha encontrado que no ocurre reacción entre la patulina y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que tiene grupos SH en su centro activo. Sin embargo, parece ser la explicación más congruente del efecto de la patulina sobre las enzimas y otros procesos celulares. (10, 20)

Algunos investigadores han propuesto que la patulina se transforma en solución en el agente tóxico verdadero, pero no se ha probado tal hecho. (49, 67, 68)

#### ACIDO BYSSOCLAMICO (20, 25)

##### a) Propiedades físicas y químicas

El ácido Byssoclámico tiene la fórmula empírica  $C_{18}H_{25}O_6$  y un punto de fusión de  $163.5^{\circ}C$ . Esta sustancia reacciona como un ácido tetrabásico, dando sales del tipo  $C_{18}H_{20}O_6Z_4$

Y es probable que este contenida en la solución metabólica como una mezcla de sales de su fórmula general; por acidificación dá el ácido libre  $C_{18}H_{24}O_8$ , el cual pierde dos moléculas de agua para dar  $C_{18}H_{20}O_6$ .

La sustancia pura es insoluble en agua, es ligeramente soluble en alcohol, su solubilidad a temperatura ambiente en varios solventes orgánicos, expresada como gramos de sustancia en 100cc de solvente es aproximadamente: acetona-63, etil acetato 33, cloroformo 20, benceno 7.5, éter 0.33, alcohol 0.3.

Por evaporación lenta de soluciones en acetona o benceno, la sustancia puede ser obtenida en hermosos prismas rectangulares, es insoluble en NaOH fría diluida, pero en caliente se disuelve lentamente, es reprecipitado sin cambio por adición de ácido mineral a la solución alcalina, es disuelto rápidamente en  $HNO_3$  conc. caliente y es recuperado sin cambio por evaporación de la solución, es soluble en  $H_2SO_4$  conc. y es reprecipitado en adición de agua.

El microanálisis da: C: 65.03% H: 6.07%

Tiene un peso molecular de 332.

La rotación específica, empleando una solución al 0.4% en cloroformo es:  $[\alpha]_{25}^{25} +127^{\circ}$  ;  $[\alpha]_{25}^{25} +108^{\circ}$ .

#### b) Toxicidad

Se han llevado a cabo pruebas de toxicidad por el Prof. Topley de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, obteniéndose los siguientes resultados:

Un grupo de cuatro ratones inyectados intraperitoneal-

mente con 25mg de la sal soluble de sodio murieron en 24 - horas.

Un segundo grupo recibió una dosis de 12.5mg, y de estos, uno murió en 24 horas, dos murieron después de dos días y uno después de tres días.

Un tercer grupo fué inyectado con 6.25mg, uno murió en dos días, dos en tres días y uno en seis días.

Se concluye por tanto, que el ácido Byssoclámico es de finitivamente tóxico para los ratones. (74)

#### BYSSOTOXINA A (42, 45, 74)

El B. fulva aislado de maíz, fué cultivado en un medio nutritivo mejorado con trigo por 14 días a 25°C. El extracto del solvente de este cultivo, denominado posteriormente Byssotoxina A, mostró una moderada toxicidad en bioensayos realizados en camarón salado, embriones de pollo y ratas.

##### a) Propiedades físicas y químicas

La Byssotoxina A es insoluble en acetona, benceno, hexano, es ligeramente soluble en cloroformo, etanol y agua, - soluble en metanol y 5% de NaOH caliente y muy soluble en - Me<sub>2</sub>SO(dimetil sulfóxido ó 2-mercaptoetanol). (52)

No es ópticamente activa determinada por polarimetría, - aparece como una simple mancha naranja o rojo naranja en - cromatografía de capa fina, obteniéndose valores de Rf de - 0.5 en tolueno o étil-acetato-ácido fórmico(5:4:1 V/V/V), - de 0.3 en cloroformo.acetona(85:15) y de 0.9 en cloroformo- metanol(40:60).

Dá resultados negativos para ninhidrina y prueba de Biuret antes y después de la hidrólisis con HCl 6N. También dá negativas las pruebas de cloruro férrico e indol, así como también al reactivo Dragendorff, p-aminobenzaldehído y reactivo de Erlich.

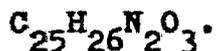
Se obtiene una reacción débil con iodoplatinato, reactivo de fenol y ácido fosfomolibdico, dá un fuerte color azul púrpura en respuesta al  $H_2SO_4$  conc. y a todos los reactivos conteniéndolo dicho ácido. Dá pruebas negativas para aminas primarias y terciarias y resultados positivos para aminas secundarias alifáticas.

El espectro UV de Byssotoxina A muestra una  $\lambda_{MeOH}/max$  de 247nm ( $\epsilon = 50600$ ), 285nm ( $\epsilon = 17600$ ), 356nm ( $\epsilon = 11200$ ) y 472nm ( $\epsilon = 146$ ).

El espectro de resonancia magnética nuclear en  $Me_2SO$  muestra un patrón complejo con una serie de múltiplos no resueltos con centros a 0.9 y 1.2  $\mu g/ml$ .

Al análisis de nitrógeno muestra que contiene dos moles de nitrógeno por mol de compuesto. El análisis de alta-resolución de espectrómetro de masas de el trimetil silil derivado de la Byssotoxina A dá una masa precisa de 474.2354, la sustracción de la masa del trimetil silil coloca la masa nominal de Byssotoxina A como 402.

La fórmula probable fué entonces deducida como:



#### CAPITULO IV

# 1.- METODOS DE LABORATORIO INVOLUCRADOS EN LA DETERMINACION MICROBIOLOGICA DE BYSSOCHLAMYS.

## 1.1 Aislamiento (59, 88, 100)

Se han hecho estudios para determinar la probabilidad de formación de esporas en diferentes jugos de fruta.

Jugos comerciales libres de conservadores, fueron incubados 32 días a 30°C. Los resultados mostraron que la mayoría de los jugos permiten una buena esporulación y que los jugos de ciruela pasa, uva y piña presentan los más altos recuentos. El jugo de arándano, da un conteo relativamente bajo. La presencia de ácido benzoico, un constituyente natural del arándano, puede ser quizás responsable.

King, Michener e Ito han observado crecimiento de B. fulva en los siguientes jugos de frutas enlatados: manzana, uvas Concord, ciruela pasa; néctar de durazno y pera y varias bebidas incluyendo una combinación de uva-manzana y bebida artificial de naranja.

El B. fulva ha sido aislado también de muchas frutas enlatadas y embotelladas, de frutas dañadas, en máquinas cosechadoras, en recipientes para transportar frutas y en el suelo de huertos y viñedos.

Confirmando que el B. fulva no parasita tejidos de frutas enteras (no dañadas); frutas sometidas a calentamiento a 100°C por unos pocos minutos soportaron un crecimiento prolífico y rápido del moho cuando fueron incubadas a 25°C.

El sustrato natural del moho parece ser desperdicios -

de fruta y en vista de las altas temperaturas a las cuales - el hongo crece y produce ascas se asume que el crecimiento - y formación del asca toma lugar durante el verano y que más tarde las ascosporas son diseminadas por el aire. (7, 36)

### 1.2 Identificación de Byssochlamys (88)

Algunos tipos han sido identificados incorrectamente - como Paecilomyces, el estado imperfecto, porque las pocas ascas que son producidas no son detectadas bajo el microscó - pio. Es especialmente difícil observar la asca cuando se han formado gran número de conidios.

Las ascas que aparentemente son más densas que los conidios y las hifas son encontrados al fondo de un tubo después de la homogenización. También son concentrados por una corta homogenización a una baja velocidad.

En la figura 8 se observa la estructura del B. fulva.

