

9. USO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS COMO BIOCONTROL DE LA POBLACIÓN DE MOHOS TOXIGENICOS EN EL JAMÓN IBÉRICO

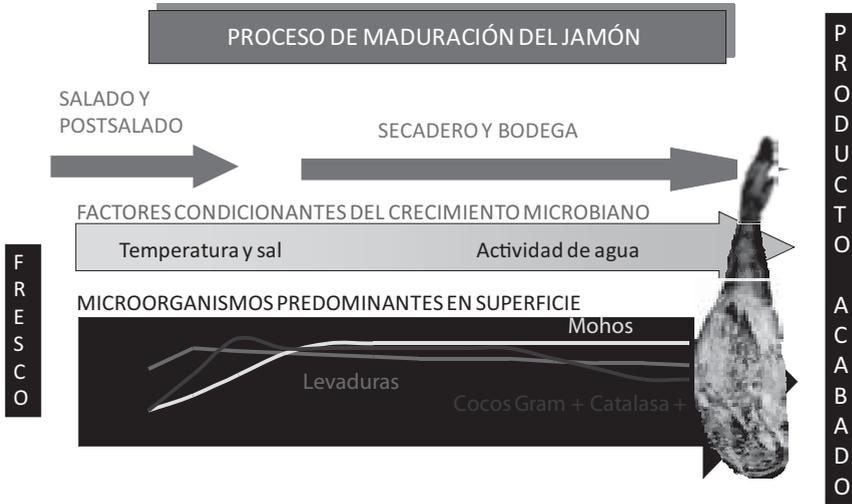
*Gustavo Gallardo Broncano
Alejandro Hernández León
Santiago Ruiz-Moyano Secode Herrera
Alberto Martín González*

1. POBLACIÓN FÚNGICA EN EL JAMÓN IBÉRICO

Los microorganismos que colonizan en primera instancia el pernil pueden tener diversos orígenes, como la piel del animal, intestino, material de procesado, etc., presentando una contaminación inicial diversa de entre 10^2 y 10^5 ufc/gr a nivel superficial (Carrascosa y col., 1988; Cornejo y col., 1988).

A lo largo del procesado del jamón Ibérico la población microbiana contaminante tiene que soportar una serie de obstáculos, los cuales van a ejercer una presión selectiva que condiciona los niveles y tipos de microorganismos del producto acabado. Durante las últimas etapas de maduración en secadero y bodega la actividad del agua (a_w) es el principal factor físico que condiciona la población microbiana (figura 1). Los valores de a_w alcanzados tanto en superficie como en profundidad inhiben el desarrollo de la mayor parte de las bacterias contaminantes, produciéndose además una reducción de los recuentos de las bacterias halotolerantes como los cocos Gram positivos catalasa positivos (Francisco y col., 1981; Rodríguez y col, 1995). De igual modo, las levaduras experimentan una selección y un moderado descenso tanto de sus recuentos como de su variabilidad en estas etapas. Así, durante las primeras etapas de salado y post-salado se observan levaduras pertenecientes a los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula*. Sin embargo, en producto final *Debaryomyces hansenii* es la especie dominante en jamón ibérico (Núñez y col., 1996), aunque ha sido descrita la presencia de otras especies como *Debaryomyces marama* (Monte y col., 1986).

FIGURA 1: Microorganismos predominantes durante el proceso de elaboración del jamón Ibérico



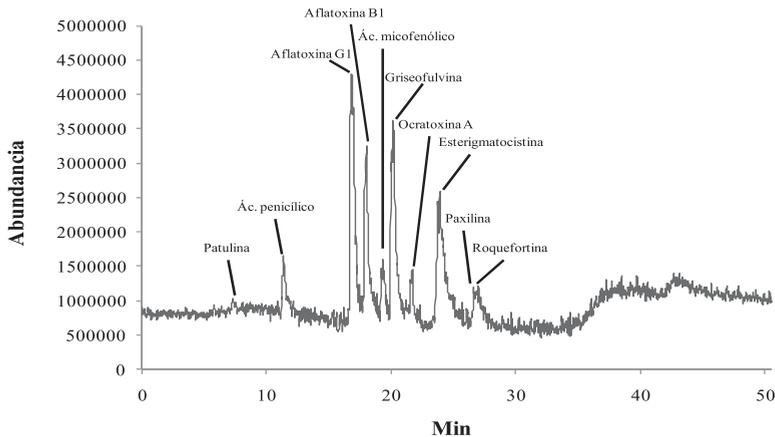
Al contrario que las levaduras, los mohos aumentan su variabilidad a lo largo del proceso de maduración en jamón Ibérico, siendo el género *Penicillium* el mayoritario desde finales del post-salado hasta mitad de bodega (Núñez y col., 1996). Se han encontrado como dominantes las especies *P. polonicum*, *P. commune*, *P. chrysogenum*, *P. echinulatum* y *P. expansum* (Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996). Al final de la maduración el género predominante es *Eurotium* y algunos anamorfos de dicho género clasificados como *Aspergillus*, probablemente debido a su capacidad de crecer a valores de a_w inferiores a los que necesita *Penicillium* (Pitt y Hocking, 1985). Las especies *Eurotium repens* y *Eurotium herbariorum* son las predominantes.

