



TESIS DOCTORAL

**“ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN
DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS UTILIZANDO
MICROORGANISMOS Y FACTORES AMBIENTALES”**

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Ana Belén Peromingo Arévalo

Cáceres, 2018



TESIS DOCTORAL

**“ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN
DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS UTILIZANDO
MICROORGANISMOS Y FACTORES AMBIENTALES”**

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Instituto Universitario de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar)

Facultad de Veterinaria

Ana Belén Peromingo Arévalo

DIRECTORES

Director:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'MRJ', is placed on a light blue rectangular background.

Fdo: Mar Rodríguez Jovita

Codirector:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'ARJ', is placed on a light blue rectangular background.

Fdo: Alicia Rodríguez Jiménez

Cáceres, 2018



FACULTAD DE VETERINARIA

HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Avda. de la Universidad s/n

E-10071-Cáceres (Spain)

Teléfono: + 34 927 257125

MARÍA DEL MAR RODRÍGUEZ JOVITA, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por Dña. Ana Belén Peromingo Arévalo titulado “Estrategias para el control de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados utilizando microorganismos y factores ambientales”, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 21 de noviembre de 2017.

Fdo: Mar Rodríguez Jovita



FACULTAD DE VETERINARIA

HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Avda. de la Universidad s/n

E-10071-Cáceres (Spain)

Teléfono: + 34 927 257125

Alicia Rodríguez Jiménez investigadora doctora contratada Juan de la Cierva-Incorporación del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Extremadura,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por Dña. Ana Belén Peromingo Arévalo titulado “Estrategias para el control de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados utilizando microorganismos y factores ambientales”, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 21 de noviembre de 2017.

Fdo: Alicia Rodríguez Jiménez

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a las entidades que han contribuido a la realización de esta Tesis doctoral, al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2014-069484), así como la ayuda de Estancias Breves (EEBB-I-17-12099) para realizar parte de mi trabajo en la Universidad Natural Resources and Life Sciences, (BOKU) (Viena) y por la financiación del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral a través de los proyectos (AGL2013-45729-P y AGL2016-80209-P). Del mismo modo agradecer a la Junta de Extremadura y FEDER (GR15108) por la financiación recibida.

Gracias a mis directoras, las Dras. Mar Rodríguez y Alicia Rodríguez, por su dedicación y entrega, por enseñarme todo lo que saben y más, y por confiar en mí y darme la oportunidad de haber realizado esta Tesis Doctoral junto a ellas formando un gran equipo, de corazón, gracias.

Gracias a los Dres. Félix Núñez y M^a Jesús Andrade, porque fueron quienes despertaron mi interés por la investigación y a los Dres. Elena Bermúdez, Miguel Ángel Asensio y Juan José Córdoba por sus consejos y ayuda desinteresada y por su apoyo mostrado desde el primer día.

Thanks to the entire team of the Department of Agrobiotechnology of University of Natural Resources and Life Sciences, (BOKU) (Viena), specially to Dr. Michael Sulyok, for allowing me to develop in their Department some of the work collected in this Thesis. I would also like to thanks to Dr. Mark Lemmens, and my colleagues Armin and David, for their help throughout the period abroad.

Gracias al Servicio de Innovación de Productos de Origen Animal (SIPA) de la Universidad de Extremadura, al Dr. Antonio Silva y a su equipo por su apoyo en el análisis de las muestras.

Gracias a Dani y a Andrés Caro, del Departamento de Ingeniería de Sistemas Informáticos y Telemáticos, por su colaboración en el desarrollo del modelo matemático para predecir micotoxinas y por enseñarme que las matemáticas y la informática es un gran mundo que hay que explorar.

Gracias a todos mis compañeros del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria, en especial a Josué, Alberto, Patricia y Lourdes, porque más que compañeros son amigos. Nunca les ha importado ni la hora ni el día que sea, que siempre están dispuestos a echarme una mano; y con los que he pasado grandes momentos, buenos y malos, y siempre han estado ahí para sacarme

una sonrisa. Cada uno me habéis aportado algo diferente y especial, y siempre os agradeceré todo lo que me habéis dado, ¡sois los mejores! A mi gran amiga Mariví, que desde septiembre de 2006 nos hemos hecho inseparables, y está claro que cuando una amistad es de verdad no importan los baches que pasemos, ¡no cambies nunca Mari!

Gracias a Librada y a Alfredo, porque su ayuda desinteresada ha sido fundamental, y porque siempre nos han ayudado con una sonrisa.

Gracias también a todo el grupo de Tecnología Alimentaria por permitirme utilizar sus equipos de forma desinteresada para el análisis de algunas muestras. A Laura y Estefanía, porque son dos chicas geniales con las que pasado grandes momentos y a las que les tengo un gran aprecio, y a Alberto González, que poco a poco ha sabido ganarse mi cariño.

A mis amigas, que siempre han sido capaces de sacarme una sonrisa y han conseguido que olvidase mis agobios y problemas cuando estaba con ellas, gracias porque la palabra amistad con vosotras se queda pequeña. A mi gran amiga Carla, amiga incondicional, que siempre ha estado a mi lado y se ha preocupado por mi bienestar, porque no hay mejor amiga tu, y, aunque no hablemos todo lo que nos gustaría, se que siempre estarás ahí.

En especial a mis padres, las personas más importantes de mi vida, y, a día de hoy, soy quien soy gracias a ellos. Mi ejemplo a seguir, quienes me han enseñado que todo se puede conseguir con trabajo y constancia. Gracias mamá por todos tus consejos y tu apoyo, por tu valentía y fuerza, porque no conozco a nadie más luchadora que tú, y espero poder llegar a ser igual que tú en un futuro. Gracias papá porque eres capaz de dejarlo todo por mí, por apoyarme en todo y estar siempre a mi lado. Sois los mejores padres que una puede desear y no os imagináis lo fundamentales que sois en mi vida, ¡os quiero! A mi hermana Rosa, un pilar fundamental en mi vida y a quien he tenido de referencia todos estos años, con quien he reído, llorado y peleado, pero siempre ha estado a mi lado en los peores momentos, ¡te quiero hermanita!

Y a mi mitad, mi gran tesoro, Alejandro. Gracias por estar siempre a mi lado, cuidarme y mimarme, por escucharme y animarme a seguir adelante y por ser mi gran apoyo en los malos momentos, no hay nadie mejor que tu...

A todos, humildemente, gracias.

*A mis padres,
a mi hermana,
a Alejandro.*

*"Solo una cosa vuelve un sueño imposible:
el miedo a fracasar".*

- Paulo Coelho -

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	3
I.1.1. JAMÓN CURADO	3
I.1.2. EMBUTIDOS CURADOS-MADURADOS.....	7
I.2. EFECTOS DE LA POBLACIÓN FÚNGICA EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	9
I.3. MICOTOXINAS Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS DETECTADOS EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	11
I.3.1. OCRATOXINA A	13
I.3.1.1. Características generales	13
I.3.1.2. Genes implicados en la ruta biosintética de la ocratoxina A	15
I.3.2. AFLATOXINAS.....	17
I.3.2.1. Características generales	17
I.3.2.2. Genes implicados en la ruta biosintética de las aflatoxinas	18
I.3.3. ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO	19
I.3.3.1. Características generales	19
I.3.3.2. Genes implicados en la ruta biosintética del ácido ciclopiazónico	20
I.3.4. OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	21
I.4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE MOHOS TOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS	22
I.4.1. MÉTODOS BASADOS EN MODELOS MATEMÁTICOS DE CRECIMIENTO	22
I.4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	23
I.4.3. MÉTODOS MOLECULARES	25
I.5. CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	27
I.5.1. CONTROL DE PARÁMETROS AMBIENTALES DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	29
I.5.2. UTILIZACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL	31
I.5.3. TÉCNICAS DE MINERÍA DE DATOS	34
II. OBJETIVOS.....	37
II.1. OBJETIVOS	39
II.2. OBJECTIVES	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
III.1. MATERIAL	45
III.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS.....	45
III.1.2. TAMPONES	45
III.1.3. MEDIOS DE CULTIVO	47
III.1.3.1. Medios de cultivo de uso general	47
III.1.3.2. Medios de cultivo elaborados a partir de carne y derivados cárnicos	48
III.1.4. EQUIPOS	50
III.1.5. SOFTWARES.....	52

III.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO	52
III.2. MÉTODOS	54
III.2.1. ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ELABORADOS CON CARNE DE CERDO, JAMÓN CURADO Y SALCHICHÓN	54
III.2.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE LOS MICROORGANISMOS	55
III.2.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES Y DE MUESTREO	55
III.2.3.1. Difusión de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.....	57
III.2.3.1.1. Inoculación de los mohos toxigénicos en la superficie de los derivados cárnicos.....	57
III.2.3.1.2. Toma de muestras	57
III.2.3.2. Influencia de las condiciones ambientales en el control de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados	58
III.2.3.2.1. Inoculación de los mohos toxigénicos	58
III. 2.3.2.2. Evaluación del crecimiento	59
III.2.3.2.3. Toma de muestras	59
III.2.3.3. Estrategias de biocontrol de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados	60
III.2.3.3.1. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre mohos productores de aflatoxinas.....	60
III.2.3.3.1.1. Ensayos en medios de cultivo elaborados con carne y modificados con sal	60
III.2.3.3.1.2. Ensayos en jamón curado y salchichón.....	61
III.2.3.3.2. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre mohos productores de ocratoxina A.....	62
III.2.3.3.2.1. Ensayos en medios de cultivo elaborados con salchichón.....	62
III.2.3.3.2.2. Ensayos en salchichón	63
III.2.3.3.3. Efecto de <i>D. hansenii</i> y <i>P. chrysogenum</i> sobre mohos productores de ácido ciclopiazónico .	64
III.2.4. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE MICOTOXINAS	66
III.2.4.1. Extracción de micotoxinas	66
III.2.4.1.1. Estudio de difusión de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados	66
III.2.4.1.2. Extracción de ocratoxina A y aflatoxinas de los medios de cultivo elaborados con salchichón, carne o jamón curado mediante extracción clorofórmica	67
III.2.4.1.3. Extracción de micotoxinas basado en el método QuEChERS	67
III.2.4.1.4. Extracción de aflatoxinas de la matriz cárnica.....	69
III.2.4.2. Análisis de micotoxinas	70
III.2.4.2.1. Detección y cuantificación de micotoxinas y otros metabolitos secundarios en el estudio de difusión.....	70
III.2.4.2.2. Detección de la producción de ocratoxina A mediante HPLC-FLD	72
III.2.4.2.3. Detección de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico mediante uHPLC-MS/MS.....	72
III.2.4.2.3.1. Aflatoxinas	73
III.2.4.2.3.2. Ácido ciclopiazónico.....	74
III.2.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS	76
III.2.5.1. Extracción de ADN a partir de cultivos puros de mohos toxigénicos	76
III.2.5.2. Extracción de ARN de mohos de medios de cultivo y matrices cárnicas	77
III.2.5.3. Síntesis del ADN complementario	77

III.2.5.4. Métodos de RT-qPCR para el estudio de la expresión génica en mohos productores de micotoxinas.....	78
III.2.5.4.1. Estudio de la expresión génica de mohos productores de micotoxinas.....	78
III.2.5.4.1.1. Genes utilizados como control endógeno.....	78
III.2.5.4.1.2. Genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas.....	79
III.2.5.4.1.3. Genes implicados en la biosíntesis de ocratoxina A.....	80
III.2.5.4.1.4. Genes implicados en la biosíntesis del ácido ciclopiazónico.....	80
III.2.5.4.1.5. Genes que codifican la proteína antifúngica de <i>P. chrysogenum</i>	81
III.2.5.4.2. Desarrollo de los métodos de RT-qPCR basados en la metodología SYBR GREEN.....	81
III.2.5.4.2.1. Método de qPCR para el estudio de la expresión génica en mohos toxigénicos.....	81
III.2.5.4.2.2. Cálculo de la expresión génica relativa.....	83
III.2.6. ELABORACION DE MODELOS DE PREDICCIÓN MEDIANTE MINERÍA DE DATOS.....	84
III.2.6.1. Regresión Lineal Múltiple.....	84
III.2.6.2. Regresión Isotónica.....	85
III.2.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	85
IV. RESULTADOS.....	87
IV.1. DIFUSIÓN DE MICOTOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	89
IV.1.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	89
IV.1.2. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	90
IV.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DE DETECCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN JAMÓN CURADO USANDO UN MÉTODO QuEChERS Y uHPLC-MS/MS.....	93
IV.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR DE MASAS.....	93
IV.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	93
IV.2.2.1. Comparación de la composición de las fases móviles y los flujos.....	94
IV.2.2.2. Comparación del gradiente de la fase móvil.....	94
IV.2.2.3. Comparación de disolventes para la resuspensión de la muestra.....	97
IV.2.2.4. Parámetros de rendimiento del método.....	97
IV.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	97
IV.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	98
IV.3.1. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO DE <i>Penicillium griseofulvum</i> EN SISTEMAS MODELO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS.....	98
IV.3.1.1. Efecto en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento.....	99
IV.3.1.2. Efecto en la producción de ácido ciclopiazónico.....	100
IV.3.1.3. Efecto de la actividad de agua en la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis del ácido ciclopiazónico producido por <i>P. griseofulvum</i>	100
IV.3.2. EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS DE <i>Aspergillus flavus</i> Y <i>Aspergillus parasiticus</i>	102
IV.3.2.1. Selección de cepas aflatoxigénicas.....	102