### 1.3 Métodos de recuento

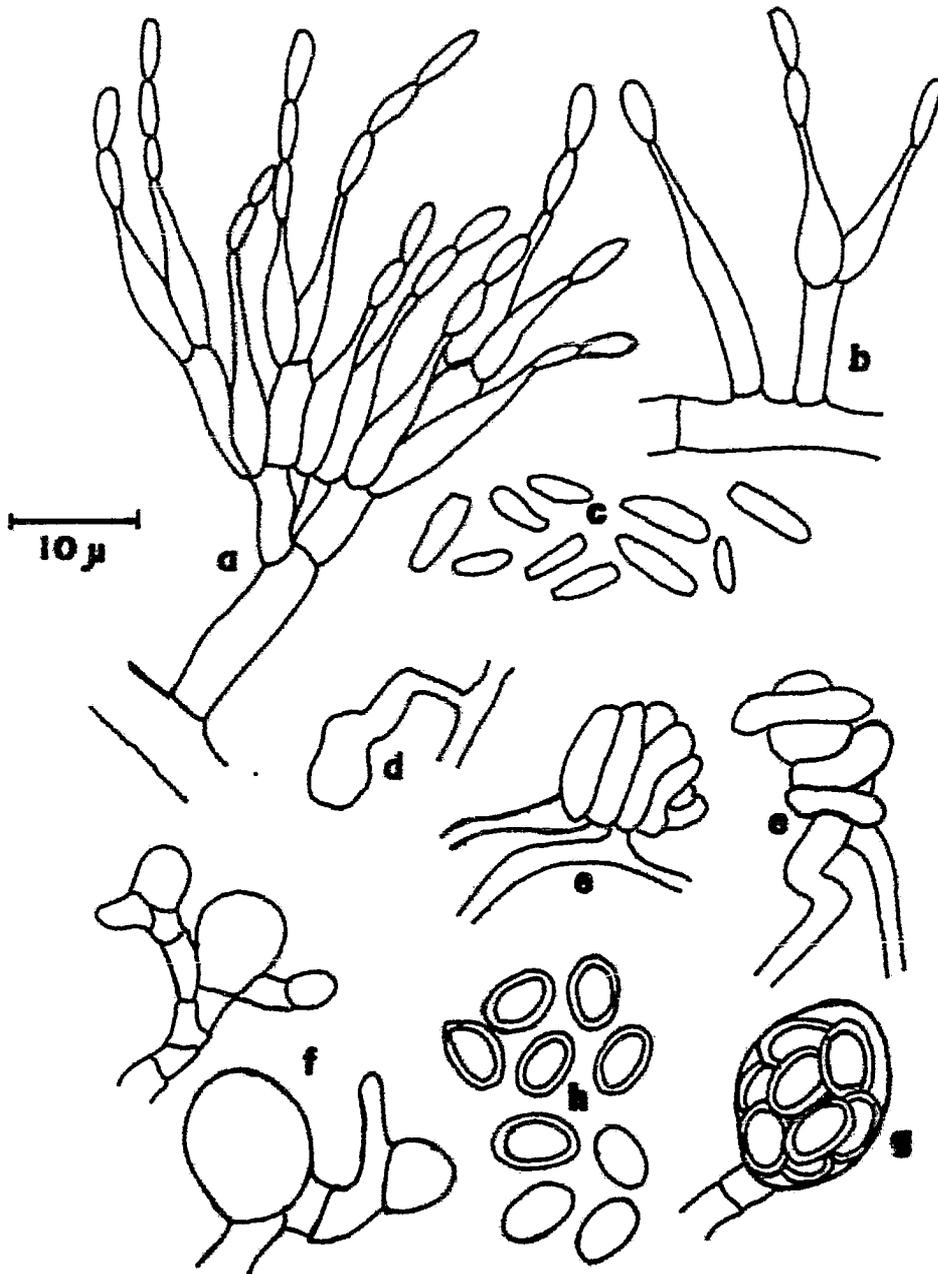
Debido a la baja incidencia de ascosporas de Byssochlamys en muchos alimentos, su detección a menudo depende del uso de muestras relativamente grandes. (35, 39)

El procedimiento para Byssochlamys depende primero del calentamiento de la muestra para activar esporas en letar - go o desactivadas y para destruir microorganismos acidúri - cos.

El material, es entonces cultivado en un medio de a - gar acidificado que permite el crecimiento solamente de mohos: Byssochlamys y raramente Penicillium y Aspergillus sp. (59)

Fig. 8

Estructura de *Byssochlamys fulva*.



a, b.- Estructuras esporuladas.  
c.- Conidia.  
d.- Anteridio.  
e.- Ascas natales iniciales.

f.- Producción de ascas.  
g.- Asca.  
h.- Ascósporas.

El Byssochlamys es reconocido por la estructura de sus conidióforos y por el hecho de que la asca no está encerrada en un peridio. Los conidióforos son como los de Penicillium, pero difieren en que los fiálides elongados terminan en un delgado soporte de esporas que tienden a doblarse afuera del eje principal. (88)

La asca que contiene ocho ascosporas son distinguidas por el color de sus colonias en medio de agar acidificado, después de catorce días de incubación: las de B. nivea son predominantemente blancas, mientras que las de B. fulva son amarillo pálidas. Las colonias en agar se inician como pequeñas zonas de micelio que se extienden rápidamente hasta cubrir por completo la caja.

### 1.3.1 Métodos de recuento en jugos de fruta (89, 91)

Este procedimiento es usado para la identificación y enumeración de bajo número de mohos termoresistentes en una gran variedad de muestras de frutas.

Para minimizar la oportunidad de contaminación, un problema potencial en laboratorios en los cuales el Byssochlamys es cultivado, las botellas mezcladoras generalmente son llevadas al sitio de muestreo.

#### Procedimiento:

Añadir aproximadamente 100g de fruta a una botella es t<sup>er</sup>il y tarada. Volver a pesar, para determinar el peso de la muestra añadida, adicionar 100 ml de agua estéril. Agitar por cinco minutos o hasta que la mezcla sea homogénea. Colocar la botella (encerrada en una bolsa de polietileno) en un baño de agua a 70°C.

Sostener el baño por dos horas, para asegurar que la mezcla estará a la temperatura de equilibrio por lo menos una hora.

Después del calentamiento distribuir el homogenizado en cajas Petri, aproximadamente 10 ml por caja. Añadir volúmenes iguales de papa-dextrosa-agar (PDA), acidificado a pH=3.5 con 10% de ácido tartárico. Mezclar. Asegurar una solidificación adecuada. Contar colo. después de la incubación por 48 horas a 32°C. Reincubar cajas negativas otras 48 horas antes de ser descartadas. (Ver figura 9)

Precauciones: El gran número de cajas Petri, (20 o más) que se utilizan por cada muestra incrementa las posibilidades de contaminación por esporas de otros mohos transportados por el aire. A menudo, los contaminantes son especies reconocibles que no poseen termoresistencia.

### 1.3.2 Métodos de recuento en concentrados de fruta (88, 91)

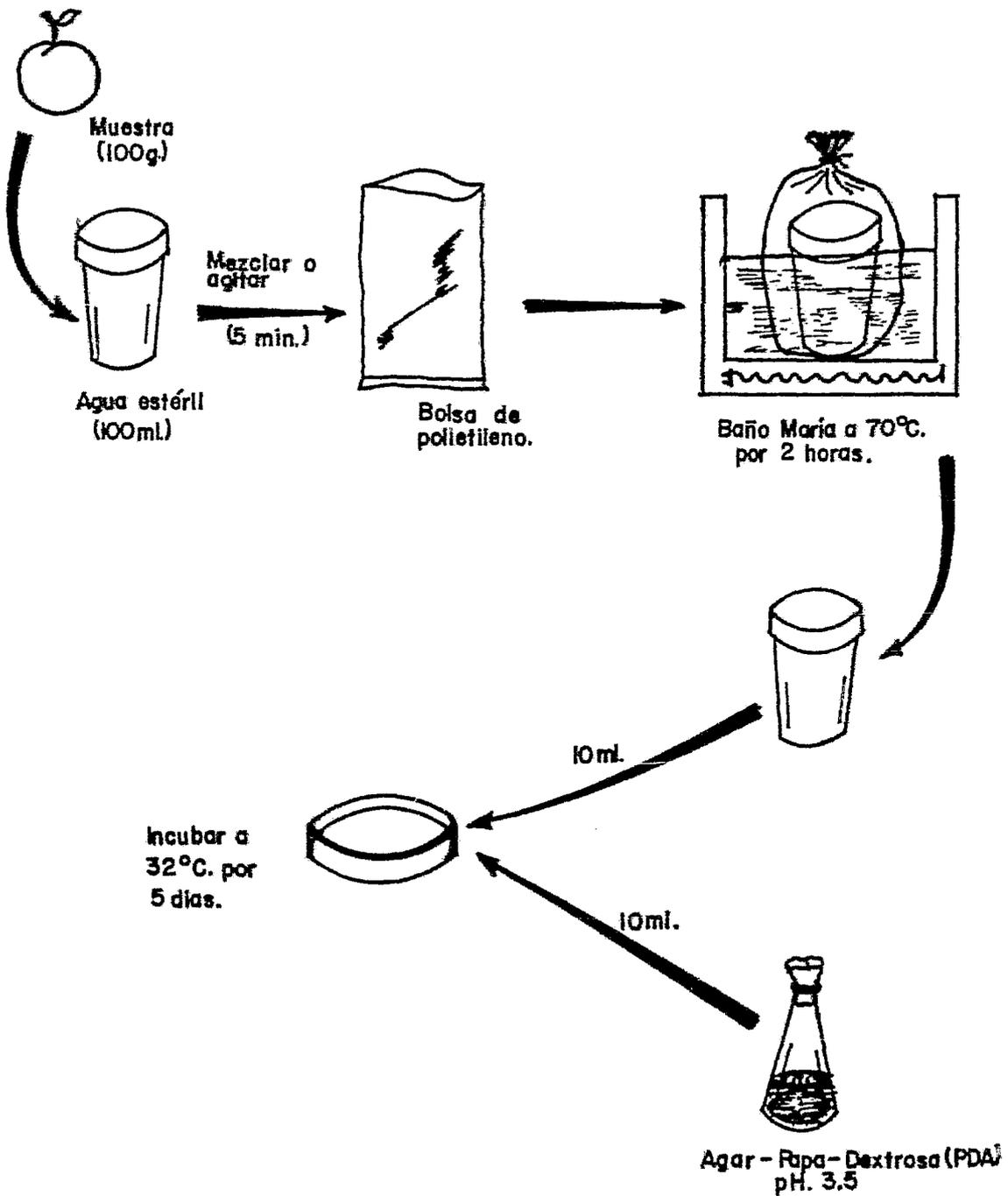
Este procedimiento está modificado para concentrados de frutas tales como uva, manzana y cereza; y bases para jugos hechos a base de estos productos.