2. MOHOS TOXIGÉNICOS EN EL JAMÓN IBÉRICO

Aunque el desarrollo de mohos en la superficie de el jamón ibérico tiene un efecto beneficioso en las características sensoriales de los mismos (Martín y col., 2002; Córdoba y col., 2002), la mayoría de las especies que proliferan son capaces de sintetizar micotoxinas, si las condiciones ambientales son favorables (Núñez y col., 1996; Núñez y col. 2000; Sosa y col., 2002). En productos cárnicos crudos curados las micotoxinas más importantes son las aflatoxinas y ocratoxinas, aunque hay descritos otros metabolitos tóxicos producidos por mohos aislados de jamón Ibérico (Rodríguez y col., 2012). Leistner (1984) confirmó la presencia de las micotoxinas breviamida A, citreoviridina, citrinina, ácido ciclopiazónico, fumitremorgina B, griseofulvina, ochratoxina A, rugulosina, verruculogeno TR1 y patulina tanto en embutidos como en jamones curados. Igualmente, mohos aislados de productos cárnicos han sido descritos como productores de micotoxinas tales como ácido ciclopiazónico (Sosa y col., 2002), ocratoxina A, esterigmatocistina y citrinina (Geisen, 1998; Rodríguez, 2012), verrucosidina (Núñez y col., 2000), aflato-

xina B (Rojas y col., 1991), patulina (Martín y col., 2004; Rodríguez, 2012) ácido micofenólico y roquefortina (Gallardo, 2011).

FIGURA 2: Cromatograma de patrones de micotoxinas investigadas en cepas aisladas de jamón Ibérico



Fuente: Gallardo (2011)

Cepas de *Penicillium polonicum* y *Penicillium aurantiogriseum* aisladas de la superficie del jamón Ibérico pueden producir verrucosidina (Núñez y col., 2000; Núñez y col., 2007), una micotoxina responsable de las enfermedades neurológicas. Otro de los mohos más frecuentemente aislado en productos cárnicos curados, incluido el jamón, es *Penicillium commune* (Leistner, 1984; Núñez y col., 1996). Cepas de este moho se han descrito como grandes productoras de ácido ciclopiazónico (López-Díaz y col., 2001; Sosa y col., 2002), a las que hay que sumar cepas de otras especies de *Penicillium* tales como *P. aurantiogriseum*, *P. expansum* y *P. cammenberti* (Finoli y col., 1999) y de *Aspergillus* spp. como *A. flavus* y *A. tamaritii* (Martín y col., 2004). El efecto tóxico de esta micotoxina es bastante severo, provocando pérdida de peso, diarrea y convulsiones. Varias cepas de *P. expansum*, *P. griseofulvum* y *Aspergillus* spp. aisladas de estos productos han sido caracterizadas como productoras de aflatoxina, ocratoxina A y patulina (Martín y col., 2004; Rodríguez y col., 2012). Estas micotoxinas están descritas como potentes agentes cancerígenos, hepatotóxicos y nefrotóxicos.

3. DETECCIÓN DE MOHOS MICOTOXIGÉNICOS EN JAMÓN

La identificación y caracterización precisa de los mohos constituyen un problema complejo debido al alto grado de relación entre especies. Las técnicas que se utilizan se pueden agrupar en base a sus caracteres fenotípicos y en base a sus caracteres genotípicos.

Las técnicas clásicas de identificación se han basado en la observación de características morfológicas que los mohos presentan bajo condiciones perfectamente estandarizadas de medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación. No obstante, como los mohos son muy sensibles a los factores ambientales, exhiben un amplio rango de variabilidad en sus características morfológicas y fisiológicas (Pitt, 2001). Actualmente, cuando se utilizan, es siempre como prueba orientativa.