IV.3.2.2. Efecto de la actividad de agua y temperatura en el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> y <i>A. flavus</i> y su producción de aflatoxinas.....	105
IV.3.2.2.1. Efecto en la fase de latencia de <i>A. parasiticus</i> y <i>A. flavus</i>	105
IV.3.2.2.2. Efecto en la velocidad de crecimiento de <i>A. parasiticus</i> y <i>A. flavus</i>	106
IV.3.2.2.3. Efecto en la producción de aflatoxinas de <i>A. parasiticus</i> y <i>A. flavus</i>	108
IV.3.2.3. Efecto de la actividad de agua y la temperatura en la expresión relativa de los genes implicados en la ruta biosintética de aflatoxinas.....	109
IV.3.2.3.1. Efecto de las condiciones ambientales en la expresión génica relativa de <i>A. flavus</i>	109
IV.3.2.3.2. Efecto de las condiciones ambientales en la expresión génica relativa de <i>A. parasiticus</i>	112
IV.3.2.4. Correlaciones entre la producción de aflatoxinas y la expresión relativa temporal de los genes biosintéticos.....	114
IV.4. PREDICCIÓN DE MICOTOXINAS.....	116
IV.5. BIOCONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	117
IV.5.1. EFECTO DE <i>D. hansenii</i> SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS.....	117
IV.5.1.1. Estudios en sistemas modelo de carne.....	118
IV.5.1.1.1. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de <i>A. parasiticus</i>	118
IV.5.1.1.2. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la producción de AFB ₁ y AFG ₁ de <i>A. parasiticus</i>	119
IV.5.1.1.3. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la expresión relativa de los genes <i>afR</i> y <i>afS</i> de <i>A. parasiticus</i>	121
IV.5.1.2. Estudio en derivados cárnicos curado-madurados.....	122
IV.5.2. EFECTO DE <i>D. hansenii</i> SOBRE MOHOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A.....	122
IV.5.2.1. Estudio en sistemas modelo de salchichón.....	122
IV.5.2.1.1. Efecto de la actividad de agua y la temperatura en la actividad antagonista de <i>D. hansenii</i> sobre la producción de ocratoxina A.....	122
IV.5.2.2. Estudio en un embutido curado-madurado.....	124
IV.5.2.2.1. Efecto de <i>D. hansenii</i> en la producción de OTA.....	124
IV.5.2.2.2. Efecto de <i>D. hansenii</i> en la expresión relativa de los genes <i>otapks</i> y <i>otanps</i>	124
IV.5.3. EFECTO DE AGENTES DE BIOCONTROL SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO.....	125
IV.5.3.1. Efecto en la producción de ácido ciclopiazónico.....	125
IV.5.3.2. Efecto en la expresión de genes asociados con la producción de ácido ciclopiazónico.....	125
V. DISCUSIÓN.....	127
V.1. DIFUSIÓN DE MICOTOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	129
V.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	135
V.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR MS/MS Y CROMATOGRÁFICAS.....	136
V.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	138
V.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS.....	140
V.3.1. MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO.....	141
V.3.2. MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS.....	143

V.3.2.1. Selección de cepas aflatoxigénicas	143
V.3.2.2. Efecto de las condiciones ambientales en el crecimiento, expresión génica y producción de micotoxinas	145
V.3.3. ESTUDIOS DE ECOFISIOLOGÍA COMO ESTRATEGIA DE CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS	149
V.4. PREDICCIÓN DE AFLATOXINAS EN JAMÓN CURADO	150
V.5. BIOCONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	153
V.5.1. EFECTO DE <i>D. hansenii</i> SOBRE <i>A. parasiticus</i> PRODUCTOR DE AFLATOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	154
V.5.2. EFECTO DE <i>D. hansenii</i> SOBRE <i>P. verrucosum</i> PRODUCTOR DE OCRATOXINA A EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	157
V.5.3. EFECTO DE <i>D. hansenii</i> Y <i>P. chrysogenum</i> SOBRE <i>P. griseofulvum</i> PRODUCTOR DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS	161
VI. CONCLUSIONES	165
VI.1. CONCLUSIONES	167
VI.2. CONCLUSIONS	169
VII. BIBLIOGRAFÍA	171
VIII. RESUMEN	221
VIII.1. RESUMEN	223
VIII.2. SUMMARY	227
IX. ANEXOS	231
ANEXO 1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL	233
ANEXO 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL	235

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

España es uno de los países con una mayor tradición en la elaboración y consumo de una gran variedad de derivados cárnicos curado-madurados entre los que destacan el jamón y los embutidos curado-madurados. La industria cárnica es el cuarto sector industrial en nuestro país y ocupa, con diferencia, el primer lugar de toda la industria española de alimentos y bebidas, representando más del 21,6% de todo el sector alimentario español. En 2016, la producción de carne de cerdo creció un 5%, superando, por primera vez, los 4 millones de toneladas. Con este volumen de producción, España se consolida como el segundo país europeo en producción de carne de porcino representando el 17,5% del total de la Unión Europea y se sitúa como cuarto mayor país productor mundial representando el 4 % de la producción mundial (MAPAMA, 2016).

La industria cárnica ha pasado, en apenas 25 años, de no hacer ventas exteriores a convertirse en el primer sector exportador de la industria agroalimentaria española y en una potencia en el mercado mundial de productos cárnicos. La exportación de jamón curado superó las 36 mil toneladas en 2014, mientras que la venta de embutidos curado-madurados superó las 43 mil toneladas, siendo el salchichón y el chorizo los productos más demandados (ANICE, 2016).

Debido a la importancia que tiene la carne de cerdo y los derivados cárnicos curado-madurados a nivel europeo y mundial, es importante conocer los peligros asociados a las distintas etapas del proceso de elaboración, especialmente en las etapas de secado y maduración, con el fin de obtener productos seguros y de alta calidad. A continuación, se detallan las características más importantes de estos productos cárnicos, así como sus procesos de elaboración.

I.1.1. JAMÓN CURADO

De acuerdo con el Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, el jamón curado es un producto elaborado con la extremidad posterior del cerdo que se ha sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o post-salado y maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias, constituyendo uno de los productos tradicionales más importantes de la carne de cerdo, típicos de la gastronomía española.

Posiblemente, la producción y el consumo de los derivados cárnicos curado-madurados se originó en el área mediterránea, ya que las condiciones climáticas eran las idóneas para el

procesamiento tradicional del jamón curado. Hoy en día, la tecnología de procesamiento ha cambiado y mejorado sustancialmente, lo cual va a permitir poder elaborar estos productos en cualquier parte del mundo.

Existen muchas variedades de jamones curados, según la genética, el tipo de alimento, las condiciones de cría de los cerdos, el tipo de condiciones de procesamiento (por ejemplo, el ahumado adicional) y la región o país de origen, dando lugar a muchos tipos diferentes de jamones en todo el mundo. La Unión Europea (UE) ofrece diferentes etiquetas para proteger estos jamones, como la Denominación de Origen Protegida (DOP), la Indicación Geográfica Protegida (IGP) o la Especialidad Tradicional Garantizada (ETG). En el área mediterránea podemos encontrar jamones ibéricos españoles como Dehesa de Extremadura, Guijuelo, Los Pedroches, Jamón de Huelva y Jabugo, jamones serranos de cerdo blanco como el Jamón de Trevélez y Jamón de Teruel, en Portugal se elaboran el jamón de Chaves, jamón Ibérico Alentejano y jamón Ibérico de Barrancos, en Italia el jamón de Parma y de San Daniele, y en Francia el jamón de Bayona. Todos ellos se caracterizan por tener un largo período de secado y maduración. Por otro lado, en las áreas del norte de Europa encontramos el jamón Spekeskinke de Noruega y el jamón Westphalian de Alemania caracterizados por ser de maduración corta y que incluyen un proceso previo de ahumado (Toldrá, 2010).

Durante el proceso de elaboración del jamón curado (Figura I.1.) se producen reacciones químicas y bioquímicas complejas, reguladas principalmente por la humedad, temperatura y tiempo de curado, que serán las responsables del color, textura, aroma y sabor característico del producto final (Martín y col., 2006). El proceso de fabricación del jamón curado comprende fundamentalmente las siguientes etapas, aunque puede haber modificaciones dependiendo de las características propias del procesado.

1. Recepción de materias primas

Los jamones son refrigerados durante 1–2 días a 2–4 °C para alcanzar una temperatura uniforme en toda la pieza cárnica. Las piezas cárnicas también pueden congelarse para facilitar, de este modo, la disolución de la sal en la superficie y su migración hacia el interior (Toldrá, 2010).

2. Pre-salado

Para facilitar la penetración de la sal se realiza un frotamiento con una mezcla que contiene sal, nitrato, nitrito, ascorbato y azúcares. Este masaje, además de eliminar la sangre residual y

moldear el jamón, va a aumentar la superficie de absorción y, con ello, favorece la penetración de la sal hasta los músculos más internos.

3. Salado

Consiste en la adición de sal con el fin de asegurar su penetración hacia el interior de la pieza cárnica. La sal ejerce funciones tales como una reducción inicial de la actividad de agua (a_w) e inhibición del crecimiento de microorganismos alterantes, facilita la solubilización parcial de las proteínas miofibrilares y da un sabor salado característico a los jamones. La incorporación de sal va a depender del tipo de jamón y del país de origen. Por ejemplo, en el caso de los jamones de Parma, la cantidad de sal que se agrega es proporcional al peso del pernil, tratándose la superficie externa de los jamones con salmuera de manera uniforme y dejándose durante 2 a 3 semanas (Toldrá, 2010). En España, los jamones se colocan en grandes recipientes, con la parte grasa hacia abajo y cubiertos de sal. El tiempo de salado es estrictamente controlado a 1,1 día/Kg de pernil (Toldrá, 2002), la temperatura se mantiene entre 2–4 °C y la humedad relativa (HR) entre 90 y 95%. Durante este tiempo, los jamones experimentan una ligera reducción de peso (3–4%) debido a la pérdida de agua.

4. Post-salado

El objetivo principal en esta etapa es equilibrar el contenido de sal y nitrato en el interior de los jamones a la vez que se inicia el proceso de deshidratación del producto. La velocidad de difusión de estos dos componentes es muy lenta y suele tardar entre 40 y 60 días, dependiendo del tamaño del jamón, el pH, la cantidad de grasa intramuscular y la temperatura. La HR se mantiene entre 80–90% y la temperatura debería ser inferior a los 6 °C hasta que en todos los puntos del jamón hayan alcanzado una a_w inferior a 0,96 (Toldrá, 2010).

5. Ahumado (opcional)

El ahumado es opcional y va a depender de las tradiciones y la localización, siendo típico en los países del norte de Europa. Estos jamones tienen un sabor a ahumado particular y, además, los compuestos del humo van a actuar como conservante debido a su efecto bactericida (Ellis, 2001).

6. Secado/Maduración

Esta etapa es muy importante para la calidad final del jamón curado, por ello, la velocidad del aire, la temperatura y la HR de la cámara de secado deben ser controladas y verificadas durante todo el proceso de maduración. Las condiciones de secado/maduración son muy

diferentes en cada tipo de jamón y país, dependiendo principalmente del contenido en sal (Andrés y col., 2005). Las temperaturas de secado oscilan normalmente entre 16 y 25 °C y las HRs entre 65% y 80%. En general, en este proceso son necesarios entre seis meses y dos años para lograr la estabilización del producto, alcanzando una pérdida de peso alrededor del 32–36% e incrementando la intensidad de la proteólisis y lipólisis que condicionarán el aroma del producto final (Toldrá, 1998; 2002). Los jamones producidos en España y Portugal van a necesitar un tiempo de maduración entre 1 año y medio o dos años, los jamones producidos en Italia tienen un tiempo de maduración mínimo de 12 meses, mientras que los jamones de Bayona tienen un tiempo de maduración más corto (máximo 12 meses).

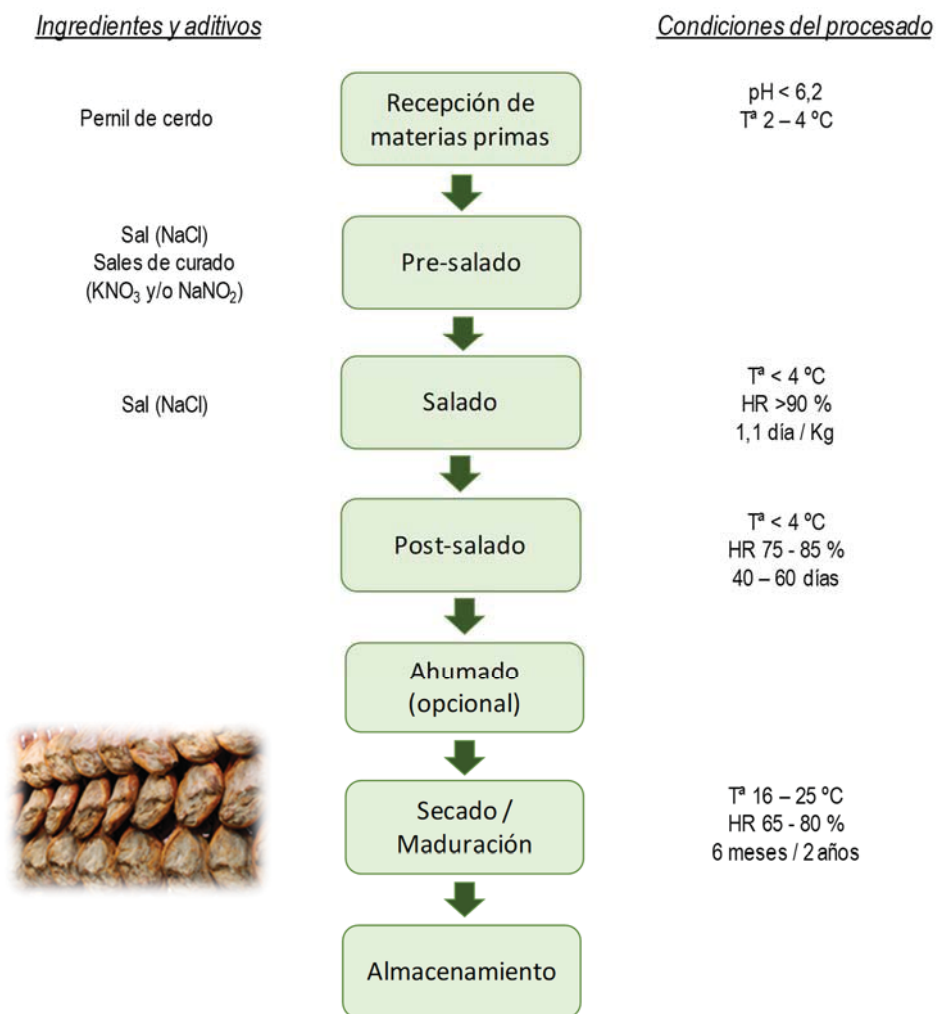


Figura I.1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del jamón curado.

I.1.2. EMBUTIDOS CURADOS-MADURADOS

Los embutidos curados-madurados son aquellos derivados cárnicos constituidos por trozos de carne o carne y grasa no identificables anatómicamente que, con carácter general y no limitativo, se han sometido a un proceso de picado más o menos intenso, mezclados con especias, ingredientes, condimentos y aditivos, embutidos o no en tripas naturales o envolturas artificiales, y sometidos a proceso de salazón seguido de curado/maduración, acompañado o no de fermentación, suficiente para conferirles las características organolépticas propias y su estabilidad a temperatura ambiente (Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos). En general, estos productos tienen un pH final que varía entre 5,2 y 5,8 y una a_w entre 0,85 y 0,91. El descenso de la a_w de estos productos se logra en los países mediterráneos, mediante el secado/maduración, y en los países del norte de Europa, utilizando el ahumado.