Consiste de lo siguiente:

- a) Colocar 50g de producto en una botella estéril de 250 ml.
- b) Añadir 50ml de agua estéril
- c) Realizar prueba de esporas por 30 minutos a 77°C (empezar a contar el tiempo cuando el termómetro alcance esta temperatura)
- d) Enfriar inmediatamente
- e) Distribuir de 30 a 40ml en 4 o 5 cajas Petri, añadir 2% de papa-dextrosa-agar acidificado y mezclar contenidos.

Fig. 9.

Método de recuento en jugos de fruta.



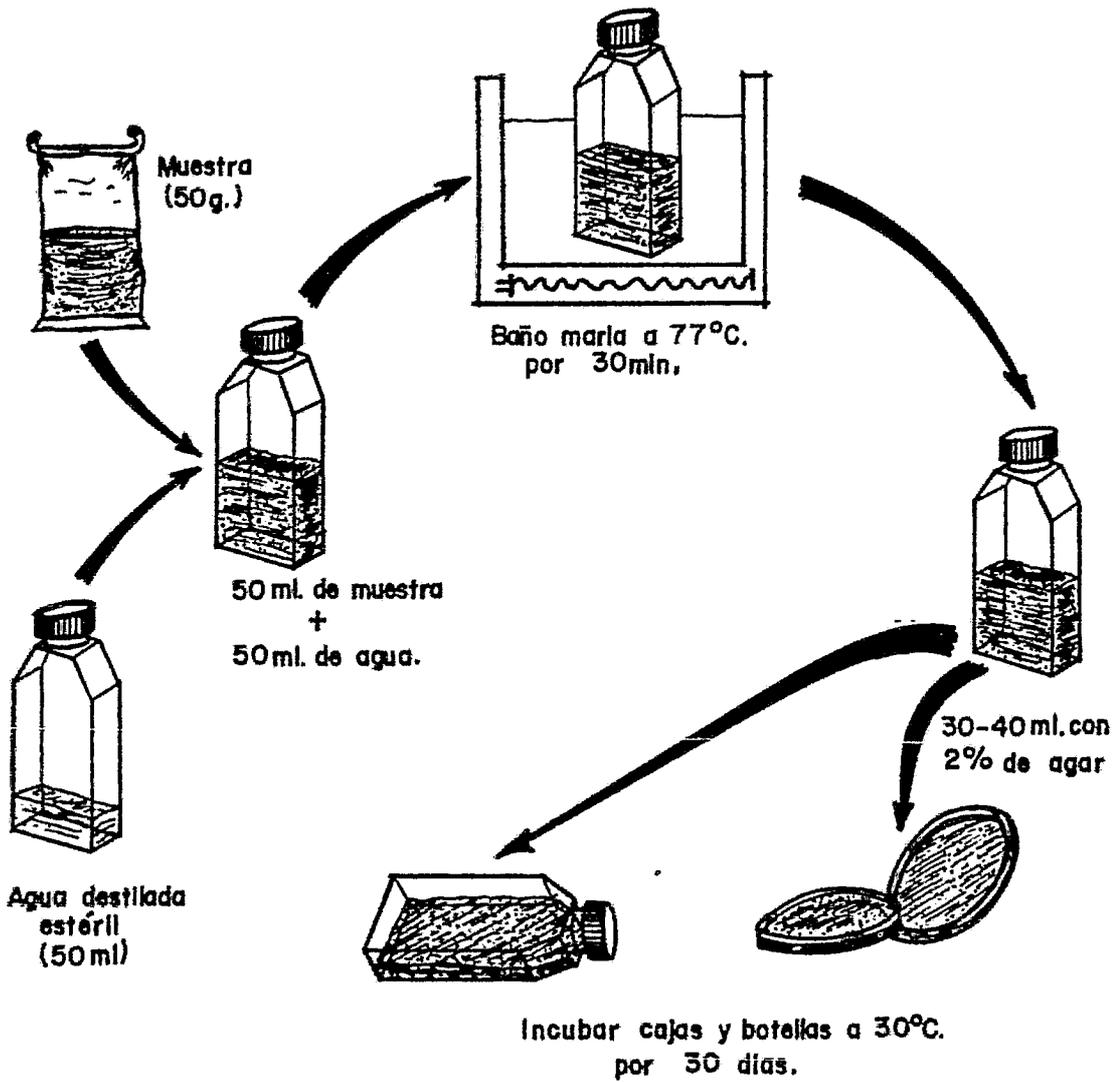
- f) Incubar a 30°C
- g) Examinar cajas y botellas semanalmente para la presencia de crecimiento de mohos y descartar después de 30 días si no ocurre crecimiento.
- h) Comprobar el crecimiento microscópicamente, observando la presencia de ocho esporas en las ascas que es característico.

Este procedimiento puede ser usado para aquellos productos que tengan 35°Bx. Cuando se examinan productos de este tipo, usar 100g de muestra y no diluir con agua estéril. (Ver figura 10)

El choque térmico de 30 minutos a 77°C ha sido diseñado para eliminar hongos no termoresistentes, restringiendo el crecimiento a esos microorganismos que son capaces de sobrevivir al proceso térmico dado al producto terminado. Mohos de este tipo son capaces de sobrevivir varias horas a esta temperatura. También la germinación óptima es obtenida por calentamiento de las esporas por 30 minutos a 75°C, la cual está en el rango de la temperatura especificada.

Fig. 10

Método de recuento en concentrados de frutas.



**CAPITULO V**

## 1.- MEDIDAS DE CONTROL (29, 31)

Siendo uno de los objetivos de esta investigación, la -  
prevención del crecimiento del Byssochlamys sp en frutas en  
latadas y embotelladas y en otros productos de frutas pro -  
cesados, nuestra principal atención estará enfocada a la -  
destrucción de las ascosporas.

Debe mencionarse que las ocho esporas en la asca rara -  
vez se separan, en estado seco o en suspensión. Por lo tan -  
to, es necesario referirse al asca (un grupo de ocho ascospo -  
ras) más que a una simple ascospora.

El B. fulva presenta ascas con paredes gruesas lo que -  
afecta los estudios de termoresistencia, ya que la estructu -  
ra no es fácilmente destruída para producir las ocho ascos -  
poras individuales y consecuentemente la velocidad de pene -  
tración del calor no es uniforme.

Una suspensión de ascosporas sostenidas en una asca de  
paredes gruesas exhibe un grado de termoresistencia ligera -  
mente mayor que una suspensión homogénea de ascosporas in -  
dividuales.

Esto es un efecto que tiene serias implicaciones duran -  
te el proceso comercial de productos contaminados con ascas  
intactas especialmente cuando las temperaturas de esterili -  
zación son mantenidas por cortos períodos de tiempo.