Otras técnicas que se basan en aspectos fisiológicos, son la determinación del crecimiento fúngico, la producción de metabolitos secundarios (antibióticos, compuestos volátiles, micotoxinas), la determinación de los perfiles lipídicos o proteínicos y la actividad enzimática. Mediante la determinación de metabolitos secundarios, Gallardo (2011) determinó en 8 secaderos de jamón Ibérico la presencia de al menos 10 especies de mohos productoras de ácido penicílico, ácido micofenólico, roquefortina, esterigmatocistina y griseofulvina como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1: Cepas micotoxigénicas identificadas en aislamientos de jamón Ibérico

MICOTOXINA	CEPA
Ácido penicílico	PDAS101
	HJS19
	AEMP2V01
Roquefortina	BOD4M
	SEC7M
	AEMJ1V03
Ácido micofenólico	AEMJ3V01
	PDAP2V03
	RBCJ5V03
	RBCB1J4C105
	RBCB1J2C102
	RBCJ3V03
Esterigmatocistina	RBCJ5V01
	HTB8JS
Griseofulvina	HTB2JS
	AEMP2V01

Fuente: Gallardo (2011)

Actualmente, por lo general no se utiliza una sola de estas técnicas para caracterizar e identificar mohos. Los métodos que describen aislamientos individuales deberían dar lugar a variaciones visibles en las características entre distintos aislamientos. Como consecuencia, se requieren al menos un par de técnicas basadas en distintas características para asegurar la presencia de diferencias significativas y garantizar un resultado fiable (Boysen y col., 2000). Entre las técnicas utilizadas en conjunto tenemos la identificación y ca-

racterización de los mohos por metabolitos secundarios y enzimas; Nijs y col. (1997) por metabolitos secundarios y técnicas moleculares; Larsen y Frisvad (1995) por metabolitos secundarios y crecimiento en medios de cultivo específicos y Boysen y col. (2000) por técnicas morfológicas y técnicas moleculares. Aun así, estos métodos precisan el aislamiento y cultivo de mohos toxigénicos y la posterior confirmación de la producción de las micotoxinas.

La caracterización de genes involucrados en la síntesis de micotoxinas permite el diseño de procedimientos rápidos basados en la metodología de ácidos nucleicos para la detección de mohos productores de micotoxinas. Las técnicas de PCR permiten detectar la presencia de mohos productores de micotoxinas e incluso cuantificarlos empleando la técnica de PCR en tiempo real. Ambas, la PCR convencional y PCR en tiempo real, han sido empleadas con éxito para la detección rápida de mohos toxigénicos en diferentes alimentos incluido el jamón Ibérico. Así, se han desarrollado métodos para la detección y cuantificación de mohos productores de patulina, verrucosidina, aflatoxina, ocratoxina A o ácido ciclopiazónico a partir de sustratos cárnicos como el jamón Ibérico (Martín y col., 2004; Rodríguez y col., 2012).

4. BIOCONTROL DE MOHOS MICOTOXIGÉNICOS

Entre las herramientas utilizadas para prevenir la presencia de las micotoxinas en alimentos esta el biocontrol. La implantación en los pernils de cepas de mohos y levaduras no toxigénicas y adaptadas a las condiciones ecológicas del jamón Ibérico podría paliar parcialmente el problema por exclusión competitiva de las cepas toxigénicas. No obstante, para un control eficaz sería deseable cepas de mohos o levaduras con mecanismos activos frente a las cepas toxigénicas o sus metabolitos. Así Varga y col. (2005) describieron la capacidad de algunas especies de mohos de degradar la ocratoxina A. Por otro lado, cepas pertenecientes a la especie *Penicillium chrysogenum* son capaces de producir péptidos con actividad inhibitoria frente a cepas toxigénicas de las especies *Penicillium echinulatum*, *Penicillium commune*, y *Aspergillus niger* (Acosta y col., 2009).

Como ya se ha mencionado, en jamón Ibérico también se desarrolla a nivel superficial una importante población de levaduras autóctonas durante el procesado. Estas suponen una buena base para la selección de cepas con capacidad para inhibir mohos toxigénicos o degradar sus micotoxinas. Cepas de levaduras aisladas a partir de la superficie de los jamones italianos, pertenecientes a las especies *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces maramus*, *Candida famata*, *Candida zeylanoides* y *Hyphopichia burtonii*, mostraron actividad antagonista frente a una cepa toxigénica de *P. nordicum* y así como la capacidad de inhibir la biosíntesis de la ocratoxina A. Dicha actividad inhibitoria de levadura se vio condicionada por el inoculo fúngico y por la presencia de NaCl (Virgili y col., 2012). Por otro lado, en ensayos realizados con un total de 40 cepas de levaduras aisladas de 8 secaderos extremeños en las etapas de elaboración del jamón Ibérico de secadero y bodega, un 30% presentó capacidad de degradar micotoxinas como el ácido micofenólico en ensayos *in vitro* (Figura 3). Entre las que presentaron actividad, destacaron las cepas denominadas 2, 50, 80 y CC71 de la especie *Debaryomyces hansenii* aisladas en