A pesar de la producción generalizada de embutidos curados en todo el mundo, Europa es el principal productor y consumidor de estos productos cárnicos, siendo Alemania, Francia, España e Italia los principales productores y consumidores (Di Cagno y col., 2008). La materia prima, la formulación, y el proceso de elaboración van a dar lugar a una amplia variedad de productos, debido a que existe una tecnología de fabricación flexible que permite modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w . En la figura I.2. se muestra el diagrama de flujo general del proceso de elaboración de un típico embutido curado-madurado elaborado en España. El proceso de fabricación comprende las siguientes etapas:

1. Recepción de materias primas

Todos los ingredientes empleados para la elaboración de los embutidos son refrigerados a temperaturas inferiores de 2 °C hasta su utilización. La carne utilizada proviene principalmente de diferentes partes del cerdo ($\text{pH} \leq 5,8$) a la que se le han eliminado los huesos, tejido conectivo y grasa intramuscular que puedan contener. La grasa aporta jugosidad, untuosidad, aroma y sabor al producto y debe agregarse lo más fresca posible, debido a que es un producto que se oxida con facilidad (Roncalés, 1994).

2. Picado y mezclado

La carne y la grasa son trituradas hasta alcanzar el tamaño de partícula deseado. Posteriormente, se añaden sales de curado (NaCl, nitratos/nitritos), aditivos (ascorbato, colorantes), otros ingredientes (azúcares, especias, hierbas aromáticas) y cultivos iniciadores

(bacterias ácido-lácticas y cocos Gram+ Catalasa+) que van a impedir el deterioro y desarrollo de microbiota patógena por la acidificación del producto, además de contribuir a la reducción del nitrato a nitrito, a la estabilización del color, mejora de la textura y prevención de la rancidez (Fadda y col., 2010; Ordoñez y col., 2001).

Después de obtener una mezcla uniforme, la masa de carne debe mantenerse en refrigeración y protegida del aire para permitir el desarrollo óptimo del color y la estabilización de la población microbiana.

3. *Embutido*

En esta etapa la mezcla se embute a vacío en envolturas naturales o sintéticas evitando así el color o los sabores anormales. En algunas ocasiones, se añaden cultivos fúngicos en la superficie de los embutidos (*Penicillium chrysogenum* y *Penicillium nalgiovense*) que pueden metabolizar los ácidos orgánicos y ejercer reacciones de desaminación oxidativa de los aminoácidos produciendo amonio que incrementa el pH de los embutidos y potencia el aroma y sabor típicos de estos productos (Marchesini y col., 1992).

4. *Fermentación*

Los embutidos se colocan en cámaras de maduración donde la temperatura, la HR y las condiciones de velocidad del aire van a depender del tipo de embutido que se produzca. En la fermentación de los embutidos tradicionales se aplican condiciones naturales y menos controladas (Lebert y col., 2007). Para los embutidos alemanes e italianos las condiciones de fermentación se llevan a cabo a temperaturas altas (18–24 °C) durante 1–2 días, mientras que la fermentación del embutido griego, argentino e italiano dura hasta 7 días. Por otro lado, la fermentación a temperaturas bajas (10–17 °C) durante una semana se usa en los embutidos franceses, españoles y portugueses (Toldrá, 2010).

5. *Secado/Maduración*

Esta etapa es una operación clave donde la velocidad de secado debe ser tan baja como sea posible. La cinética de secado y la duración varían, dependiendo de la temperatura y la velocidad del aire, suele oscilar entre 10–15 °C durante 4–12 semanas para los embutidos franceses, italianos, españoles y griegos, mientras que, para los embutidos elaborados en el este de Europa, la maduración se lleva a cabo a temperaturas más altas (16–18 °C) y durante menos tiempo. La HR oscila entre 6–90% (Lebert y col., 2007). Por otro lado, los países del centro y norte de Europa realizan un proceso de ahumado generando sabor y olor característico.

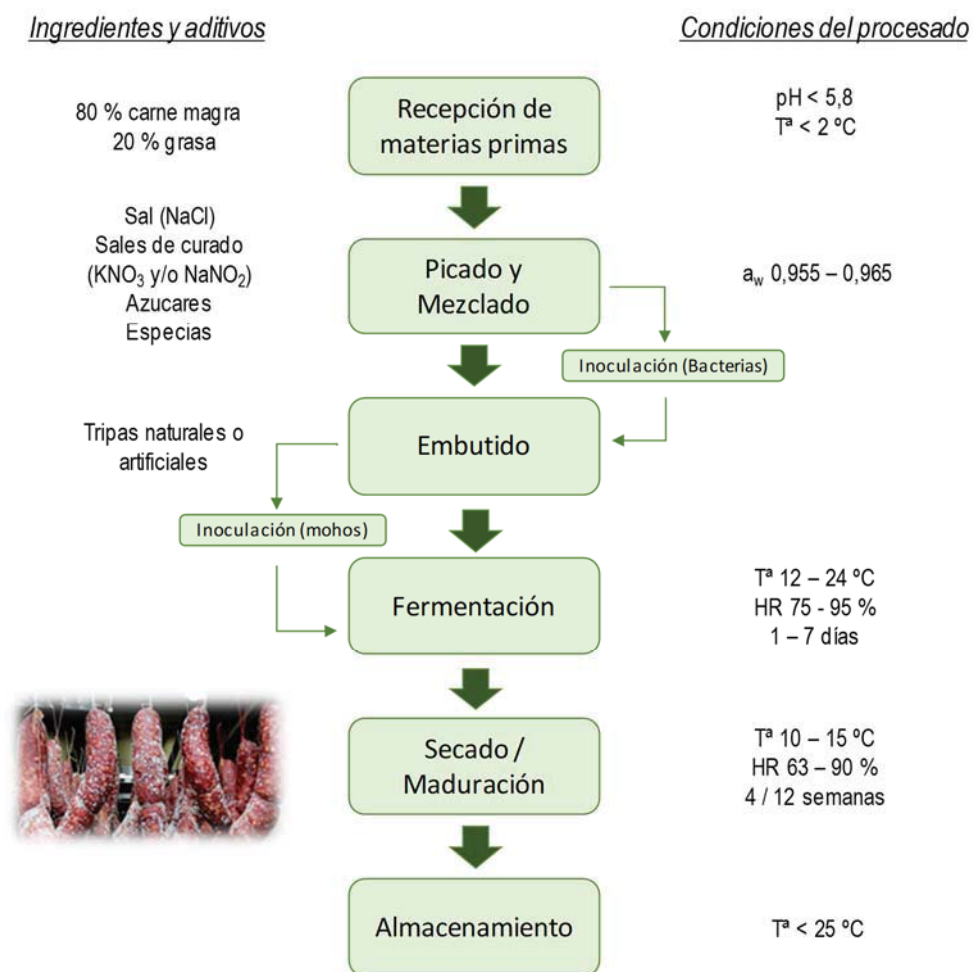


Figura I.2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de los embutidos curado-madurados.

I.2. EFECTOS DE LA POBLACIÓN FÚNGICA EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Las condiciones ecológicas alcanzadas durante el secado/maduración de los derivados cárnicos curado-madurados son las idóneas para el crecimiento de una población fúngica en su superficie (Núñez y col., 1996a; 1996b), responsable de la mayoría de las actividades metabólicas que se van a producir en el interior del producto y que van a determinar la calidad sensorial del producto final.

Dentro de esta población fúngica, los mohos de los géneros *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium* son los más frecuentemente encontrados en la superficie de los jamones curados, representando más del 98% de los mohos aislados (Iacumin y col., 2009; Núñez y col., 1996a; Pleadin y col., 2017). El género *Penicillium* es el mayoritario en la mayor parte de los jamones

curados de maduración corta (Núñez y col., 1996a). Sin embargo, en jamones con maduración prolongada, como el ibérico elaborado en España, a medida que se incrementa la temperatura y disminuye la a_w a valores entre 0,88–0,79 al final del proceso (Rodríguez y col., 2001), los mohos de los géneros *Aspergillus* y *Eurotium* son los mayoritariamente aislados (Núñez y col., 1996a; Asensio y col., 2004), si bien esto depende del proceso de elaboración propio de la industria jamonera. Además de los mohos, en la superficie del jamón curado también se desarrollan levaduras, siendo los géneros más comúnmente encontrados *Debaryomyces* y *Candida* y menos frecuentemente *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Rhodospiridium* (Asefa y col., 2009; Núñez y col., 1996b; Simoncini y col., 2007). La mayoría de las levaduras aisladas de jamones curados son consideradas como no patógenas con la excepción de *Candida zeylanoides* (Andrade y col., 2009; Núñez y col., 1996b; Purriños y col., 2013a, 2013b).

Por otro lado, al comienzo del proceso de secado/maduración de los embutidos curado-madurados, la HR puede llegar hasta el 98%, lo que conduce a una colonización superficial de mohos y levaduras. Las levaduras predominan en la superficie (95%) durante las primeras dos semanas, momento en el que los mohos comienzan a desarrollarse alcanzando recuentos similares a los de las levaduras (Samelis y Sofos 2003). En estos productos, al igual que en el jamón curado, los mohos del género *Penicillium* componen la población microbiana superficial predominante, aunque también se han aislado cepas del género *Aspergillus* y *Eurotium* (Battilani y col., 2007; Comi y col., 2004; López-Díaz y col., 2001; Papagianni y col., 2007; Scaramuzza y col., 2015; Sonjak y col., 2011; Sorensen y col., 2008). Con respecto a las levaduras, los géneros habitualmente encontrados en estos productos pertenecen a los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia* y *Trichosporon* (Andrade y col., 2010; Giarratana y col., 2014; Mendonça y col., 2013; Nielsen y col., 2006; Samelis y Sofos, 2003).

La población fúngica (mohos y levaduras) presenta diversas actividades metabólicas que van a influir positivamente en las características sensoriales del producto final. Destaca su contribución en los cambios proteolíticos y lipolíticos que se producen durante la maduración (Martín y col., 2002, 2004), produciendo un aumento de la concentración de aminoácidos y ácidos grasos libres, precursores de compuestos volátiles deseables en los derivados cárnicos curado-madurados (Martín y col., 2004, 2006) influyendo en el sabor y aroma del producto final. La proteólisis también influye en la textura, contribuyendo en la disminución de la dureza de los productos cárnicos y, al mismo tiempo, la población fúngica crea un microclima en la superficie del producto ayudando a regular la pérdida de humedad durante el procesado, protegiéndolo también

de la luz y del O₂ y evitando, de este modo, el enranciamiento del producto (Spotti y Berni 2007; López de Goicoechea, 2010).

Sin embargo, el desarrollo de una población fúngica no controlada en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados puede tener efectos indeseables relacionados con algunas alteraciones en la apariencia y el aroma del producto o con la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos y las micotoxinas. El desarrollo de ciertos mohos, como los pertenecientes a los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, puede provocar un aspecto no deseable en el jamón o embutidos, conocido como “pelo de gato”, y otros como *Cladosporium oxysporum* y *Cladosporium cladosporioides* producen manchas de color negro deteriorando el aspecto externo del jamón o del embutido (Alía y col., 2016; Lozano-Ojalvo y col., 2015). Del mismo modo, los mohos con gran capacidad lipolítica pueden ocasionar olores anómalos. Pero, el aspecto más preocupante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es la capacidad de algunos mohos de producir metabolitos secundarios como antibióticos y/o micotoxinas (López-Díaz y col., 2001; Núñez y col., 2000; 2007; Sosa y col., 2002). Estos compuestos tienen un efecto negativo en la salud humana tanto por su toxicidad como por su efecto acumulativo. Además, algunos de estos compuestos se han clasificado como sustancias carcinogénicas, otros pueden producir hemorragias, alergias o tener efectos degenerativos (Pestka y col., 1995; Bennett y Klich, 2003; Zain, 2011).

I.3. MICOTOXINAS Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS DETECTADOS EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos de origen fúngico, química y estructuralmente muy diversos, que pueden producirse en una amplia gama de productos básicos (Malachová y col., 2014). Estos metabolitos secundarios constituyen un grupo heterogéneo con numerosos efectos farmacológicos y tóxicos en la salud humana y animal, entre los que se incluyen compuestos farmacológicos como la penicilina o las estatinas, venenos potentes como aflatoxinas o tricotecenos, y metabolitos no tóxicos, como los alcaloides del cornezuelo de centeno.

En la actualidad se han identificado más de 400 metabolitos secundarios (Sulyok y col., 2010), pero solo alrededor de 30 son realmente preocupantes desde el punto de vista de la

seguridad alimentaria (Bennett y Klich, 2003). Las micotoxinas más importantes son producidas principalmente por mohos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Frisvad y col., 2006), aunque en los últimos años están cobrando bastante importancia las micotoxinas producidas por mohos del género *Alternaria* (EFSA, 2011). Las micotoxinas que tienen una mayor importancia alimentaria son: las aflatoxinas (AFs) (Kensler y col., 2011), ocratoxina A (OTA) (Santos y col., 2009), fumonisinas (Sulyok y col., 2010), deoxinivalenol (Varga y col., 2013), alternariol (da Cruz Cabral y col., 2016) patulina (Sulyok y col., 2006) y zeralenona (Zinedine y col., 2007a). Las micotoxinas suelen ser genotípicamente específicas para un grupo de especies de un mismo género. El mismo compuesto, no obstante, puede ser también elaborado por mohos pertenecientes a géneros distintos. En general, cuanto más compleja es la ruta biosintética de una micotoxina, menor será el número de especies fúngicas capaces de elaborarla (Moss, 1991).

Las micotoxinas son compuestos que, al ser introducidos en el organismo en pequeñas cantidades, pueden ocasionar patologías relacionadas con diferentes efectos nefrotóxicos, inmunotóxicos, hepatotóxicos, genotóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, pudiendo afectar gravemente la salud del consumidor (IARC 1993), aunque su efecto depende de la exposición a las mismas (Geremew y col., 2016; Udomkun y col., 2017). En el cuerpo humano, las micotoxinas reducen la solubilidad de los nutrientes, alteran el metabolismo proteico, lipídico y de los carbohidratos, afectando al crecimiento infantil, y, debido a su elevada estabilidad y ubicuidad, no pueden ser eliminadas fácilmente de los alimentos (Udomkun y col., 2017). Además, hay que tener en cuenta que el consumo de alimentos contaminados con varias micotoxinas a la vez, puede provocar efectos sinérgicos en su acción en el organismo aumentando así su toxicidad y siendo difícil evaluar los efectos adversos en la salud (Xu y col., 2006; Berthiller y col., 2007).