### 1.1 Agentes físicos

#### a) Calor como agente letal

##### Estudio térmico:

Los tiempos de destrucción térmica representados co -  
mo logaritmos en papel semilogarítmico y las temperaturas -

como valores aritméticos, dan como resultado una curva de destrucción térmica representada en la figura 11. (24, 71)

La línea recta obtenida indica que el grado de destrucción térmica es logarítmico, o en otras palabras constante.

La inclinación de la línea, después de ciertas correcciones, se denomina valor "z" y corresponde al intervalo de temperaturas, en grados Fahrenheit, necesarios para que la línea atraviese un ciclo logarítmico en el papel semilogarítmico. En otras palabras, "z" representa los grados Fahrenheit requeridos para reducir el tiempo de destrucción térmica diez veces.

"F" es el tiempo en minutos necesarios para destruir el microorganismo en un medio específico a  $121.1^{\circ}\text{C}$  ( $250^{\circ}\text{F}$ ).

El símbolo "D" se usa para expresar el tiempo de reducción decimal, es decir, el tiempo de calentamiento a una temperatura determinada que cause el 90% de reducción en la cuenta de esporas.

Este sería el tiempo en que la curva de sobrevivencia corta un ciclo logarítmico. (53)

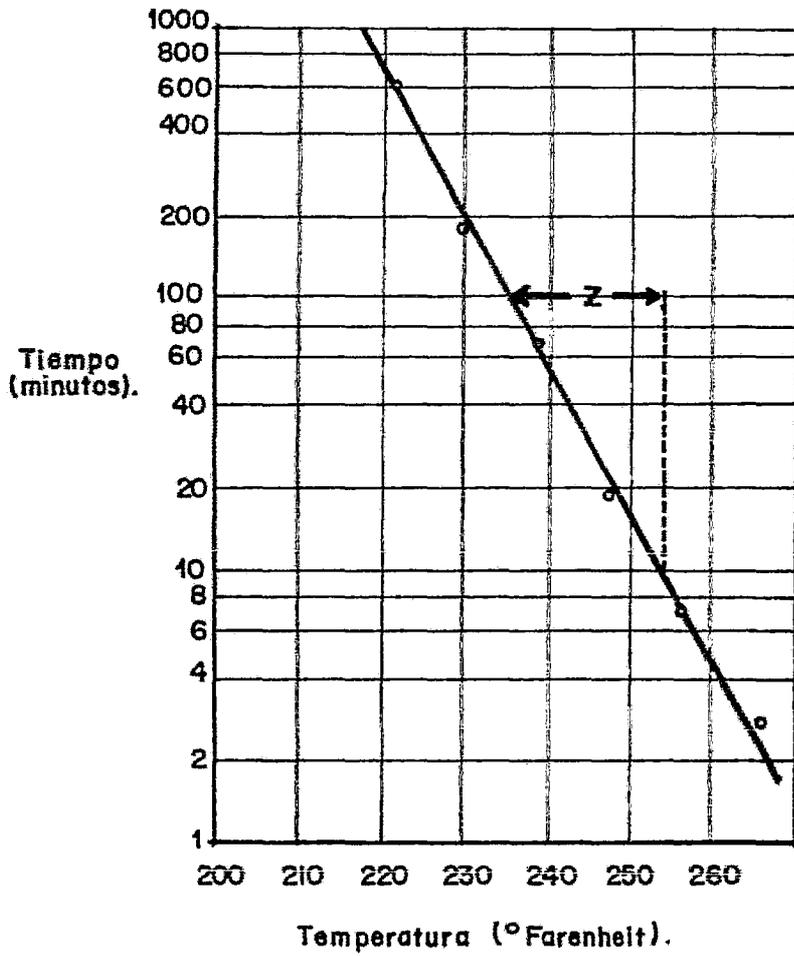
Las curvas de sobrevivencia de las ascosporas termoresistentes del B. fulva expuestas al calor letal, siguen un comportamiento no logarítmico.

Estas curvas de sobrevivencia se caracterizan por una saliente o loma, seguida por una aceleración en la velocidad de muerte.

La aparición de estas curvas se atribuye a que las es-

Fig. 11

Curva de muerte térmica



poras se agrupan, o a la capacidad de las células dañadas - para reparar en cierto grado el daño; o también, al resultado de una resistencia desigual entre las esporas. (24)

La loma al inicio de la curva, indica una activación - más lenta de esporas y puede haber una caída cuando el número ya se ha reducido mucho, lo que indica la existencia de algunos microorganismos más resistentes que los demás.

Este tipo de curva para B. fulva ha sido encontrada a 80 y 87°C, pero cuando se incrementa la temperatura, la curva log de sobrevivencia tiende a convertirse en una línea - recta. (Figura 12)

Las ascosporas de B. fulva tienen un valor de "D" (tiempo de reducción decimal) de aproximadamente 10 minutos a - 88°C (190°F) y un valor de "z" igual a 6.7°C (12°F), determinados en jugo de uva de acuerdo a los métodos descritos por la Asociación Nacional de enlatadores. (41)

Cálculos de velocidad de muerte térmica: (41,43)

La fórmula  $(\log N_0 - \log N)^a = Kt + C$  fue adaptada para - linearizar datos; donde:

$N_0$  y  $N$  son el número inicial y el número de microorganismos sobrevivientes al tiempo  $t$ .

$a$  es la recíproca de la pendiente de la curva al graficar -  $(\log N_0 - \log N)$  contra  $\log t$ .

$K$  es la constante de velocidad de muerte y la pendiente de la curva linearizada.

Fig. 12.

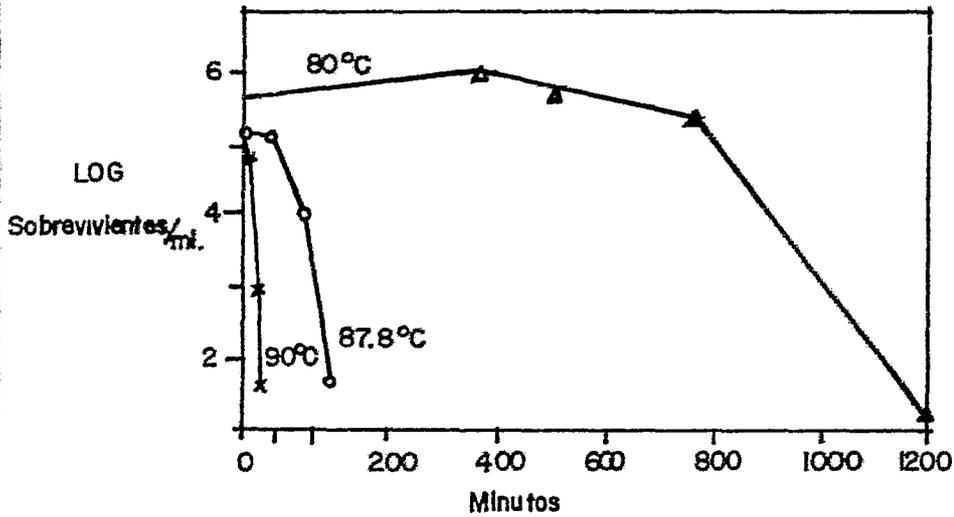


Fig. 12 a.- Curva de velocidad de muerte térmica para ascosporas de *Byssochlamys fulva*. de 80 a 90°C.; pH= 3.6 .

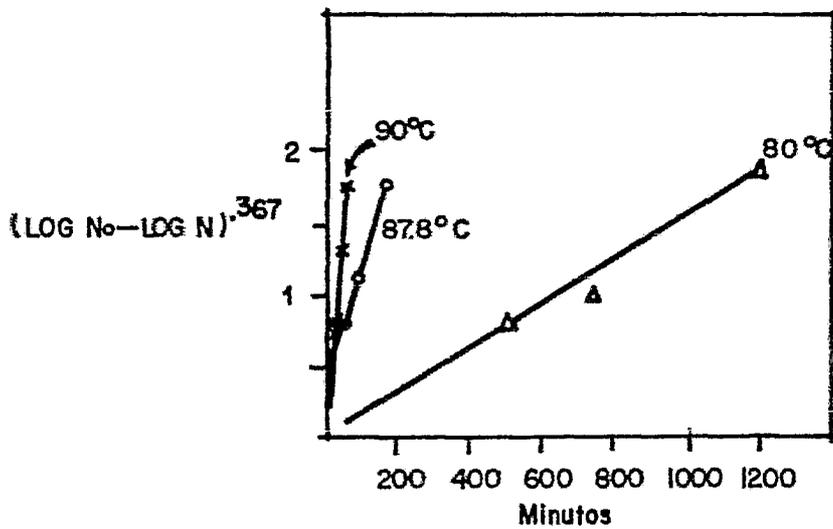


Fig. 12 b.- Linearización de las curvas de velocidad de muerte térmica para la fórmula  $(\text{Log } N_0 - \text{Log } N)^a = Kt + C$ , para *Byssochlamys fulva*; pH= 3.6 .