FIGURA 3: Capacidad de degradar el ácido micofenólico de la cepas de levadura C88 con respecto al ensayo control

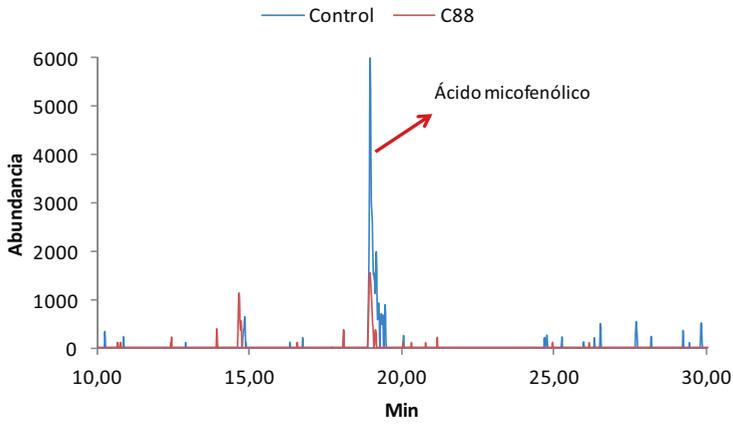


FIGURA 4: Porcentaje de cepas de levaduras que muestran diferentes grados de inhibición en el crecimiento de mohos micotoxigénicos aislados de jamón Ibérico

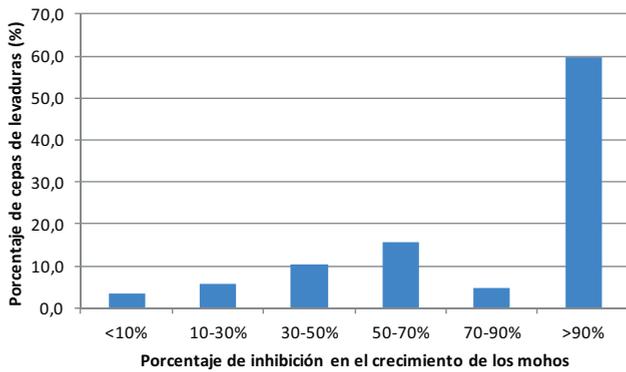
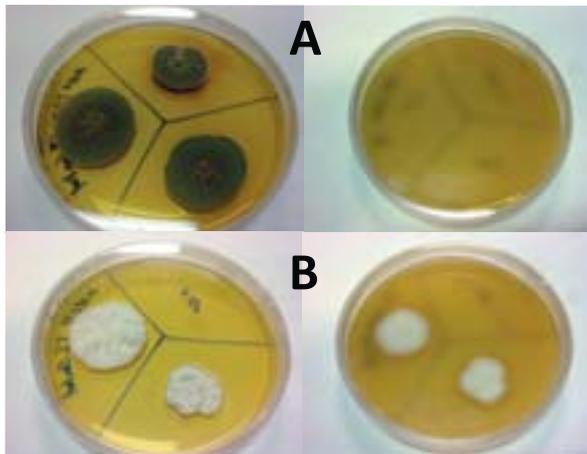


FIGURA 5: Ensayos de inhibición de crecimiento de mohos por parte de cepas de levadura positivo (A) y negativo (B)



jamones Ibéricos de diferente secaderos y que fueron capaces de degradar el total de la micotoxina (Gallardo, 2011).

Otro aspecto a destacar de las levaduras aisladas de jamón Ibérico es su capacidad de inhibir o al menos retardar el crecimiento de mohos micotoxigénicos igualmente presentes en este producto. Así, Gallardo (2011) ha podido comprobar que aproximadamente el 60% de los aislados de levaduras seleccionados por su actividad frente a microorganismos patógenos tienen también un efecto muy notable sobre el crecimiento de varias cepas de mohos micotoxigénicos (figuras 4 y 5). Además, en aquellos casos en los que los mohos sufrieron una menor inhibición de su crecimiento, se observó una reducción en la cantidad de micotoxinas en el medio para el caso de el ácido penicílico, ácido micofenólico y griseofulvina (Gallardo, 2011).