Para los humanos, la principal fuente de exposición a las micotoxinas son los cereales y los productos a base de cereales (Frisvad y col., 2006; Keller y col., 2013; Richard y col., 2009; Shimshoni y col., 2013), sin embargo, también pueden estar expuestos a una contaminación indirecta, debido a la presencia de micotoxinas residuales en alimentos obtenidos a partir de animales alimentados con piensos contaminados. Dependiendo de las vías metabólicas implicadas, los residuos pueden corresponder a la toxina nativa o a los metabolitos que mantienen todas o parte de las propiedades tóxicas de la molécula inicial. Por lo tanto, el paso a través de un "filtro animal" puede representar un proceso de desintoxicación o, por el contrario, conducir a la aparición de compuestos más tóxicos para el consumidor. Por lo tanto, los productos de origen

animal como la carne, los huevos y la leche pueden ser un vector importante de micotoxinas (Toldrá, 2009).

Por esta razón, la contaminación de los derivados cárnicos curado-madurados puede deberse o bien al consumo de piensos contaminados por los cerdos, al desarrollo de mohos sobre la superficie de estos productos durante el proceso de secado/maduración (Bertuzzi y col., 2013) o bien a la utilización de especias en la fabricación de los embutidos curado-madurados que estén previamente contaminadas con mohos toxigénicos o con estos compuestos tóxicos (Banach y col., 2016). Las principales micotoxinas detectadas en estos productos cárnicos han sido la OTA (Armorini y col., 2016; Bertuzzi y col., 2013; Comi y Iacumin, 2013b; Ferrara y col., 2016; Markov y col., 2013; Persi y col., 2014; Pleadin y col., 2013; Rodríguez y col., 2012b), las AFs (Markov y col., 2013; Pleadin y col., 2015a, 2015b; Rodríguez y col., 2012b) y el ácido ciclopiazónico (ACP) (Alapont y col., 2014; Bailly y col., 2005) producidas principalmente por cepas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Por este motivo resulta preocupante el crecimiento incontrolado de mohos en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados, por lo tanto, no solo debemos centrar nuestra atención en la eliminación de la población de mohos, sino que debemos ir más allá y buscar estrategias para impedir la producción de micotoxinas y otros metabolitos secundarios tóxicos.

A continuación, se detallan las características de las micotoxinas más importantes encontradas en derivados cárnicos curado-madurados, así como de otros metabolitos secundarios fúngicos que pueden ser sintetizados por las cepas más comúnmente aisladas en estos productos.

I.3.1. OCRATOXINA A

I.3.1.1. Características generales

La OTA es una molécula formada por un anillo de 3,4-dihidro metil isocumarina unido, por medio de su grupo carboxilo y través de un enlace tipo amida, a una molécula de fenilalanina (Figura I.3).

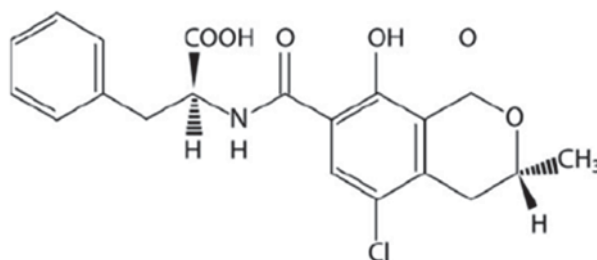


Figura I.3. Estructura química de la ocratoxina A.

Esta micotoxina fue detectada por primera vez en muestras de maíz y es considerada un metabolito secundario tóxico producido por hongos de los géneros *Aspergillus* (*Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger*) (Karolewicz y Geisen, 2005; Gil-Serna y col., 2011b) y *Penicillium* (*Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum*) (Lund y Frisvad, 2003; Bogs y col., 2006).

Las especies del género *Aspergillus* son las responsables de la contaminación por OTA en productos de origen vegetal como café, uvas pasas, zumo de uvas, cerveza, especias o vinos (González-Salgado y col., 2009; Gil-Serna y col., 2011b; Pantelides y col., 2017; Perrone y col., 2007, 2013; Saleemi y col., 2017; Sartori y col., 2006; Visagie y col., 2014), aunque en cereales también se han encontrado con bastante frecuencia cepas de la especie *P. verrucosum* (Amézqueta y col., 2012; Kulik y col., 2015; Lund y Frisvad, 2003; Saleemi y col., 2017). Por otro lado, las especies de *Penicillium*, especialmente *P. nordicum* y *P. verrucosum* han sido descritas como la principal fuente de contaminación por OTA en derivados cárnicos curado-madurados (Dall'Asta y col., 2008, 2010; Iacumin y col., 2009; Markov y col., 2013; Pleadin y col., 2013, 2015b; Rodríguez y col., 2014, 2015a, 2015b), sin embargo, recientemente, se han aislado cepas de *A. westerdijkiae* productoras de OTA en jamón curado (Vipotnik y col., 2017).

La OTA muestra propiedades nefrotóxicas, hepatotóxicas e inmunotóxicas (Petzinger y Ziegler, 2000). Los síntomas de una intoxicación aguda consisten en pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias multifocales y trombos de fibrina en los órganos de mayor actividad metabólica (bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón), así como nefrosis y necrosis hepáticas (López de Cerain y col., 2007). La OTA constituye, además, el principal factor determinante del desarrollo de tumores en el tracto urinario en el hombre (Kuiper-Goodman, 1991) y de la "Nefropatía endémica de los Balcanes" (Araguas y col., 2003) que está caracterizada por ser una grave afección histopatológica que cursa con una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en atrofia tubular y fibrosis periglomerular (López de Cerain y col., 2007). La OTA ha sido clasificada

por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el Grupo 2B como una molécula con posible actividad carcinogénica en humanos (IARC, 1993).

Por el momento, la Unión Europea ha fijado un contenido máximo de OTA en diferentes productos alimenticios como cereales, uvas pasas, café, vino y alimentos infantiles (Reglamento CE 1881/2006 de 19 de diciembre, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios), sin embargo, en otros productos como la cerveza, el cacao, frutos secos o los productos cárnicos, también expuestos a esta micotoxina, aún no tienen límites máximos fijados. Por otro lado, algunos ingredientes como las especias y el pimentón, habitualmente utilizados para la elaboración de los embutidos curado-madurados, cuentan con un límite máximo de OTA de 15 µg/kg (Reglamento UE 105/2010 de 5 de febrero por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a la ocratoxina A). Debido a esto, algunos países, como Italia, han establecido un límite legal de 1 mg/kg de OTA en carne de cerdo y sus productos derivados (Ministero della Sanità, 1999). Por otro lado, en EE.UU. se ha estimado que el consumo de carne de cerdo supone entre el 10,37% y el 21,38% de la ingesta total de OTA (Mitchell y col., 2017).

I.3.1.2. Genes implicados en la ruta biosintética de la ocratoxina A

La ruta biosintética de OTA aún no ha sido completamente establecida, aunque se han propuesto varias vías alternativas (Harris y Mantle, 2001; Huff y Hamilton, 1979). Se establecen tres etapas diferentes en la biosíntesis de OTA: la primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquétido de ocratoxina α a partir de acetyl-CoA y malonato, en la segunda se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la ocratoxina α , y, por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera ocratoxina C, y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (Huff y Hamilton, 1979). En la Figura I.4 se detallan cuáles son los pasos metabólicos de la biosíntesis de OTA, así como los principales enzimas y genes implicados en la misma.

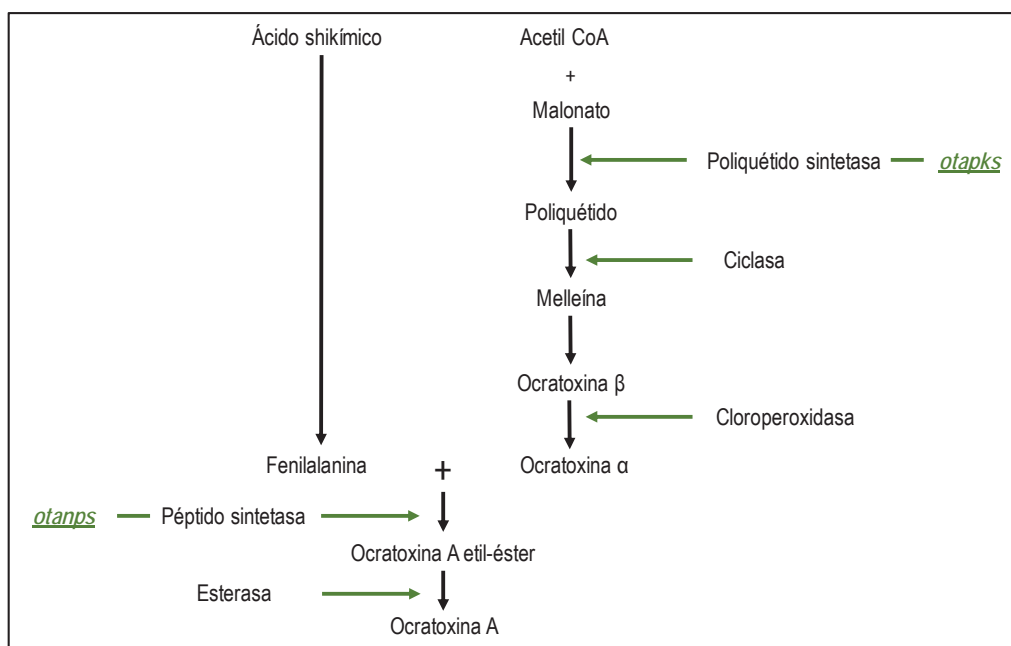


Figura I.4. Principales intermediarios metabólicos, genes y enzimas implicados en la ruta biosintética de OTA (adaptado de Karolewicz y Geisen 2005).

El *cluster* regulador de la biosíntesis de OTA en *P. nordicum* se encuentra dividido en dos segmentos relativamente próximos en el ADN. La primera parte es un fragmento de 10 kb de ADN cromosómico que contiene tres genes: el gen *otapks*PN, que codifica para una proteína poliquétido sintetasa, el gen *otanps*PN, codificante para la enzima péptido sintetasa no ribosomal y el gen *asp*PN que codifica para una enzima serina proteasa alcalina. La segunda parte descrita del *cluster* de OTA está localizada en un fragmento de 4,3 kb del ADN e incluye tres ORFs que codifican otras proteínas participantes, directa o indirectamente, en la biosíntesis de OTA: *otatra*PN, *otach*PN y *ntra*PN (Karolewicz y Geisen, 2005).

Se ha demostrado que las rutas de biosíntesis de OTA en *P. nordicum* y *P. verrucosum* son altamente homólogas para los genes *otanps*PN, *otatra*PN y *otach*PN pero no para el gen *pks* (Geisen y col., 2006). La investigación del genoma condujo a la identificación de otros dos ORFs junto al gen *pks* de *P. verrucosum*: *otaT* y *otaE*, que codifican un transportador y una oxidoreductasa, respectivamente. Debido a que se expresaban conjuntamente con el gen *otapks*PV, se hipotetiza que los genes *otaT* y *otaE* tienen un papel en la síntesis de OTA (Gallo y col., 2017).

Por otro lado, hay muy poca información sobre la ruta biosintética de OTA en especies del género *Aspergillus* (O'Callaghan y Dobson, 2006). Se ha identificado un gen codificador de una proteína poliquétido sintasa (PKS) que, junto a dos genes pertenecientes a la familia del citocromo P450, están correlacionados positivamente con la producción de OTA (O'Callaghan y col., 2006).

I.3.2. AFLATOXINAS

I.3.2.1. Características generales

Las AFs son compuestos químicos constituidos por furanocumarinas que contienen anillos de bifurano y configuración tipo lactona (Cabañes y col., 2007; Rubinstein y Theumer, 2011). Aunque son un grupo de más 12 sustancias, sólo 6 tienen importancia como contaminantes de los alimentos (aflatoxina B₁, aflatoxina B₂, aflatoxina M₁, aflatoxina M₂, aflatoxina G₁ y aflatoxina G₂). En esta Tesis doctoral vamos a centrar nuestro estudio en las aflatoxinas B₁ y G₁ (AFB₁ y AFG₁) que son las habitualmente encontradas en los derivados cárnicos curado-madurados (Figura I.5).

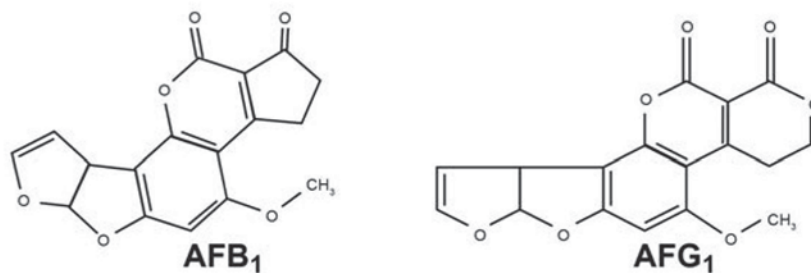


Figura I.5. Estructura química de las aflatoxinas B₁ y G₁.

Estas micotoxinas son compuestos tóxicos producidos principalmente por mohos del género *Aspergillus*, especialmente por las especies de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Bhatnagar y col., 2002; Schmidt-Heydt y col., 2009). Las cepas de *A. flavus* producen sólo AFB₁ y AFB₂ mientras que las de *A. parasiticus* puede producir AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Giorni y col., 2007; Vaamonde y col., 2003).

Las AFs pueden encontrarse en una gran variedad de alimentos contaminados por mohos productores como maíz y especias (Gallo y col., 2012; Hernández-Hierro y col., 2009; Mauro y col., 2013; Prella y col., 2014), cacao (Copetti y col., 2011), piensos, frutas desecadas y frutos secos (Bertuzzi y col., 2015; Gallo y col., 2016; Liu y col., 2017; Passone y col., 2010; Pietri y col., 2012; Rodrigues y col., 2009; 2013), cereales y sus productos derivados (Iqbal y col., 2014a; 2014b; Zinedine y col., 2007b). Por otro lado, también se ha demostrado su presencia en alimentos de origen animal como en derivados cárnicos curado-madurados (Markov y col., 2013; Pleadin y col., 2015a; Rodríguez y col., 2012a) o queso (Casquete y col., 2017). En el caso de la leche, se pueden encontrar AFM₁ resultante de la metabolización de la AFB₁ por los rumiantes que ingieren los piensos contaminados con esa micotoxina (Riley y Pestka, 2005).

Las AFs tienen actividad tóxica aguda sobre especies sensibles produciendo inhibición de la síntesis de proteínas, síndromes de Reye y de Kwashiorkor, especialmente en niños de los países tropicales, inmunosupresión, irritación dérmica, disrupciones endocrinas, hepatitis aguda y otras perturbaciones metabólicas; el cuadro clínico suele incluir hígado graso y edema cerebral severo (Martínez y col., 2013). A largo plazo se presentan efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos (Chulze y col., 2011; IARC, 2002; Kotsonis y col., 2001; Zain, 2011). La IARC ha clasificado a la AFB₁ en el grupo 1A, debido a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre, tanto aisladamente como en mezclas naturales con las otras aflatoxinas (IARC, 2002).