C es la intercepción y es una constante para un conjunto -  
 dado de datos.

t es el tiempo de calentamiento en minutos.

Se ha encontrado que las ascosporas de B. fulva son -  
 susceptibles a un calentamiento intermitente; por ejemplo, -  
 cuando se les dá dos períodos de calentamiento con un período  
 intermedio entre ellos a una temperatura más baja.

El estudio del efecto del calentamiento intermitente -  
 en la asca del moho involucra los siguientes puntos: (31)

- pH del medio nutriente
- tiempo y temperatura óptimos para el primer calentamiento
- temperatura óptima para el período intermedio
- temperatura mínima efectiva y tiempo para el segundo ca -  
 lentamiento.

Las condiciones óptimas para la total destrucción de -  
 todas las ascas son las siguientes:

- medio nutriente                      pH=3.0
- primer calentamiento              10 minutos a 77°C(170°F)
- temperatura para el-              46°C(115°F)  
 período intermedio
- segundo calentamiento              10 minutos a 77°C(170°F)

Todas las ascas son destruídas con un período intermedio-  
 de 30 minutos.

Las ascosporas al final del período intermedio no muesg

tran cambios en apariencia bajo el examen microscópico. Aún no han germinado. Su pérdida de resistencia al calor se asocia con la hidrólisis de la pared de la espora, lo cual ocurre más rápidamente a pH=3.0 o inferiores; también se relaciona con la hidratación del protoplasma y pérdida de actividad.

#### b) Filtración (41, 56, 69)

- Esta medida de control solo es aplicable a jugos, -  
bebidas y concentrados de frutas-

Debido a que generalmente los productos arriba mencionados son sometidos a un proceso de filtración, se llevó a cabo una investigación acerca del uso de tierras de diatomeas como un ayuda filtro para la remoción de ascosporas y as cas de Byssochlamys.

La eficiencia de filtración en una escala comercial para dicha remoción no ha sido determinada y para que sea exitosa, deben hacerse algunos arreglos físicos; de tal manera, que el jugo filtrado sea removido del área de filtración - sin recontaminación por el ayuda filtro usado.

Esta medida será efectiva, siempre y cuando la recontaminación se prevenga, especialmente si se considera que el Byssochlamys está presente en las áreas donde las frutas y principalmente las uvas son procesadas. (67)

Generalmente, las poblaciones naturales de Byssochlamys y otros microorganismos relativos, son tan pequeñas que escapan a su detección por los métodos convencionales; en -

tonces, un sistema de filtración que permita pasar solo una espora en  $10^5$  y prevenir la recontaminación del jugo filtrado, reduce las poblaciones a un nivel extremadamente bajo.

Para ejemplificar lo anteriormente expuesto tomaremos como modelo el proceso de obtención del jugo de uva concentrado.

En la figura 13 se tiene el diagrama de flujo para la obtención del jugo de uva concentrado. (41)

El jugo de uva es comúnmente calentado antes de entrar al vacío. Si recibe un tratamiento térmico equivalente a un valor de D (por ejemplo 10 min a  $88^{\circ}\text{C}$  ó  $190^{\circ}\text{F}$ ), solo 10% de cualquier ascospora sobrevivirá.

El  $\text{SO}_2$  es regularmente añadido al jugo antes de ser concentrado. En una concentración de  $90\ \mu\text{l/lit}$  reduce el valor de D de estas ascosporas aproximadamente un 50%. Esto reduce la velocidad de sobrevivencia a 1.0 y 0.01% respectivamente.

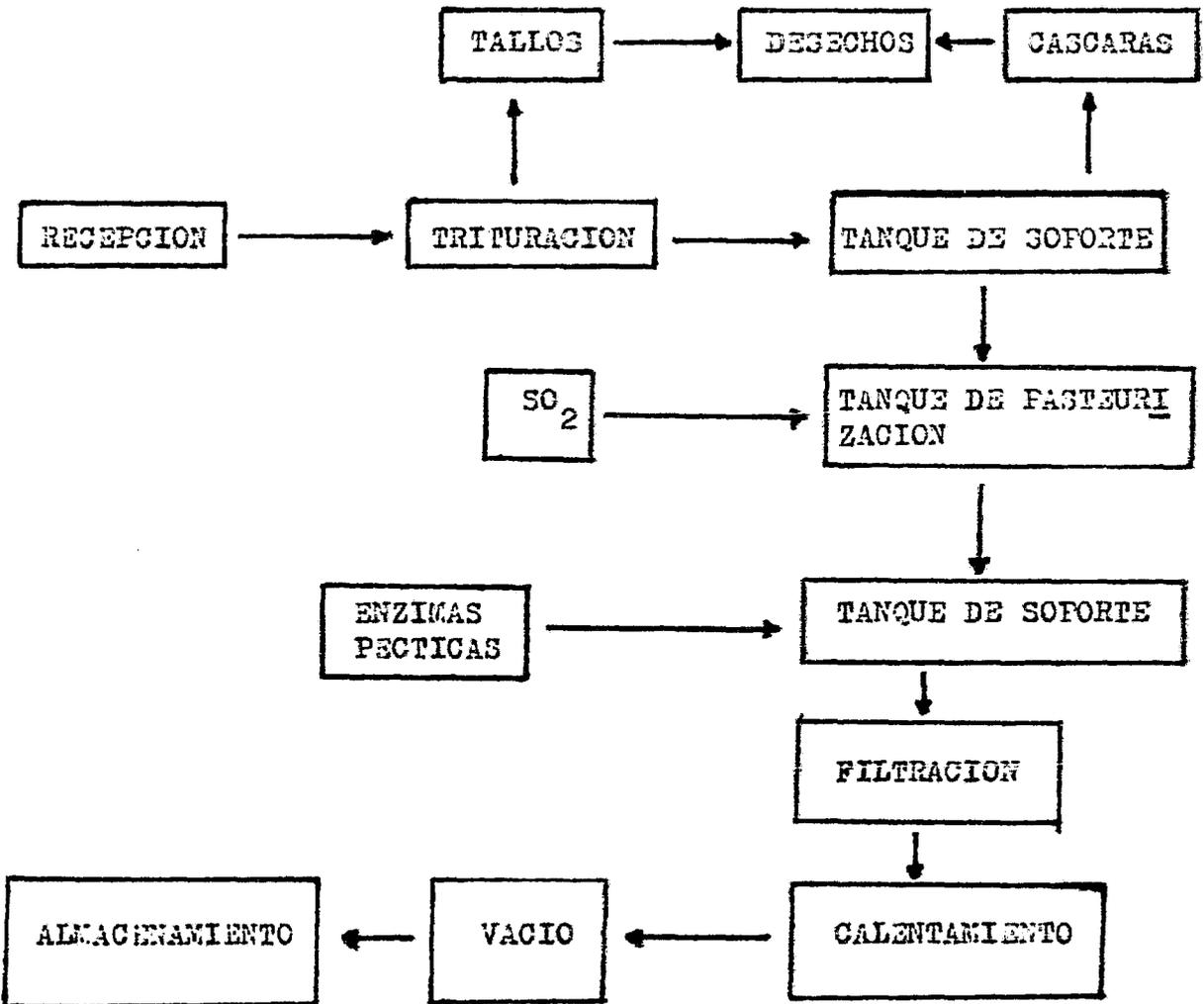
Si los efectos del calor y del  $\text{SO}_2$  son añadidos al efecto de la filtración (remoción de aproximadamente 0.001% de las esporas o una espora en  $10^5$ ) solo una espora en  $10^7$  o  $10^9$  permanecería en el jugo.

Las poblaciones de Byssochlamys nunca han sido muy grandes en jugo de uva. Si suponemos que existe una ascospora/ml el proceso reduciría la contaminación a una espora por cien mil litros de jugo para ser concentrado.

Pero como el jugo de uva concentrado es siempre diluido y reprocesado, recibe otro tratamiento térmico el cual puede ser el equivalente de por lo menos un valor más de D, produciéndose una reducción en la población de ascosporas de 96%.