Los antecedentes presentes en la bibliografía y el trabajo realizado por el área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Extremadura ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar cepas de levaduras como biocontrol de mohos micotoxigénicos que pueden proliferan en el proceso de maduración del jamón ibérico. Los ensayos *in vitro* han permitido seleccionar cepas de levaduras de la especie *Debaryomyces hansenii* tanto con capacidad para inhibir el crecimiento de estos mohos micotoxigénicos como de degradar los metabolitos tóxicos que producen. La inoculación de las cepas biocontrol en jamones ofrecerán a la industria del jamón ibérico una alternativa para el control de los mohos toxígenicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Martín, A., Núñez, F. y Asensio M.A. (2009). Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 39-46.
- Boysen, M.E., Jacobsson, K-G. y Schnürer, J. (2000) Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1523-1526.
- Carrascosa, A.V.; Marín, M.E.; Avendaño, M.C. y Cornejo, I. (1988). Jamón serrano. Cambios microbiológicos y fisico-químicos durante el curado rápido. *Alimentaria* 194, 9-12.
- Córdoba, J.J., Núñez, F. y Asensio, M.A. 2002. Contribution of the fungal population to the quality of dry-cured ham. In *Research Advances in the quality of meat and meat products*. F. Toldrá ed. Ed. Research Signpost (Kerala, India), pp. 310-325.
- Cornejo, I.; Carrascosa, A.V.; Marín, M.E. y Avendaño, M.C. (1988). Influencia del salado, el lavado y el reposo sobre la flora superficial del jamón curado. *Cárnica* 2000 58, 34-35.
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A. y Franzetti, L. 1999. Production of cyclopiazonic acid by molds isolated from Taleggio cheese. *J. Food Prot.* 62, 1198-1202.
- Francisco, J.J.; Gutiérrez, L.M.; Menes, I.; García, M.L.; Díez, V. y Moreno, B. (1981). Flora microbiana del jamón crudo curado. *Anal. Bromatol.* 33, 259-272.

- Gallardo, G. (2011). Puesta a punto de un método de HPLC-MS para la caracterización de mohos micotoxigénicos. Trabajo Fin de Master en Gestion de la Calidad y Trazabilidad de alimentos de Origen vegetal. Julio de 2011.
- Geisen, R. 1998. PCR for detection of mycotoxin-producer fungi. En: Application of PCR on Mycology. Eds. P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander. CAB Publishing. Wallingfond. Reino Unido, pp.
- Larsen, T.O. y Frisvad, J.C. (1995) Chemosystematics of *Penicillium* Based profiles of volatile metabolites. *Mycological Research*, 99: 1167-1174.
- Leistner, L. (1984). Toxinogenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. *Food Technol. Aust.* 36, 404-406.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., García-López, M.L. y Otero, A. 2001. Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, 69-74.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermúdez, M.E., Córdoba, M.G., Aranda, E y Córdoba, J.J. 2002. Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening pork loins. *Meat Sci.* 62, 129-137.
- Martín, A., Jurado, M., Rodríguez, M., Núñez, F. y Córdoba, J.J. 2004. Characterization of molds of drycured meat products by micellar electrokinetic capillary electrophoresis and RAPD-PCR. *J. Food Prot.* 67, 2234-2239.
- Monte, E.; Villanueva, J.R. y Domínguez A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 355-359.
- Nijs, M., Larsen, J.S., Gams, W., Rombouts, F.M., Wenars, K., Thrane, V. y Notermans, S.H.W. (1997) Variations in random amplified polymorphic DNA patters and secondary metabolite profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of The Netherlands. *Food Microbiology*, 14: 449-457.
- Nuñez, F.; Rodríguez, M.M.; Bermúdez, M.E.; Córdoba, J.J. y Asensio, M.A. (1996). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 185-197.
- Núñez, F., Díaz, M.C., Rodríguez, M., Aranda, E., Martín, A., y Asensio, M.A. 2000. Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *J. Food Prot.* 63, 231-236.
- Núñez, F., Westphal, C. D., Bermúdez, E., & Asensio, M. A. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. *Journal of Food Protection*, 70(12), 2829e2836.
- Pitt, J.I. (2001) Toxigenic *Penicillium* species. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (eds) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edn, Washington DC, ASM Press, 467-480.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., y Córdoba, J. (2012). Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27 (2012) 118-126.

- Rodríguez, M.M.; Núñez, F.; Córdoba, J.J.; Sanabria, C.; Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 239-335.
- Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M.A. y Núñez, F. 2002. Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *J. Food Prot.* 65, 988-992.
- Varga, J., Péteri, Z., Tábori, K., Téren, J., Vágvölgyi C., (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 99, Issue 3, 1 April 2005, Pages 321-328.
- Virgili, R., Simoncini, N., Toscani, T., Leggieri M. C., Formenti, S., Battilani, P., 2012. Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. *Toxins* 2012, 4, 68-82