Debido a la gravedad de sus efectos tóxicos, la Unión Europea ha establecido unos límites máximos para diferentes matrices alimentarias (Reglamento CE 165/2010 de 26 de febrero de 2010) que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) 1881/2006, sin embargo, aún no se han establecido límites máximos para los derivados cárnicos curado-madurados. Cabe destacar que existen límites máximos para estas micotoxinas en el pimentón y en las especias de 5 µg/kg que pueden ser utilizados como ingredientes en los embutidos curado-madurados. Se ha establecido que la dosis tóxica para la carcinogénesis de la AFB₁ para humanos es 132 µg/kg/día (Moss, 2002).

1.3.2.2. Genes implicados en la ruta biosintética de las aflatoxinas

El grupo de genes implicados en la biosíntesis de AFs ha sido ampliamente estudiado. La agrupación o *cluster* de genes que codifican para la producción de AFs en *A. parasiticus* ya se ha descrito (Yu y col., 2004) y en el caso del *cluster* de *A. flavus* se conocen la mayoría de los genes (O'Brian y col., 2003) siendo ambos *cluster* homólogos entre sí. El *cluster* de AFs está formado por 25 genes dentro de un fragmento de ADN de 75 Kb de ADN (Bhatnagar y col., 2006; Levin, 2012; Yu y col., 2004) (Figura 1.6) siendo el orden de los genes en el *cluster* de ambas especies el mismo (Schmidt-Heydt y col., 2009).

Los principales genes reguladores implicados en esta ruta son los genes *afR* y *afS* (Abdel-Hadi y col., 2011). El gen *afR* es el noveno gen del *cluster* relacionado con la biosíntesis de AFs y codifica una proteína específica de unión a ADN de secuencia de tipo Zn (II) 2CyS₆, requerida para la expresión de la mayor parte, si no de todos, los genes estructurales de la ruta de las AFs (Georgianna y Payne, 2009). La transcripción de genes biosintéticos de AFs puede activarse cuando la proteína *afR* se une a la secuencia palindrómica 5'-TCG(N₅)CGA-3' en la región promotora de los genes estructurales en *A. flavus* y *A. parasiticus* (Ehrlich y col., 1999a, 1999b;

Fernández y col., 1998). El gen *afS*, que está junto al gen *afR*, también participa en la regulación de la biosíntesis de las AFs, aunque no interactúa con los genes estructurales (Chang, 2003), por lo que su papel en la biosíntesis de las AFs sigue siendo poco claro (Yu, 2012). La relación de los principales genes reguladores parece ser importante en la codificación de las enzimas que participan en la vía biosintética de AFs tanto en *A. flavus* como en *A. parasiticus*. En este sentido, se ha demostrado que los cambios en la ratio de la expresión de los genes *afR/afS* está en relación con las variaciones de la temperatura y la a_w (Schmidt-Heydt y col., 2009, 2010). Además, en *A. flavus* y *A. parasiticus*, un valor alto en esta ratio se relaciona con una mayor producción de AFB₁. Por otro lado, el gen *afP*, que codifica para la enzima esterigmatocistina-o-metiltransferasa y es uno de los genes estructurales activados por el producto del gen *afR* (Sweeney y col., 2000), es necesario para la producción de AFs (Abdel-Hadi y col., 2012; Lozano-Ojalvo y col., 2013; Rodríguez y col., 2012a).

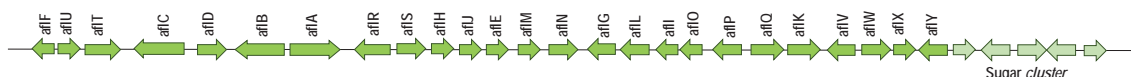


Figura I.6. Cluster de los genes implicados en la ruta biosintética de las aflatoxinas. Adaptado de Yu y col. (2004).

I.3.3. ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

I.3.3.1. Características generales

El ACP es una micotoxina con una estructura de un ácido indoltetrámico (Figura I.7), su nombre es consecuencia de que se aisló por primera vez en la especie *Penicillium cyclopium* (Holzapfel, 1968), posteriormente se ha encontrado en distintas especies del género *Penicillium* incluyendo *P. chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Penicillium crustosum*, *P. griseofulvum*, *Penicillium hirsutum*, *Penicillium melanoconidium*, *P. verrucosum* y *Penicillium viridicatum* (Alapont y col., 2014; Frisvad y col., 2004; Núñez y col., 2007; Sonjak y col., 2011), y también en algunas especies de *Aspergillus*, como *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus phoenicis* y especialmente *A. flavus* (Baquião y col., 2016; Díaz y col., 2010; Foltinová, y col., 2017; Oktay Basegmez y col., 2015; Pildain y col., 2008).

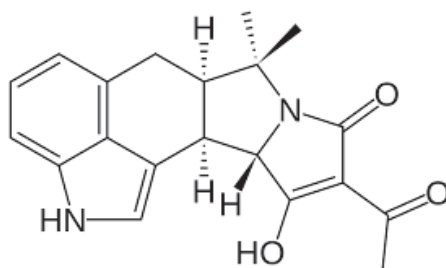


Figura I.7. Estructura química del ácido ciclopiazónico.

El ACP es un contaminante natural de productos vegetales como el maíz, el arroz, el cacahuete y el girasol (Astoreca y col., 2014, Fernández-Pinto y col., 2001; Hayashi y Yoshizawa 2005; Ross y col., 1991), aunque también se ha encontrado en alimentos de origen animal como la leche, el queso curado (Ansari y Häubl, 2016; Casquete y col., 2018; Oliveira y col., 2006; Zambonin y col., 2001) y el jamón curado (Alapont y col., 2014; Bailly y col., 2005).

La toxicidad del ACP se atribuye a su capacidad para alterar el flujo normal de calcio intracelular mediante la inhibición específica de la enzima ATPasa del sarcoplasma o del retículo endoplasmático que es esencial en el ciclo de relajación y contracción muscular (Chang y col., 2009a). Esta enzima juega un papel importante en muchas otras funciones celulares y por esta razón, el ACP también es utilizado como fármaco (Zhou y col., 2014). El ACP ha sido clasificado como una neurotoxina (Wannemacher y col., 1991), debido a sus efectos sobre el sistema nervioso central observados en animales de experimentación (por ejemplo, ataxia y espasmos extensores) (Frisvad y col., 2006), aunque no se han reportado incidentes de micotoxicosis por la presencia de ACP en seres humanos. En el contexto de la exposición humana, se ha establecido una dosis tóxica de ACP entre 0,1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (Burdock y Flamm, 2000; de Waal, 2002).

1.3.3.2. Genes implicados en la ruta biosintética del ácido ciclopiazónico

Hasta el momento, poco se conoce sobre la regulación de la biosíntesis del ACP en las distintas especies de mohos productoras. Chang y col. (2009a) estudiaron algunos de los genes implicados en la biosíntesis de esta micotoxina en *Aspergillus*. El *cluster* de ACP en *A. flavus* y *A. oryzae* incluye cinco y siete genes, respectivamente (Chang y col., 2009b; Kato y col., 2011). Entre ellos, los principales genes del *cluster* relacionados con la producción de ACP incluyen el gen *maoA*, que codifica para una monoamino oxidasa, el gen *dmaT*, que codifica para la enzima dimetilalil triptófano sintasa, el gen *pks-nrps* que codifica para una enzima policétido sintasa y péptido sintetisas no ribosomales y el gen *mfs-1* que codifica una enzima transportadora (Chang y col., 2009a, 2009b; Kim y col., 2014). Estos autores observaron que la disrupción de tres (*maoA*,

dmaT y *pks-nrps*) de los cuatro genes presentes en la región subtelomérica evitaba la producción de ACP en *A. flavus*.

Otros autores han demostrado que un incremento en la expresión del gen *laea*, que codifica para una enzima metiltransferasa, aumenta la producción de ACP en *Aspergillus fumisynnematus* mientras que la inactivación de gen *vea*, que codifica para una polipeptidasa, disminuye la producción de ACP en *A. flavus* (Chang y col., 2017; Durán y col., 2007; García-Rico y col., 2017; Hong y col., 2015). En un estudio reciente, se ha secuenciado el genoma de *P. griseofulvum* y se ha comprobado que el *cluster* de ACP es homólogo al descrito en *A. oryzae* (Banani y col., 2016) (Figura I.8).

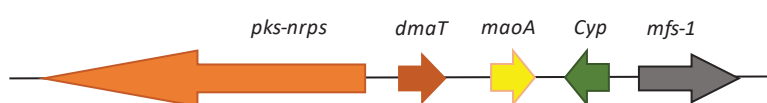


Figura I.8. *Cluster* de los genes implicados en la ruta biosintética del ácido ciclopiazónico en *Penicillium griseofulvum*. Adaptado de Banani y col. (2016).

I.3.4. OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS

La mayor parte de los estudios realizados sobre la toxicidad de los mohos, han estado enfocados en las principales micotoxinas como las mencionadas anteriormente, olvidándose, en ocasiones, que estos mohos son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios a la vez, pudiendo ser perjudiciales y beneficiosos (Banani y col., 2016). Algunos de ellos son muy útiles en la industria farmacéutica, utilizándose como fármacos para combatir enfermedades, como es el caso de la penicilina o la griseofulvina, En este sentido, *P. roqueforti* tiene el potencial de producir importantes metabolitos secundarios como el ácido micofenólico con propiedades antibacterianas e inmunomoduladoras (Fernández-Bodega y col., 2009; Nielsen y col., 2005, 2006) o las roquefortina A-D, toxina PR, y eremofortinas A-E con toxicidad significativa (Cakmakci y col., 2015; Fernández-Bodega y col., 2009; Frisvad y col., 2004; Hidalgo y col., 2014; Mioso y col., 2015) y que se pueden encontrar potencialmente en los quesos azules (Fontaine y col., 2015; Kokkonen y col., 2005). Otro ejemplo de mohos productores de varios metabolitos secundarios es *P. griseofulvum* que es capaz de sintetizar penicilina, patulina, meleagrín, roquefortina C, griseofulvina, ACP y chanoclavina I (Banani y col., 2016). Sin embargo, no hay muchos estudios enfocados en investigar que metabolitos secundarios producen las diferentes

cepas fúngicas, por lo que sería muy interesante conocer que metabolitos secundarios producen los mohos que encontramos habitualmente en los derivados cárnicos curado-madurados.

I.4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE MOHOS TOXIGÉNICOS Y MICOTOXINAS

I.4.1. MÉTODOS BASADOS EN MODELOS MATEMÁTICOS DE CRECIMIENTO

El interés de poder conocer y cuantificar el comportamiento microbiano ha fomentado el desarrollo de modelos matemáticos (Lahlali y col., 2005) que inicialmente estaban dedicados a evaluar la aparición de bacterias en alimentos (Dantigny y col., 2005), ya que la cuantificación del crecimiento fúngico era mucho más compleja que la bacteriana y por tanto el desarrollo de modelos de crecimiento de mohos no había recibido la misma atención (Gibson y Hocking 1997). Además, otro inconveniente es que las bacterias forman células individuales que crecen de forma exponencial y se pueden enumerar fácilmente, mientras que las hifas fúngicas pueden penetrar en la matriz alimentaria (Dantigny y col., 2005) y no crecen de forma exponencial (Koch, 1975).

En el caso de los mohos, los modelos matemáticos se utilizan tanto para prever el crecimiento como la producción de micotoxinas, y también para estudiar la respuesta de los mismos a los factores ambientales. Los modelos cinéticos microbianos se pueden clasificar como primarios, secundarios o terciarios (Whiting, 1995). Los modelos primarios describen cómo el número de microorganismos que hay en una población fúngica cambia a lo largo del tiempo en condiciones específicas (Marks, 2007). Los modelos secundarios se refieren al modelo primario que relaciona la influencia de factores ambientales, como la actividad del agua, el pH, la temperatura, etc., con la germinación y el crecimiento de los mohos. Y los modelos terciarios combinan ambos modelos con una interfaz informática, proporcionando una herramienta de predicción completa (Marks, 2007).

Quizá, la forma más simple y directa para medir la velocidad de crecimiento del moho sea medir el diámetro de la colonia (Gibson y Hocking, 1997), ya que, en general, hay un aumento lineal del diámetro de la colonia en el tiempo. Se supone que el crecimiento del moho en sustratos sólidos sigue un patrón que consiste en una fase de latencia y una fase de crecimiento lineal (Marín y col., 2005), aunque en condiciones subóptimas puede aparecer una fase estacionaria en la que

los mohos detienen su crecimiento, como por ejemplo condiciones limitantes de a_w (Gibson y col., 1994). Los modelos de crecimiento primario más frecuentemente utilizados son el modelo lineal que es el más utilizado para describir el crecimiento de mohos en placas de Petri (García y col., 2009), la ecuación modificada de Gompertz (Zwietering y col., 1990) y el modelo de Baranyi y Roberts (1994).

EL modelo lineal descrito por García y col. (2009) ha sido muy utilizado para evaluar el crecimiento de mohos en maíz (García y col., 2013), en pistacho (Marín y col., 2012), en arroz (Mousa y col., 2013) y en medios elaborados con jamón curado (Rodríguez y col., 2014).

I.4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

La contaminación de los alimentos con micotoxinas se ha convertido en un tema de gran preocupación en los últimos años. Con el fin de proteger la salud pública, se han establecido niveles máximos para las micotoxinas en determinados alimentos en el Reglamento CE 1881/2006. Debido a que estos niveles máximos son concentraciones muy bajas de micotoxinas y a la complejidad de las muestras de alimentos, son necesarias técnicas analíticas altamente sensibles, selectivas y fiables para su cuantificación (Dorne y col., 2009).

Los métodos de análisis convencionales para la detección de micotoxinas son la cromatografía en capa fina (TLC) (Filtenborg y col., 1996; Freire, y col., 2000; Overy y col., 2003), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Finoli y col., 1999; Frisvad y Thrane, 1987; Urano y col., 1992), la cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC–DAD) (Andersen y col., 2004b; Andersen y Frisvad, 2004a; Larsen y col., 2002) y la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC–FLD) (Krska y col., 1997; Malir y col., 2014; Toscani y col., 2007). Sin embargo, la mayoría de estos métodos emplean un paso de limpieza por extracción en fase sólida (SPE) o columnas de inmovilización para eliminar la interferencia y mejorar la determinación de las micotoxinas. Otras técnicas utilizadas son las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) (Turner y col., 2009) que, aunque es un método rápido y sensible, se pueden obtener falsos positivos.