Fig. 12

DIAGRAMA DE FLUJO PARA PRODUCCION DE JUGO  
DE UVA SEQUELTERADO



## 1.2 Agentes químicos

### Conservadores químicos:

Los conservadores, son aquellas sustancias capaces de retardar, evitar o enmascarar los cambios indeseables que sufren los alimentos. Estos cambios pueden ser originados por microorganismos, por enzimas del alimento o por simples reacciones químicas.

Deben de llenarse ciertas condiciones antes de considerar un preservativo químico para su uso en la industria de alimentos; entre ellas están las siguientes: (27, 71)

- prolongar la vida del alimento
- no debe ser tóxico
- no debe impartir sabor, olor, color, textura extraña, cuando se usen en los niveles requeridos.
- debe ser fácilmente soluble
- debe presentar propiedades antimicrobianas en el rango de pH del alimento en que se usa
- debe ser económico y práctico de usar

Entre los conservadores útiles para prevenir el desarrollo del Byssochlamys se encuentran: (37, 39, 52)

- a) El  $\text{SO}_2$  (anhidrido sulfuroso) que muestra una acción letal a concentraciones entre 2 y 10 l/lit en un medio con un pH=3.0.
- b) El benzoato y sorbato de potasio presentan una acción inhibitoria a concentraciones de 0.025%.
- c) El ácido peracético es efectivo en la destrucción de as-

cas a concentraciones de 2%(V/V) por 2.5 minutos de exposición para alcanzar 99.9% de destrucción y 4%(V/V) - por 1.3 minutos de exposición para alcanzar el mismo porcentaje de destrucción.

Para control se recomienda también la aplicación de fungicidas durante el cultivo de las frutas de interés como:

a) El Euparene(N',N-dimetil-N-fenil-fluoruro-diclorometil-sulfamida), que es un fungicida altamente efectivo en el control de infecciones por hongos en uvas y fresas.

La concentración residual de Euparene y de su metabolito(N',N-dimetil-N-fenil-sulfidiamida) en uvas, es recomendado como 1.3mg/Kg, pero para fresas se permite una concentración menor a ésta.

En el caso de uvas el tiempo de espera para la acción del fungicida deberá de ser de 30 días cuando la preparación es usada por arriba de 3 Kg/Ha; y en el caso de fresas de 15 días involucrando 1.2 Kg/Ha.(84)

b) Se ha encontrado que las ascas del B. fulva son sensibles al bromuro de metilo gaseoso(MeBr).

$5 \times 10^4$  ascas/g inoculadas en almidón en polvo de tapioca han sido destruidas en 30 días por 90 mg de MeBr/Kg de almidón. Esta concentración está dentro de los límites permitidos para propósitos de fumigación de insectos; y será efectiva siempre y cuando se mantenga la  $a_w = 69$  durante el tratamiento, almacenamiento y transporte de las fresas.

(55, 64, 96)

## CAPITULO VI

## COMENTARIOS (4, 45, 71, 38)

En general, la presencia de ascosporas de Byssoclamys no es común en frutas cuando son recibidas en la planta procesadora. Los recuentos de esporas son bajos generalmente, - menos de 10/100g.

Este nivel de contaminación en frutas usadas como materia prima no presenta un problema de descomposición a los procesadores, debido a que la gran mayoría de las ascosporas son removidas a través de los procesos de lavado, escaldado, mondado, filtrado, etc. y las pocas esporas remanentes son destruidas en el proceso térmico.

Esta remoción será efectiva, siempre y cuando se tenga el cuidado de que no haya contaminación en los pasos del proceso antes señalados; ya que la contaminación por Byssochlamys puede darse a los siguientes niveles:

- A partir del suelo de huertos y viñedos.
- Al momento de la cosecha.
- En máquinas cosechadoras inadecuadamente saneadas, que puedan llevar una contaminación anterior.
- Durante el transporte de la fruta, ya sea por el empleo de bolsas sucias, cajas ya contaminadas, o bien por el contacto con frutas contaminadas.
- En la planta procesadora, a partir de los utensilios utilizados para su proceso como pueden ser: cuchillos, cucharas, mesas para partir sobre todo si son de madera, etc.

tas transportadoras, tanques de almacenamiento; y cualquier pieza de la fábrica que entre en contacto con el alimento es una fuente significativa de contaminación a menos que haya sido suficientemente lavada y desinfectada.

- El agua utilizada para el lavado puede ser una fuente potencial de contaminación.

Debido a que las formas termoresistentes del moho (ascas) usualmente no se forman en menos de dos semanas, un saneamiento adecuado será efectivo en el control de Byssochlora mys.

La cuenta de 10 ascosporas/100g en un paso anterior de la entrada del producto al autoclave, indica un serio problema de contaminación.

Y dado que las frutas y productos de frutas son sometidos a un ligero tratamiento térmico para poder conservar sus propiedades organolépticas; este microorganismo, una vez que se inicia la contaminación, difícilmente es destruido o inactivado con este tratamiento térmico.

El incremento en la temperatura del proceso no es una solución práctica, dado que con esto se sacrificarían las propiedades organolépticas del producto. Es aquí, cuando debe hacerse uso de las medidas de control propuestas en el Capítulo V.

En ocasiones, los contaminantes normales de la línea de proceso previenen el crecimiento del moho, por competi-

cia de nutrientes o por producción de productos metabólicos-tóxicos al moho.

#### RESUMEN

- Frutas enlatadas y embotelladas han presentado contaminación por el moho Byssochlamys fulva, debido a que sus ascosporas presentan una alta termoresistencia y sobreviven al proceso térmico al que son sometidas.
- La contaminación se manifiesta por la completa desintegración de la textura por la acción de sus enzimas pectinolíticas.
- La termoresistencia de sus ascosporas se atribuye a la composición de sus ácidos grasos, en los que predominan los de cadena larga, ya que la resistencia al calor y la presencia de éstos son dos propiedades que distinguen a las ascosporas del B. fulva.
- El género Byssochlamys es capaz de producir productos potencialmente tóxicos como son el ácido Byssoclámico, la Byssotoxina A y la patulina, siendo esta última micotoxina de relativa importancia dado a sus efectos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos.
- Las medidas de control empleadas para su destrucción o inactivación son:
  - a) Calor como agente letal. Las ascosporas son susceptibles a un calentamiento intermitente. Este tratamiento

involucra los siguientes puntos:

- medio nutriente                      pH=3.0
- primer calentamiento                10 min a 77°C(170°F)
- temperatura para el período intermedio        46°C(115°F)
- segundo calentamiento                10 min a 77°C(170°F)

Todas las ascas son destruidas con un período intermedio de 30 minutos.

- b) Filtración. Se emplean tierras de diatomeas como ayuda - filtro para la remoción de ascosporas y ascas.
- c) Agentes químicos. Entre los conservadores útiles para - prevenir el desarrollo del *Byssochlamys* se encuentran: -
- i) anhídrido sulfuroso(SO<sub>2</sub>) que a concentraciones de 2 - 10  $\mu$ l/l en un medio de pH=3.0 muestra acción letal.
  - ii) el benzoato y sorbato de potasio presentan acción inhibitoria a concentraciones de 0.025%.
  - iii) el ácido peracético a concentraciones de 2%(V/V) - por 2.5 min de exposición y 4%(V/V) por 1.3 min de exposición.

También pueden usarse fungicidas durante el cultivo de las frutas, como Eupereene(concentración residual en uvas - igual a 1.3mg/Kg; en fresas una concentración menor a ésta) y bromuro de metilo a concentraciones de 0.009%.

**CAPITULO VII**

## B I B L I O G R A P H I A

- 1.- Alexopoulos, C.J. 1952. Introductory Microbiology. Chapman & Hall. London. p 3-34.
- 2.- Bayne, H.C. and Michener, H.D. (1973). Heat resistance of Byssochlamys ascospores. Applied Microbiology 18(2): 166-173.
- 3.- Banner, M.J.; Mattick, L.R. and Splittstoesser, D.F. (1979). Chemical composition of the ascospores. Journal of Food Science. 42(4): 545-548.
- 4.- Baumgartner, J.F. and Wallace, M.D. (1934). The destruction of microorganisms in the presence of sugars. Part I. The role of sucrose in the commercial processing of canned fruits. J. Soc. Chem. Ind. 53: 294-298.
- 5.- Beuchat, L.R.; Rice, S.L. (1979). Byssochlamys sp and their importance in processed fruits. Advances in Food Research. 25: 237-288.
- 6.- Beuchat, L.R. and Toledo, R.T. (1977). Behavior of B. nivea ascospores in fruit Syrup. Trans. Brit. Mycol. Soc. 68: 65-71.
- 7.- Brown, A.; Smith, G. (1957). The genus Paracillomyces Bainier and its perfect stage Byssochlamys Westling. British Mycological Society Transaction. 40(1): 17-22.