También se han desarrollado métodos altamente selectivos, sensibles y precisos para la determinación de las micotoxinas mediante el acoplamiento del HPLC o la cromatografía líquida de ultra alta resolución (uHPLC) a la espectrometría de masas (MS/MS) en varias matrices alimentarias (Beltrán y col., 2011; da Silva y col., 2017; Huang y col., 2010; Ren y col., 2011; Wang

y Qin, 2016). El uHPLC-MS/MS permite, a diferencia de los demás métodos, separaciones cromatográficas más eficientes y rápidas, reduciendo tiempos de análisis y permitiendo obtener picos más estrechos, lo que aumenta la sensibilidad y mejora la resolución (Beltrán y col., 2011). Además, se han desarrollado dos tipos de fuentes de ionización: electropulverización (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) (Köppen y col., 2010) que son capaces de ionizar tanto en forma positiva como negativa, así como alternarse en la misma carrera cromatográfica, lo que permite una mejor detección para todos los analitos. El HPLC-MS/MS o el uHPLC-MS/MS, a diferencia de los otros HPLC descritos anteriormente, pueden utilizarse para la detección de varios analitos a la vez. Se han validado métodos para la detección de múltiples micotoxinas mediante HPLC-MS/MS en cereales y frutos secos (Juan y col., 2017a; Kamala y col., 2015; Sulyok y col., 2006; Varga y col., 2013), en piensos e ingredientes de piensos (Streit y col., 2013), pan, frutas, verduras, quesos y mermelada (Sulyok y col., 2010), vino (Pizzutti y col., 2014), manzana, puré para lactantes, avellanas, maíz y pimiento verde (Malachová y col., 2014). Por otro lado, el uHPLC acoplado al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ), en modo de monitorización de reacción seleccionado (SRM), se considera actualmente como una de las técnicas más selectivas y sensibles para la cuantificación y confirmación de contaminantes y residuos orgánicos en los alimentos (Chen y col., 2018; Gómez-Ramos y col., 2015; Reinholds y col., 2016).

Las diferentes propiedades fisicoquímicas de las micotoxinas y la gran variedad de las matrices alimentarias que existen suponen un problema a lo hora de la preparación de la muestra. Es necesario desarrollar métodos de extracción que utilicen disolventes adecuados para minimizar el efecto matriz de una gran cantidad de alimentos de diferente naturaleza y que sean apropiados para muchos analitos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Las extracciones clásicas líquido-líquido consistentes en mezclas de agua con altas cantidades de metanol o acetonitrilo (> 75%) suelen ser las más efectivas para la mayoría de las micotoxinas (Lacina y col., 2012; Mol y col., 2008). Sin embargo, algunas micotoxinas, como el ACP, son muy inestables, por lo que puede degradarse durante la extracción y ser, por consiguiente, difícil de detectar en alimentos por los métodos clásicos (Díaz y col., 2010). Recientemente una nueva metodología conocida como método QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), ampliamente utilizada en el análisis de pesticidas, se está utilizando cada vez más para la extracción de micotoxinas de distintas matrices alimentarias. Lehotay y col. (2005) demostraron su gran aplicabilidad mediante la validación de este método para 229 plaguicidas y, posteriormente, ha sido aceptado como método oficial de AOAC para múltiples plaguicidas en frutas y verduras. El principio clave es la

separación de los diferentes compuestos en una mezcla de acetonitrilo-agua inducida por la adición de sales inorgánicas, donde los analitos son transferidos a una fase orgánica y las impurezas de la matriz más polares se dejan en una capa acuosa (Anastassiades y col., 2003). Actualmente, se está utilizando ampliamente para extraer micotoxinas a partir de cereales o alimentos derivados (Annunziata y col., 2017, Cunha y Fernandes, 2010; Kamala y col., 2015; Tolosa y col., 2017; Zhou y col., 2017), vino (Pizzutti, 2014) y frutas (Juan y col., 2017b).

I.4.3. MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares ofrecen la posibilidad de poder evaluar la contaminación de los alimentos por mohos toxigénicos y su potencial para producir micotoxinas, realizando estudios de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas y su relación con la producción fenotípica de toxinas. La importancia de estos estudios se basa en que la transcripción de genes siempre ocurre antes de la producción de toxinas, por ello el análisis temporal de la expresión de los genes biosintéticos podría ayudar a establecer medidas preventivas y/o correctoras durante el procesado de los alimentos para minimizar o controlar la acumulación de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.

Entre los métodos moleculares disponibles para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos basándose en el apareamiento de bases entre hebras complementarias de ARN y ADN podemos encontrar las técnicas basadas en la transferencia de ácidos nucleicos, como son el método de *Southern blotting* (ADNc) y el método *Northern blotting* (detección del ARNm) que están limitadas al estudio de un solo gen y ninguna de ellas ha sido utilizada, hasta el momento, en el estudio de la expresión génica de mohos toxigénicos en alimentos (Du y col., 2007; Duran y col., 2007); y los *microarrays* que permiten el análisis comparativo y simultáneo de la expresión de miles de genes en muy pequeñas cantidades de muestras y en un tiempo muy reducido. Esta tecnología se ha utilizado en múltiples estudios de detección de mohos toxigénicos y cuantificación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas (Brunelle y Nicholson, 2007), en el estudio de la influencia de diferentes factores ambientales en la expresión de genes como la temperatura (O'Brian y col., 2007; Schmidt-Heydty col., 2009) y la a_w (Schmidt-Heydty y col., 2009). Sin embargo, esta última técnica es muy cara y requiere personal entrenado para su uso.

Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podrían ser una buena alternativa debido a su especificidad, sensibilidad y rapidez. Entre los métodos basados en

la PCR encontramos técnicas de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), que se han utilizado para la diferenciación e identificación de mohos toxigénicos (Chhotaray, y col., 2015; Elhariry, y col., 2011; Lorenzini, y col., 2014), las técnicas de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para diferenciar especies de mohos (Ahmad, y col., 2014; Garmendia, y col., 2018; Mirhendi, y col., 2016; Bintvihok, y col., 2016; Nasri, y col., 2015) y las técnicas de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) para la identificación de especies y subespecies de mohos (Jureen y col., 2008; Kuzina y col., 2008; Zhao, y col., 2015). Sin embargo, estas técnicas son útiles para la diferenciación de mohos a nivel de especie, e incluso, de subespecies, pero su capacidad para diferenciar entre cepas toxigénicas y no toxigénicas es más limitada.

En los últimos años, la PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR) es una de las técnicas más utilizadas para el estudio de la expresión génica de los mohos toxigénicos, la cual permite analizar la expresión temporal de los genes implicados en la ruta biosintética de las micotoxinas. Una de las principales ventajas de la RT-qPCR es que es más rápida que los métodos de PCR convencionales (Postollec y col., 2011) y altamente sensible y específica (Rodríguez y col., 2012b; Suanthie y col., 2009). Además, la RT-qPCR permite la cuantificación de pequeños cambios en la expresión génica, por lo que podría ser un indicador apropiado para determinar el riesgo de especies toxigénicas específicas (Abdel-Hadi y col., 2010) no requiriendo manipulaciones posteriores a la amplificación, lo que limita el riesgo de contaminaciones (Postollec y col., 2011).

Una de las formas de cuantificación de la expresión génica con la RT-qPCR es la cuantificación relativa que se utiliza para estudiar la magnitud de los cambios fisiológicos, en los niveles de expresión de un gen en estudio, en comparación con uno o más genes de referencia o controles endógenos (Pfaffl, 2004). Los controles endógenos utilizados deben estar fuertemente conservados en las diferentes especies fúngicas y corresponde a los llamados genes estructurales o housekeeping (Schmittgen y Livak, 2008). Entre los genes de copia única más utilizados en los estudios de expresión génica de los mohos productores de micotoxinas, destaca el gen *β -tubulina* (Gil-Serna y col., 2011a; Levin, 2012) que se encuentra altamente conservado y codifica la tubulina, una proteína globular que constituye el principal componente de los microtúbulos de las células fúngicas (Rodríguez y col., 2012c). En estos estudios también es necesario conocer las secuencias de los genes de interés para poder diseñar cebadores a partir de ellas. Este método se ha empleado en estudios recientes en el análisis de la expresión de los genes implicados en la

ruta biosintética de OTA (Bernáldez y col., 2017a; Castellá, y col., 2015; Ferrara y col., 2016; Rodríguez y col., 2011, 2012b, 2014; Schmidt-Heydt y col., 2007), de AFs (Abdel-Hadi y col., 2011; Passone y col., 2010; Rodríguez y col., 2012b; Sardiñas y col., 2011; Schmidt-Heydt y col., 2009, 2010) y de ACP (Rodríguez y col., 2012d), genes implicados en el estrés osmótico de los mohos (Geisen y col., 2013; Rodríguez y col., 2016) o genes que codifican proteínas producidas por mohos antifúngicos (Bernáldez y col., 2014).

La técnica de RT-qPCR también se ha utilizado para la detección y cuantificación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de las micotoxinas en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas, como la temperatura, la a_w , (Abdel-Hadi y col., 2012; Bernáldez y col., 2017b; Lappa y col., 2017; Lozano-Ojalvo y col., 2013; Medina y col., 2015a; Schmidt-Heydt y col., 2008, 2009, 2010, 2011b; Sosa y col., 2002;), la luz (Fanelli y col., 2012) y en diferentes matrices vegetales como almendras (Gallo y col., 2016), maíz (Medina y col., 2017) o matrices cárnicas como jamón curado y salchichón (Battilani y col., 2010; Rodríguez y col., 2014, 2015b; Vipotnik y col., 2017).

I.5. CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Una vez contaminado el producto, las micotoxinas pueden estar presentes en toda la colonia fúngica, incluyendo las hifas, micelio, sobre las esporas y en el sustrato sobre el que la colonia crece (Marín y col., 2011). Además, hay que tener en cuenta que las micotoxinas son capaces de difundir hacia el interior del alimento y permanecer en él incluso cuando el moho ha sido eliminado (Leistner y Eckardt, 1979). Existen estudios donde se ha comprobado la capacidad de difusión de varias micotoxinas hacia el interior de diferentes alimentos y se ha demostrado que la difusión va a depender de la micotoxina y del sustrato en el que se encuentre (Olsen y col., 2017; Reiß, 1981; Rychlik y Schieberle, 2001).

Debido al problema sanitario generado por la presencia de micotoxinas en los derivados cárnicos curado-madurados, es preciso buscar estrategias para controlar el desarrollo de mohos indeseables en la superficie de estos productos y que, a la vez, favorezca la actividad de los microorganismos con efectos deseables.

Entre los métodos físicos de control se encuentra la utilización de tratamientos térmicos, radiaciones ionizantes o altas presiones. También pueden emplearse compuestos químicos, así como el envasado en atmósferas modificadas (Alakomi y col., 2017; Carrizosa y col., 2017; Dordević y col., 2017; Sakowska y col., 2017). Estos tratamientos resultan eficaces para eliminar la totalidad de la población fúngica en determinados alimentos; sin embargo, en los derivados cárnicos curado-madurados no son aplicables ya que, como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo de mohos es esencial para las características sensoriales deseadas en el producto final (Martín y col., 2006). Además, algunos de estos métodos podrían promover la producción de micotoxinas, ya que estos metabolitos secundarios tóxicos pueden ser sintetizados en respuesta a factores de estrés (Magan y col., 2002; Schmidt-Heydt y col., 2013).

Por otra parte, se ha propuesto la aplicación combinada de distintos compuestos antifúngicos como son los ácidos sórbico y propiónico (Mann y Beuchat, 2008), pero no son totalmente eficaces, salvo a valores de pH ácidos o con altas concentraciones de sal (Razavi-Rohani y Griffiths, 1999). Además, algunas especies de *Penicillium* como *P. roqueforti*, *P. puberulum*, *P. cyclopium*, *P. brevicompactum* o de *Aspergillus* como *A. niger* crecen en presencia de altas concentraciones de propionatos o de sorbatos (Mann y Beuchat, 2008), por lo que se ha propuesto la aplicación combinada de distintos compuestos antimicóticos (Mann y Beuchat, 2008). Sin embargo, la demanda creciente de alimentos libres de aditivos, y especialmente de conservantes, hace necesario explorar nuevas alternativas para controlar el desarrollo de mohos toxigénicos durante la maduración de los alimentos.

La producción de estos metabolitos secundarios por los mohos está estrechamente ligada a diversos factores ambientales y nutricionales como son la composición del sustrato, pH, a_w , temperatura, etc. (Gallo y col., 2016; Lozano-Ojalvo y col., 2015; Magan y Medina, 2016; Medina y col., 2017; Rodríguez y col., 2015a; Virgili y col., 2012). Por ello, una posible estrategia es controlar los parámetros ambientales (temperatura y a_w) que se alcanzan durante la etapa de secado/maduración en el procesado de los derivados cárnicos curado-madurados.

También el uso de cultivos protectores puede ser una estrategia muy adecuada para prevenir el crecimiento de los mohos y la acumulación de micotoxinas. En este sentido, se ha descrito la utilización de levaduras autóctonas y mohos no toxigénicos como agentes de biocontrol en diferentes matrices alimentarias como el maíz (Medina-Córdova y col., 2016), el café (Masoud y Kalsoft, 2006), las frutas (Druvefors y Schnürer 2005; Liu y Tsao, 2009), el jamón curado (Bernáldez y col., 2013, Rodríguez y col., 2015b; Wang y col., 2006) y los embutidos curado-

madurados (Comi y col., 2013a; Iacumin y col., 2017; Meftah y col., 2018). Aunque el modo de acción más común de estos microorganismos es la competencia por los nutrientes y el espacio, algunos de ellos pueden producir compuestos activos contra los mohos no deseados. Específicamente, algunos mohos no tóxicos descritos como potenciales cultivos protectores son capaces de producir proteínas antifúngicas con actividad frente a especies toxigénicas comúnmente encontradas en derivados cárnicos (Acosta y col., 2009).

Además, la utilización de técnicas de minería de datos podría permitir la predicción del crecimiento de mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas en función de diferentes parámetros claves que van a influir directamente sobre ellos, y, de esta manera, poder controlar el desarrollo de estos mohos indeseables.

En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo diferentes estrategias para controlar el desarrollo de mohos, y en especial, la producción de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.

I.5.1. CONTROL DE PARÁMETROS AMBIENTALES DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

La composición del sustrato, así como las condiciones ambientales relacionadas con el procesado de los derivados cárnicos curado-madurados, influyen de forma importante en el crecimiento de una determinada especie de moho y en la producción de micotoxinas. Se ha comprobado que hay ciertas especies de mohos que son capaces de crecer y desarrollarse en un determinado nicho, mientras que otras especies no. La adaptación se debe a la capacidad de estas especies de producir una batería de enzimas hidrolíticas extracelulares y a la producción de distintos tipos de metabolitos secundarios y volátiles como es el caso de *P. nordicum* (Magan y Aldred, 2007).

Dentro de los factores que influyen en el desarrollo de los mohos, en la producción de micotoxinas y en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de estas micotoxinas, se encuentran algunos como la humedad, la temperatura, la presencia de oxígeno y dióxido de carbono, el tiempo del experimento, la composición del sustrato, el inóculo y la interacción entre las especies de mohos que comparten el mismo nicho ecológico (Gallo y col., 2016). Entre estos factores, las condiciones ambientales tales como la temperatura y la a_w se han identificado como dos de los principales factores abióticos que afectan al crecimiento de mohos (Medina y col.,

2015b), además las condiciones para la producción de micotoxinas son generalmente más restrictivas que las de crecimiento y pueden variar incluso entre diferentes micotoxinas producidas por la misma especie de moho.

En la tabla I.1 se pueden observar los valores óptimos y marginales de crecimiento de las diferentes especies de mohos toxigénicas, así como la producción de OTA, AFs y ACP. En el caso de los mohos productores de OTA, el crecimiento y producción de OTA va a depender de la especie, en general, el crecimiento de *P. nordicum* está más limitado que el de *P. verrucosum*, aunque es capaz de producir OTA en un mayor rango de a_w (Magan, 2006; Rodríguez y col., 2015b). Por otro lado, *A. parasiticus* y *A. flavus* son capaces de crecer y producir micotoxinas en un amplio rango de a_w , mientras que la producción de AFs va a estar limitada a valores entre 16–31 °C (Pitt y Hocking, 2009). Por último, no existen estudios que hayan determinado la temperatura y a_w necesarias para que *P. griseofulvum* pueda crecer y producir ACP, sin embargo, existe un estudio inicial (Sosa y col., 2002) que determinó que las condiciones óptimas de crecimiento *P. commune* productor de ACP eran a 20–25 °C y a_w 0,97–0,96, que eran diferentes a las de producción de la micotoxina (30 °C, a_w 0,96).

Tabla I.1. Valores de temperatura y actividad de agua (a_w) necesarios para el crecimiento de algunas especies de mohos y la producción de micotoxinas (Adaptado de Magan, 2006; Pitt y hocking, 2009; Rodríguez y col., 2015b y Sosa y col., 2002).

Especie	Micotoxina	Temperatura (°C)		a_w mínima		Referencia
		Crecimiento	Producción de micotoxinas	Crecimiento	Producción de micotoxinas	
<i>P. nordicum</i>	OTA	8 – 35	10 – 30	0,84	0,85	Magan, 2006; Rodríguez y col., 2015b
<i>P. verrucosum</i>	OTA	0 – 31	0 – 31	0,80	0,83	
<i>Aspergillus spp.</i>	AFs	12 – 42	16 – 31	0,82	0,82	Pitt y Hocking, 2009
<i>P. commune</i>	ACP	12 – 30	12 – 30	0,90	0,90	Sosa y col., 2002

Hasta el momento se han llevado a cabo varios estudios donde se ha evaluado la influencia de una amplia variedad de temperaturas y a_w sobre el crecimiento, la producción de micotoxinas y la expresión de genes implicados en las rutas biosintéticas de estos metabolitos secundarios producidos por distintas especies toxigénicas de mohos en diferentes medios de cultivo y matrices alimentarias. Con respecto a los mohos productores de OTA, se han realizado estudios en medio de cultivo que promueven la producción de OTA modificados y no modificados con concentraciones de sal (Geisen y col., 2004; Schmidt-Heydt y col., 2007, 2012), en medios de cultivo elaborados con salchichón y jamón curado (Battilani y col., 2010; Leggeri y col., 2011;

Rodríguez y col., 2014, 2015a; Vipotnik y col., 2017), en medios de cultivo elaborados con cebada (Pardo y col., 2006) y en matrices alimentarias como cereales (Cairns-Fuller y col., 2005) y en salchichón (Ferrara y col., 2016).

Por otro lado, también se han publicado estudios similares con cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de AFs en medios de cultivo sintéticos como el medio YES (Abdel-Hadi y col., 2011; Medina y col., 2015b; Schmidt-Heydt y col., 2009, 2010), en medios de cultivo elaborados con almendras (Gallo y col., 2016), con queso (Casquete y col., 2017) o con maíz (Medina y col., 2017). Sin embargo, no hay ningún estudio relacionado con la influencia de los parámetros ambientales sobre el crecimiento, la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de AFs y ACP y la producción de estas micotoxinas en las condiciones habituales propias de las etapas de secado/maduración de los derivados cárnicos curado-madurados.

Los valores de temperatura y a_w óptimos para el desarrollo de las micotoxinas (AFs, OTA y ACP) descritos anteriormente coinciden con las condiciones de temperatura y a_w necesarias para la maduración de productos cárnicos, por ello, estos parámetros pueden ajustarse para favorecer el crecimiento fúngico, pero no la producción de micotoxina, incluso, pueden ajustarse junto a la utilización de otras medidas preventivas para desarrollar estrategias globales que limiten el desarrollo de los mohos productores.

I.5.2. UTILIZACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL

La elección de los microorganismos que van a ser utilizados para controlar la población de mohos que se desarrolla en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados es esencial, ya que no pueden ser tóxicos y deben mostrar una actividad metabólica adecuada, que no implique la producción de compuestos no deseables. Además, estos microorganismos deben ser capaces de adaptarse a una amplia gama de temperaturas y a_w y a todas las condiciones ecológicas del proceso de elaboración de los productos cárnicos, siendo capaces de desarrollarse o incluso superar a las especies que habitualmente colonizan estos productos. Resultaría de gran relevancia la selección de cepas autóctonas, sin embargo, a la hora de valorar esta posibilidad es necesario evaluar previamente la capacidad de inhibición de los microorganismos seleccionados, así como detectar si pueden producir micotoxinas u otros compuestos indeseables o, por el contrario, poseen una gran capacidad antifúngica.

Dentro de los microorganismos que pueden ser utilizados como agentes de biocontrol en los derivados cárnicos curado-madurados, destacan las levaduras, los mohos no toxigénicos y las bacterias ácido-lácticas (Andrade y col., 2014; Bernáldez y col., 2013; Crowley y col., 2013; Rodríguez y col., 2015b; Sangmanee y Hongpattarakere, 2014; Virgili, y col., 2012), aunque en esta Tesis Doctoral se han utilizado únicamente los dos primeros grupos de microorganismos.

Las levaduras son microorganismos que crecen de forma natural en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados a lo largo de todo el proceso de maduración, alcanzando recuentos diferentes dependiendo del proceso de elaboración y del tipo de producto (Simoncini y col., 2007). Entre estas levaduras, la especie *Debaryomyces hansenii* es la que se encuentra mayoritariamente en estos productos (Andrade y col., 2009; Núñez y col., 1996b), destacando que además es considerada como un "microorganismo seguro" por el Grupo de expertos sobre Seguridad Biológica de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) y se puede añadir en la producción de alimentos sin la necesidad de estudios adicionales (EFSA, 2012). Su eficacia como agente de biocontrol ha sido demostrada frente a mohos productores de OTA (Andrade y col., 2014; Iacumin y col., 2017; Meftah y col., 2018; Núñez y col., 2015; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012), en cambio, nunca ha sido evaluada su eficacia frente a mohos productores de AFs y ACP. El principal mecanismo de acción de las levaduras antagonistas parece ser la competencia por los nutrientes y el espacio (Andrade y col., 2014; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012; Zhao y col., 2008), aunque también se ha descrito que algunas cepas son capaces de producir compuestos volátiles con actividad antifúngica (Fialho y col., 2009; Masoud y col., 2005a; Núñez y col., 2015; Taczman-Brückner y col., 2005) o proteínas *killer* (Coelho y col., 2009; Hernández y col., 2008). Además, la pared celular de las levaduras tiene la capacidad de adsorber moléculas derivadas de las micotoxinas como las glicoproteínas (Caridi, 2007) o pueden actuar bloqueando la ruta biosintética de las micotoxinas (Gil-Serna y col., 2011a). Por otra parte, la eficacia como potenciales agentes de biocontrol está influenciada por los factores ambientales alcanzados durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos curado-madurados, especialmente la temperatura, la a_w y la concentración de sal (Abdel-Hadi y col., 2012; Magan y Aldred, 2007; Sanchis y Magan, 2004). De hecho, la tolerancia de las cepas de *D. hansenii* a las altas concentraciones de sal hace que sea muy valiosa su aplicación como microorganismo antagonista en este tipo de productos (Breuer y Harms, 2006, Gori y col., 2012, Masoud y Jakobsen, 2005b).

Otra opción para controlar a la población de mohos indeseables que se desarrolla en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados es utilizar cultivos protectores de cepas de mohos no toxigénicos capaces de inhibir el desarrollo de mohos toxigénicos. Hasta el momento se ha descrito la presencia de algunas cepas de mohos aisladas de productos cárnicos con capacidad de producir metabolitos secundarios que pueden inhibir o retrasar el desarrollo de algunos mohos toxigénicos, que podrían ofrecer una ventaja competitiva para el control de estos mohos indeseables (Acosta y col., 2009). Entre estas cepas, *P. chrysogenum* CECT 20922, previamente nombrada RP42C, aislada de jamón curado, ha mostrado una fuerte actividad antifúngica (Acosta y col., 2009) atribuida a la proteína antifúngica PgAFP (Rodríguez-Martín y col., 2010) frente a una amplia variedad de cepas de mohos productores de micotoxinas comúnmente encontrados en alimentos curado-madurados pertenecientes a las especies *Aspergillus* y *Penicillium* (Delgado y col., 2015). Además, esta especie, al igual que *D. hansenii*, ha sido catalogada como un microorganismo seguro por el Grupo de expertos sobre Seguridad Biológica de la EFSA. La eficacia de *P. chrysogenum* como agente de biocontrol ha sido comprobada frente a mohos productores de OTA y AFs, inhibiendo el crecimiento del moho y la producción de micotoxinas en sistemas modelo de jamón curado y en el propio producto en condiciones ambientales similares a las alcanzadas durante la maduración de este producto (Bernáldez y col., 2014; Rodríguez y col., 2015a). Del mismo modo, la proteína antifúngica PgAFP ha mostrado una actividad inhibidora eficaz frente a cepas de *A. flavus* productoras de AFs en salchichón (Delgado y col., 2015); sin embargo, no inhibió el crecimiento de la misma cepa de *A. flavus* en queso (Delgado y col., 2017). Esto se debe a que los derivados cárnicos presentan bajas concentraciones de cationes divalentes y alta concentración de cationes monovalentes (NaCl), en cambio, en los quesos madurados la presencia de cationes divalentes es más alta, lo que permite que el moho sobreviva al efecto de la proteína (Delgado y col., 2017). Entre los mecanismos de acción descritos, las proteínas AFPs pueden unirse a la pared celular, ser absorbidas por hongos sensibles, alterar la síntesis de quitina que conduce a la muerte celular, o aumentar los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), que permeabilizan la membrana celular y desencadenan la muerte celular programada y la apoptosis (Delgado y col., 2016). Del mismo modo que las levaduras, la eficacia de los mohos no toxigénicos, así como de las proteínas antifúngicas, va a depender de su capacidad de colonizar y adaptarse al producto cárnico y, además, podría estar influenciada por diversos factores como la presencia de la población microbiana autóctona, las condiciones ambientales del procesado (temperatura y HR) y las características del propio alimento (nutrientes, concentración de sal, a_w , etc.). En consecuencia, es necesario evaluar el efecto inhibitorio de los mohos no toxigénicos contra las cepas toxigénicas

en las condiciones ambientales y ecológicas reales que se producen a lo largo del proceso de maduración del jamón curado y de los embutidos curado-madurados.

I.5.3. TÉCNICAS DE MINERÍA DE DATOS

La utilización de herramientas que permitan predecir el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (Dagnas y Membré, 2013; Dantigny y col., 2005) son esenciales para mejorar la calidad microbiológica y la inocuidad de los alimentos. Hasta el momento, se han desarrollado varios modelos cinéticos aplicados o modelos probabilísticos para predecir el crecimiento y la producción de AFs por especies de *Aspergillus* spp. en distintas matrices alimentarias (Abdel-Hadi y col., 2012; García y col., 2011; Marín y col., 2009, 2012; Mousa y col., 2011, 2013; Yogendrarajah y col., 2016). Pero hasta el momento no se ha desarrollado ningún modelo predictivo que permita determinar la probabilidad de que una micotoxina sea producida o no en un sistema modelo cárnico simulando las condiciones ambientales que se pueden encontrar en las etapas de secado-maduración del jamón y de los embutidos curado-madurados.

Para el análisis de datos, se han aplicado herramientas estadísticas comunes, como los coeficientes de correlación de Pearson y el análisis de componentes principales (Lozano-Ojalvo y col., 2013); sin embargo, con el fin de extraer la máxima información de grandes conjuntos de datos han surgido nuevas técnicas en las últimas décadas, agrupadas en lo que se conoce como el descubrimiento de conocimiento en bases de datos (KDD) (Fayyad y col., 1996). El objetivo principal de la minería de datos consiste en extraer información oculta de un conjunto de datos. Esto puede lograrse mediante el análisis automático o semiautomático de grandes cantidades de datos, lo que permite la extracción de patrones interesantes y previamente desconocidos (Hastie y col., 2001). Estos patrones pueden ser grupos de registros de datos (análisis de clúster), registros inusuales (detección de anomalías) y dependencias entre los datos (reglas de asociación). Por lo tanto, los patrones se pueden ver como un resumen de los datos de entrada, y se puede utilizar para el análisis posterior.

Durante los últimos años, el interés en la minería de datos ha crecido rápidamente debido a la caída en el costo de los dispositivos de almacenamiento de gran tamaño y el aumento de la facilidad de recolección de datos a través de redes u otros medios. El desarrollo de algoritmos robustos y eficientes para procesar estos datos y el aumento de la potencia de cálculo permiten el uso de métodos computacionales intensivos para el análisis de datos (Mitchell, 1999).

La minería de datos se ha aplicado en micología alimentaria para evaluar la influencia de la temperatura y la a_w en el crecimiento de cepas productoras de AFs como *A. flavus*, *A. ochraeus* y *A. parasiticus* (García y col., 2011; Marín y col., 2009) y para modelar las producciones de AFs en pistachos (Marín y col., 2012). También se ha utilizado para evaluar el crecimiento y la producción de micotoxinas por otros mohos toxigénicos como la producción de deoxinivalenol por *Fusarium* (Schmidt-Heydt y col., 2011b) o la producción de OTA por *A. carbonarius* (Ioannidis y col., 2015) y *P. nordicum* (Simoncini y col., 2014).