- 8.- Burroughs, F.L. (1977). Stability of patulin to sulfur-dioxide and to yeast fermentation. *J. Assoc. off Anal-Chem.* 60(1): 100-103.
- 9.- Ciegler, A.R.; Vesonder, K.J. (1977). Teratogenicity of patulin adducts germed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(5): 664-667.
- 10.- Ciegler, A.; Vesonder, R.F.; Jackson, K.L. (1979). Production and biological activity of patulin and citrinin from Penicillium expansum. *Appl. Environ. Microbiology.* 33(4): 1004-1006.
- 11.- Cooke, R.C. 1977. *Fungi, man and his environment*. Longman Group LTD. London. p 632-673.
- 12.- Corlett Jr. D.A. 1979. *Canned Foods. Test for cause of spoilage*. Chapter 53. p 632-673.
- 13.- Dailey, E.R.; Blaschka, A.; Brower, E. (1977). Absorption distribution and excretion of  $C^{14}$  patulin by rats. *Toxicol Environ. Health* 3: 479-489.
- 14.- Davis, Dulbecco, Emsen. 1980. *Microbiology*. 3<sup>th</sup> Edition. Harper & Row. London. p 818-828.
- 15.- Duckworth, R.B. 1968. *Frutas y verduras*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. p 225-238.
- 16.- Eckardt, C.; Ahrens, E. (1976). Byssochlamys fulva Cilli

- Ver-Smith as a potential spoilage agent in canned strawberries I. Occurrence and growth of Byssochlamys fulva. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel* 5(3): 71-75.
- 17.- Eckardt, C.; Ahrens, E. (1976). Byssochlamys fulva Olli Ver-Smith as a potential spoilage agent in canned strawberries II. Thermal resistance of the ascospores of B. fulva. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel* (5)3: 76-80.
- 18.- Eckardt, C.; Ahrens, E. (1978). Resistance of B. fulva during freezing and pasteurization process. *Lebensmittelwissenschaft-und Technologie*. 11(3): 137-141.
- 19.- Enomoto, M.; Saito, M. (1972). Carcinogens produced by fungi. *Ann. Rev. of Microbiol.* 26: 279-312.
- 20.- Escoula, L. (1975). Toxinogenic moulds in silage II. Patulin and Byssochlamic acid biosynthesis by B. nivea Westling in liquid medium. *Ann. Research Vet* 6: 155-163
- 21.- Escoula, L. (1975). Toxinogenic moulds in silage III. *Ann. Research Vet* 6: 219-226.
- 22.- Escoula, L. (1975). Toxinogenic moulds in silage IV. *Ann. Research Vet* 6: 303-310.
- 23.- Fisher, D.J.; Holloway, F.J. and Richmond, D.V. (1972)-

- Fatty acids and hydrocarbon constituents of the surface and cell walls of some fungal spores. *J. Gen. Microbiol.* 72: 71.
- 24.- Fraulzier, W.C. 1978. Food Microbiology. McGraw Hill. -  
New York. p 15-34; 93-104.
- 25.- Fritz, W.; Engst, R.; Donath, R. (1975). The significance of Byssochlamys acid in fruit juice mould. *Nahrung.* 20(5): 533-542. -
- 26.- Forrester, I.F.; Gaucher, M. (1972). Conversion of 6 -  
methylsalicylic acid into patulin by Penicillium urticae. *Biochemistry* 11(6): 1102-1107. -
- 27.- Garduño, Alejandro. Desarrollo de alimentos. EDUTEKA -  
México, 1976. p 76-82.
- 28.- Garza, H.C.; Swanson, B.G. and Branen, A.L. (1977). Toxicological study of patulin in monkeys. *Journal of Food Science.* 42(5): 1229-1231. -
- 29.- Gillespy, T.G. (1938). Studies on the mould B. fulva -  
II. Rep. Fruit Veg. Press Sta. Campden Eng. p 68-77.
- 30.- Gillespy, T.G. (1940). Studies on the mould B. fulva -  
III. Rep. Fruit Veg. Press Sta. Campden Eng. p 54-61.
- 31.- Gillespy, T.G. (1946). Studies on the mould B. fulva -  
IV. Rep. Fruit Veg. Press Sta. Campden Eng. p 31-39.

- 32.- Jansen, F. and McMaster, H.B. (1953). Factors affecting the heat resistance of non-sporing organisms. J. Appl.-Bact. 26: 314-333.
- 33.- Hatcher, W.S. (1979). Fruit juices. Special Report. New York State Agricultural Experimental Station No. 31: 1-4
- 34.- Hatcher, W.S.; Welche, J.L.; Murdeck, D.L.(1979). Growth requirements and thermal resistance of fungi belonging to the genus Byssochlamys. Journal of Food Science. 44 (1): 118-122.
- 35.- Herbert and Lansen. (1972). Ascii production by B. fulva on a synthetic medium. J. Food Sci. 37: 883.
- 36.- Hull, R. (1939). Study of B. fulva and control measures in processed fruits. Annals of Applied Biology 26: 800-822.
- 37.- Ito, K.A.; Seeger, M.L. and Lee, W.H. (1972). The destruction of B. fulva ascii by low concentration of gaseous methyl bromide and by aqueous solutions of chlorine on iodophor and peracetic acid. J. Appl. Bact. 35: 479-483.
- 38.- Jawetz, Ernest. 1977. Microbiología médica. Editorial - "El manual moderno". p 300-303.
- 39.- Jensen, K. (1950). Experiments on the inhibition of some thermoresistants molds in fruit juices. Ann. Inst. -

Fastear Lill'e. 11: 179-182.

- 40.- Joslyn Foldsbath and Nickerson. 1961. An Introduction -  
to the Thermal Processing of Food. The AVI publishing -  
Co. Inc. p 330-342.
- 41.- King Jr. A.D.; Fichener, H.D. and Ito, K.A. (1969). -  
Control of Byssochlamys ascospores. Applied and Environ-  
ment Microbiology. 37(3): 449-453.
- 42.- King Jr. A.D.; Booth, A.N.; Stafford, A.E. and Weiss -  
A.C. (1972). B. fulva metabolite toxicity in laborato-  
ries animals. J. Food Sci. 37: 86-89.
- 43.- King Jr. A.D.; Bayne, H.C.; Alderton, G. (1979). Non -  
logarithmic death rate calculations for B. fulva and -  
other microorganisms. Applied and Environment Microbio-  
logy. 37(3): 596-600.
- 44.- Koburger, J.A. (1979). Yeasts and molds. Microorganisms-  
in processing and spoilage of Foods. Chapter 16. p 225-  
229.
- 45.- Kramer, R.K.; Davis, F.D. and Diener, V.L. (1976). By-  
ssotoxina A a secondary metabolite of B. fulva. Appl. -  
and Environment Microbiology. 31(2): 243-253.
- 46.- Lee, W.H. and Reisman, H. (1970). Destruction of toxic -  
fungi with low concentration of methyl bromide. Appl. -  
Microbiology. 20: 245.

- 47.- Lehninger, Albert. 1975. Biochemistry. Second Edition - New-York. p 309-313; 947-955.
- 48.- Lieu, F.; Bullerman, L.R. (1977). Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. J. Food Sci. 42(5): 1222-1224.
- 49.- Lovett, J.; Peeler, T. (1973). Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution J. Food Sci. 38(6): 1094-1095.
- 50.- Lovett, J. (1972). Patulin toxicosis in poultry. Poultry Sci. 51: 2037-2038.
- 51.- Mayer, W.V.; Legatar, S.M. (1969). Production of petite mutants of Saccharomyces cerevisiae by patulin. J. Agr. Food Chem. 17(3): 454-456.
- 52.- Merck Co. Inc. 1976. "The Merck Index". 9a. Edition. U.S. The Merck Co. Editor. p 914.
- 53.- Merson, I.; Richard, M. 1979. Procesamiento térmico de los alimentos enlatados. Food Sci. U.C.A. Davis, California. p 52-64.
- 54.- Morrison & Boyd. 1976. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano. México. p 895-897.
- 55.- Munnecke, G.S.; Ludwig, R.A. and Jansson, R.L. (1959) - The fungicidal activity of methyl bromide. Can. Journal of Botany. 37: 51.

- 56.- Murdock, J.I. and Hatcher Jr. W.S. (1973). A simple -  
method to screen juices and concentrates for heat re -  
sistant mold. Journal of Food Protection. 41(4): 254 -  
256.
- 57.- Murrell, W.C. (1967). The biochemistry of the bacterial  
endospore. Adv. Microb. Physiol. 1: 133-251.
- 58.- National Canners Association (1968). Laboratory Manual -  
Food Canners and Processors. Vol 1 Microbiology and -  
processing. AVI Publishing Co. Westport Conn. p 125.
- 59.- Nelson, F.E. (1978). Thermotolerant microorganisms. Compen  
dium of methods for the microbiology examination and fo  
od. Chapter 9. p 179-183.
- 60.- Olliver, M. (1933). Byssochlamys fulva sp Nov Journal -  
Botany LXXXI (847): 196-197.
- 61.- Olliver, M.R.; Rendle, T. (1934). A new problem in -  
fruit preservation. Studies on B. fulva and its effects  
on the tissues of processed fruit. J. Soc. Chem. Ind. -  
London. 53: 166-172.
- 62.- Cough, C.S. and Corison, C.A. (1939). Measurement of pa  
tulin in grapes and wines. Journal of Food Science. 45:  
476-478.
- 63.- Fertsch, G.; Richter, C.; Altman, H. (1970). Effects of  
heat and irradiations on spores of B. fulva in various

fruit juices. p 110-113.

- 64.- Fearsinovia, I.F.; Garashenko, N.V., Beverynyak, E.D. (1979). Action of some synthetic bleaching agents on microorganisms. *Konsernaya i aveshchezashil'naya Promyshlennost. No. 2: 35-37.*
- 65.- Felczar, Michael. 1972. *Microbiology*. McGraw-Hill Book-Co. London. p 264-267; 719-721.
- 66.- Phillips, D.T.; Hayes, W.A. (1978). Effects of patulin on the kinetics of substrates and cationic ligand activation of adenosin triphosphatase in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205(3): 606-615.
- 67.- Pohland, E.A.; Allen, R. (1970). Stability studies with patulin. *J. Assoc. off Annal Chem.* 53(4): 692-695.
- 68.- Pohland, E.A.; Sanders, K. (1970). Determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. off Annal Chem.* 53(4): 692-695.
- 69.- Portsck, G. (1969). Simple method for the separation of ascospores. *Applied Microbiology.* 17(6): 925.
- 70.- Portsck, G.; Draxler and Altman. (1969). The ultrastructure of spores of B. fulva. *Mycopathol, Mycol. Appl.* 39: 305-313.
- 71.- Fetter, Normand. *La ciencia de los alimentos.* ESTEVA -

1973. p 169-193.

- 72.- Put, H.M. and Kruijwyk, J. (1964). Desintegration and -  
organoleptic deterioration of processed strawberries -  
caused by the mold B. nivea. J. Appl. Bact. 27(1): 53 -  
58.
- 73.- Put, H.M. (1964). A selective method for cultivating -  
heat resistant molds, particularly those of the genus -  
Byssochlamys and their presence in Dutch Soil. J. Appl.  
Bacteriology. 27: 59-64.
- 74.- Raistrick, H. and Smith, G. (1934). Studies in the bio-  
chemistry of microorganisms. The metabolic products of-  
B. fulva Olliver-Smith. p 78-96.
- 75.- Reed, W. (1952). The pectic enzymes of the fungus B. -  
fulva. Biochemistry. 50: 289-292.
- 76.- Rice, S.L.; Beuchat, L.R. (1977). Changes in the compo-  
sition and texture of canned peach halves infected with  
B. fulva. J. of Food Science. 42(6): 1562-1565.
- 77.- Rice, S.L.; Beuchat, L.R. and Worthington, R.E. (1977)-  
Patulin production by Byssochlamys sp in fruit juices.  
Applied and Environment Microbiology. 34(6): 791-796.
- 78.- Rice, S.L. (1980). Patulin production by Byssochlamys -  
sp in canned grape juice. Journal of Food Science. 45:-  
485-488.

- 79.- Ruyle, E.H.; Pearce, W.E. and Mayer, S.L. (1946). Pre -  
vention of mold in Kettleblueberries in No. 10 cans -  
Food Research. 11: 274-279.
- 80.- Scott, P.M.; Sommers, E. (1968). Stability of patulin -  
content of juice and wine produced from moldy grapes. -  
J. Agr. Food Chem. 25: 434-437.
- 81.- Scott, P.M.; Fuleki, T. and Harwing, J. (1977). Patulin  
content of juice and wine produced from moldy grapes. -  
J. Agr. Food Chem. 25: 434-437.
- 82.- Scott, W.T. and Bullerman, L.B. (1975). Patulin, a mi -  
cotoxin of potential concern in foods. J. Milk Food -  
Technology. 38: 695-705.
- 83.- Sekiguchi, J.M.; Gaucher, M. (1978). Identification of -  
phylllostine as an intermediate of the patulin pathway -  
in Penicillium urticae. Biochemistry. 17(9): 1785-1791.
- 84.- Smith, W.L. (1962). Chemical treatments to reduce post -  
harvest spoilage of fruits and veg. Boston Rev. 23:411.
- 85.- Sommer, F.N.; Buchanan, R.J.; Buchanan, R.J.; Fortla -  
ge, J.R. (1974). Production of patulin by Penicillium -  
expansum. Appl. Microbiol. 28: 589-592.
- 86.- Splittstoesser, D.F.; Kuss, F.R.; Harrison Wanda and -  
Frest, D.B. (1971). Incidence of heat resistant molds -

in Eastern Orchards and vineyards. Applied Microbiology. 21(2): 335-337.

- 87.- Splittstoesser, D.F.; Wilkison, M. and Harrison, W. (1972). Heat activation of B. fulva ascospores. J. Milk Food Technology. 35(7): 399-401.
- 88.- Splittstoesser, D.F. Enumeration of heat resistant mold (Byssochlamys). Compendium of methods for the Microbiology examination and Food. 1979. Chapter 19 p 230-233.
- 89.- Splittstoesser, D.F.; Einset, A.; Wilkison, M. (1974). Effect of food ingredients on the heat resistance of Byssochlamys fulva ascospores. IV International Congress of Food Science and Technology. 4B: 14-15.
- 90.- Splittstoesser, D.F.; Dowing, D.L.; Roger, N.F.; Murdoch, D.I. (1974). Influence of the harvest method on contamination of fruit by Byssochlamys ascospores. J. of Milk and Food Technology. 37(8): 445-447.
- 91.- Splittstoesser, D.F.; Kuss, F.R. and Harrison Wanda (1970). Enumeration of Byssochlamys and other heat resistant molds. Applied Microbiology. 20(3): 393-397.
- 92.- Splittstoesser, D.F.; Caldwell, M.C. and Martin, H. (1969). Ascospores production by B. fulva. J. Food Sci. 34: 248-250.

- 93.- Splittstoesser, D.F.; Einset, A.; Wilkinson, W. and Freyese, J. (1974). Effect of food ingredients on the heat resistance of B. fulva ascospores. In proceedings of the fourth Inst. Congress of Food Science and Technology 111. Madrid, Spain. p 123-128.
- 94.- Splittstoesser, D.F. (1977). Ascospores of B. fulva compared with those of a heat resistant Aspergillus. J. Food Sci. 42: 685.
- 95.- Stoot, W.T. and Bullerman, L.B. (1975). Patulin a mycotoxin of potencial concern in foods. J. Milk Food Technology. 38: 695.
- 96.- Tressler, D.K. and Joslyn, M.A. Fruit and Vegetables juices. AVI Publishing Co. Westport Conn. p 95-123.
- 97.- Uraguchi, K; Yamazaki, M. (1978). Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins. London, John Wiley & Sons. Ed. p 4, 26, 26, 260.
- 98.- Velasco, Oscar. (1978). Nociones de Micología. Fco. Méndez C. Editor. México, D.F. p 40-45.
- 99.- Yates, A.R. and Scoman, A. (1968). Ascospore germination in B. nivea. Canadian Journal of Microbiology. 14: 319-324.
- 100.- Yates, A.R. (1974). The occurrence of Pyrenopeziza sp molds in Ontario. Can Inst. Food Sci. Techn. 1: 186.