La necesidad de garantizar la calidad microbiológica y la seguridad de los productos alimenticios ha despertado un gran interés en el uso de técnicas predictivas para cuantificar y predecir el comportamiento microbiano. Las técnicas predictivas de minería de datos permiten crear una serie de modelos que pueden ser utilizados para predecir el futuro basándose en los datos actuales y en análisis de tendencias (Witten y Frank, 2005; Wu y col., 2008). Por ello, la utilización de estas técnicas con el fin de estudiar el comportamiento de los microorganismos serían muy útil desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, ya que se podrían predecir el momento exacto en el que comienza a crecer un moho toxigénico o producir una micotoxina, contribuyendo a la selección óptima de estrategias para controlar el desarrollo y la contaminación con micotoxinas en productos alimenticios.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVOS

Este trabajo está integrado dentro de un estudio más amplio sobre el control de mohos toxigénicos en alimentos madurados mediante factores ambientales, microbianos e ingredientes que regulen la producción de micotoxinas que se está realizando en el Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria perteneciente a la Facultad de Veterinaria y al Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar) de la Universidad de Extremadura y que ha estado financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto AGL2013-45729-P.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Evaluar la capacidad de difusión de micotoxinas y otros metabolitos secundarios producidos por cepas de *Penicillium* spp. en los derivados cárnicos curado-madurados.
2. Optimizar métodos de extracción y de análisis para la detección y cuantificación de ácido ciclopiazónico en derivados cárnicos curado-madurados.
3. Evaluar la influencia de los factores ambientales (temperatura y a_w) en el crecimiento de mohos toxigénicos, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas y su producción en modelos elaborados a partir de derivados cárnicos curado-madurados.
4. Desarrollar modelos para predecir la concentración de aflatoxinas y el inicio de su producción en condiciones similares a las alcanzadas durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos curado-madurados.
5. Determinar el efecto de microorganismos con actividad antifúngica en el crecimiento de mohos toxigénicos, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas y su producción en sistemas modelos y en derivados cárnicos curado-madurados.

II.2. OBJECTIVES

This research work takes part into a broad study about control of growth of toxigenic moulds in dry-cured meat products by environmental factors, microbial and ingredients that are involved in mycotoxin production that is being carried out in the Hygiene and Food Safety Research Group belonging to the Faculty of Veterinary Sciences and Meat and Meat Products Research Institute (IProCar) of the University of Extremadura. This study has been funded by the project AGL2013-45729-P from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

The objectives of this Doctoral Thesis are:

1. To evaluate the diffusion capacity of mycotoxins and other secondary metabolites produced by strains of *Penicillium* spp. in dry-cured meat products.
2. To optimize extraction and analytical methods to detect and quantify cyclopiazonic acid in dry-cured meat products.
3. To evaluate the influence of environmental factors (temperature and a_w) on the growth of toxigenic moulds, the expression of genes involved in the biosynthesis of mycotoxins and their phenotypic mycotoxin production in dry-cured meat based media.
4. To develop models to predict concentration of aflatoxins and the time when aflatoxins begin to occur by several aflatoxigenic strains in conditions related to the ripening process of the dry-cured meat products.
5. To determine the effect of microorganisms with antifungal activity on the growth of toxigenic moulds, the expression of the genes associated with mycotoxin biosynthesis and their phenotypic mycotoxin production in model systems and dry-cured meat products.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Para la realización de la parte experimental de este trabajo se han empleado productos químicos de calidad reactivo, suministrados por firmas comerciales como SHARLAU S.A., PANREAC QUÍMICA S.L.U y SIGMA-ALDRICH CO.

Para la extracción de micotoxinas, los disolventes empleados pertenecieron a SCHARLAU S.A, PANREAC QUÍMICA S.L.U y FISHER SCIENTIFIC S.L., y las distintas micotoxinas (AFB₁ y AFG₁, OTA y ACP) fueron de la marca SIGMA ALDRICH Co.

Durante la estancia en el Departamento de Agrobiotecnología (IFA Tulln) de la Universidad de BOKU (University of Natural Resources and Life Sciences, Viena), se utilizaron patrones de más de 100 metabolitos secundarios entre los que se incluían ACP, OTA, AFB₁, deoxinivalenol, griseofulvina, penicilina, roquefortina C y pertenecen a las casas comerciales ROMER LABS® INC., SIGMA-ALDRICH, IRIS BIOTECH GMBH, AXORA EUROPE y LGC PROMOCHEM GMBH.

Los reactivos para el desarrollo de las reacciones de RT-qPCR, SYBR GREEN® y el kit Prime Script™ RT Reagent (Perfect Real Time) fueron provistos por TAKARA BIO INC. El kit RNeasy® Plant Mini empleado para la extracción de ARN fue de QIAGEN N.V., y la enzima ADNasa (DNase I RNase-free) fue proporcionada por FERMENTAS. Los cebadores utilizados en las reacciones de RT-qPCR fueron suministrados por la empresa BIOMOL S.L.

III.1.2. TAMPONES

Para la extracción de los metabolitos secundarios utilizados en la Universidad de BOKU se utilizaron los siguientes tampones:

- Acetonitrilo/Agua/Ácido acético (79/20/1, v/v/v). Se mezclaron 790 mL de acetonitrilo calidad HPLC, 200 mL de agua destilada y se acidificó con 10 mL de ácido acético.
- Acetonitrilo/Agua/Ácido acético (20/79/1, v/v/v). Se mezclaron 200 mL de acetonitrilo calidad HPLC, 790 mL de agua destilada y se acidificó con 10 mL de ácido acético.

La extracción de OTA y ACP de los medios de cultivo y de las matrices cárnicas utilizando la metodología QuEChERS se emplearon las siguientes diluciones:

- Agua/Ácido acético 0,1%. Se añadió 1 mL de ácido acético glacial a 1 L de agua destilada.
- Acetonitrilo/ácido acético 0,1%. Se añadió 1 mL de ácido acético glacial a 1 L de acetonitrilo.

En la extracción de AFs de la matriz cárnica se necesitó la siguiente disolución:

- Acetonitrilo/Agua (9/1, v/v) + 0,1% de ácido fórmico. Se mezclaron 900 mL de acetonitrilo y 100 mL de agua destilada, además se añadió 1 mL de ácido fórmico.

En la detección de los metabolitos secundarios utilizados en la Universidad de BOKU se utilizaron las siguientes fases móviles:

- Fase acuosa: Metanol/Agua/Ácido acético (10/89/1, v/v/v) + 5 mM de acetato de amonio. Se mezclaron 100 mL de metanol, 890 mL de agua y 10 mL de ácido acético, posteriormente se añadió 0,48 g de acetato de amonio.
- Fase orgánica: Metanol/Agua/Ácido acético (97/2/1, v/v/v) + 5 mM de acetato de amonio. Se mezclaron 970 mL de metanol, 20 mL de agua y 10 mL de ácido acético, posteriormente se añadió 0,48 g de acetato de amonio.

La fase móvil utilizada para la detección de OTA mediante HPLC-FLD fue la siguiente:

- Fase acuosa: Metanol/Agua/Ácido acético (41/57/2, v/v/v) Se mezclaron 410 mL de metanol, 570 mL de agua y 20 mL de ácido acético.

Para la detección de ACP mediante uHPLC-MS/MS se emplearon dos fases móviles:

- Fase acuosa: 10 mM de acetato de amonio + ácido acético. Se pesaron 0,3854 g de acetato de amino y se mezclaron con 500 mL de agua desionizada; posteriormente se añadió la cantidad necesaria de una solución de ácido acético/agua (1/9, v/v) hasta conseguir un pH final de 5,75 en la fase móvil.
- Fase orgánica: Metanol calidad HPLC.

Se utilizaron como fases móviles para la detección de las AFs mediante uHPLC-MS/MS:

- Fase acuosa: 10 mM de formiato de amonio + ácido acético 0,1%. Se pesaron 0,3153 g de acetato de amino y se mezclaron con 500 mL de agua desionizada; posteriormente se añadió 1 mL de ácido acético.
- Fase orgánica: Acetonitrilo calidad HPLC.

Para recoger las esporas de los mohos y las células y de las levaduras se utilizó una solución de tampón fosfato salino (PBS) que se preparó con 0,32 g de NaH_2PO_4 , 1,09 g de Na_2HPO_4 y 9 g de NaCl para un litro de preparación.

En la extracción de ADN se utilizaron dos tampones:

- CTAB que contenía 5 g de D-sorbitol, 2 g de N-lauroilsarcosina, 1,6 g/L de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20mM de Na_2EDTA , 2 g de PVPP y 0,1 M de Tris-HCl pH 8.
- Tris-EDTA, el cual contiene dos disoluciones madre: 1 M de Tris-Cl (6,057 g de Tris se mezclaron con 0,5 mL de agua desionizada y se ajustó con HCl a pH 7,5) y 0,5M de EDTA (18,6 g de EDTA en 100 mL de agua desionizada y se ajustó a pH 8,0 con NaOH). Posteriormente, se mezclaron 10 mL de 1M Tris-Cl y 2 ml de 0,5 M EDTA.

III.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se prepararon siguiendo las recomendaciones de los fabricantes pertenecientes a las diferentes casas comerciales: SCHARLAB S.L., PANREAC QUIMICA S.L.U., LABKEM, LABORATORIOS CONDA S.A. y ACROS ORGANICS. A continuación, se detallan los distintos medios de cultivo utilizados en este trabajo y la composición de los mismos.

III.1.3.1. Medios de cultivo de uso general

Para el desarrollo de los mohos se utilizaron dos medios de cultivo, Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Patata Dextrosa (APD), y para el desarrollo de las levaduras se utilizó el caldo Extracto de Levadura (YES), cuyas formulaciones se describen en las Tablas III.1, III.2, III.3 respectivamente:

Tabla III.1. Composición de Agar Extracto de Malta.

Componentes	Cantidad
Extracto de Malta	20 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agar Bacteriológico	20 g
Agua	1000 mL

Tabla III.2. Composición de Agar Patata Dextrosa.

Componentes	Cantidad
Patata Dextrosa	24 g
Agar Bacteriológico	20 g
Agua	1000 mL

Tabla III.3. Composición de Caldo Extracto de Levadura.

Componentes	Cantidad
Extracto de Levadura	24 g
Sacarosa	125 g
Agua	1000 mL

Estos medios de cultivo se esterilizaron a 121°C (103 kPa) durante 16 minutos. Los medios se enfriaron hasta alcanzar una temperatura de 45 - 50°C para ser finalmente repartidos en placas Petri de 9 cm de diámetro y los caldos en tubos de polipropileno de 50 mL. Las placas de Petri y los tubos se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

III.1.3.2. Medios de cultivo elaborados a partir de carne y derivados cárnicos

Los medios de cultivo elaborados a partir de carne de cerdo y derivados cárnicos curado-madurados fueron preparados según el procedimiento descrito por Leggieri y col. (2011).

Los ingredientes utilizados para la elaboración de los medios de cultivo con carne (MBA), carne adicionada con sal (MSA), jamón curado (DHA) y salchichón (SBA) están descritos en las Tablas III.4, III.5, III.6 y III.7 respectivamente.

Tabla III.4. Composición de medios de cultivo elaborados con carne (MBA) a diferentes actividades de agua (a_w).

Componentes	a_w		
	0,95	0,90	0,85
Carne liofilizada	30 g	30 g	30 g
Agar Bacteriológico	20 g	20 g	20 g
Glicerol	150 mL	250 mL	350 mL
Agua	850 mL	750 mL	650 mL

Tabla III.5. Composición de medios de cultivo elaborados con carne y NaCl (MSA) a diferentes actividades de agua (a_w).

Componentes	a_w		
	0,99	0,90	0,85
Carne liofilizada	30 g	30 g	30 g
Agar Bacteriológico	20 g	20 g	20 g
NaCl	0 g	5 g	5 g
Glicerol	0 mL	0 mL	150 mL
Agua	1000 mL	1000 mL	850 mL

Tabla III.6. Composición de medios de cultivo elaborados con jamón curado (DHA) a diferentes actividades de agua (a_w).

Componentes	a_w		
	0,95	0,90	0,85
Jamón curado liofilizado	30 g	30 g	30 g
Agar Bacteriológico	20 g	20 g	20 g
Glicerol	150 mL	250 mL	350 mL
Agua destilada	850 mL	750 mL	650 mL

Tabla III.7. Composición de medios de cultivo elaborados con salchichón (SBA) a diferentes actividades de agua (a_w).

Componentes	a_w		
	0,97	0,94	0,90
Salchichón liofilizado	30 g	30 g	30 g
Agar Bacteriológico	20 g	20 g	20 g
NaCl	0 g	100 g	220 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C (103 kPa) durante 16 minutos antes de su uso. Una vez esterilizados, se enfriaron hasta alcanzar una temperatura de 45–50°C para ser finalmente repartidos en placas Petri de 9 cm de diámetro. Las placas de Petri con los medios de cultivo se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

III.1.4. EQUIPOS

El agua destilada y el agua ultrapura utilizadas para elaborar los medios de cultivo y los reactivos utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante el sistema de purificación de agua de Milli-Q® Integral 5 water system.

Las pesadas rutinarias para la elaboración de los medios de cultivo se realizaron en una balanza electrónica COBOS modelo CB COMPLET con precisión de 10 mg. Para las pesadas de las muestras se utilizó una balanza analítica de SARTORIUS modelo LA310S con una precisión de 0,1 mg.

Los medios de cultivo fueron preparados en agitadores magnéticos con calefacción P SELECTA® modelo AGIMATIC-N.

Para la esterilización de los medios de cultivo, así como del material de laboratorio empleado, se utilizaron los autoclave P SELECTA® modelo Presoclave III 80 y Varioklav modelo Classic 400E.

Las pipetas automáticas de 0,5 – 10 µL, 2 - 20 µL, 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL y 1000 – 5000 µL utilizadas pertenecían a THERMO, EPPENDORF, BIOHIT y KARTELL®.

La liofilización de la carne, jamón curado y salchichón, utilizados en la preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo en un liofilizador VIRTIS Advantage. El picado posterior de la carne y derivados cárnicos curado-madurados liofilizados se realizó en una picadora JATA electro de 700W.

Las siembras y las inoculaciones de los mohos y las levaduras fueron realizadas en campanas de flujo laminar TELSTAR modelo BIO-II-A, Laminar Air® modelo MB2472 y TELSTAR modelo BV-100.

Las incubaciones de los microorganismos se hicieron en estufas VELP Scientifica FOC 225E Refrigerate incubator, P SELECTA® modelo HOTCOLD GL y SARTORIUS modelo CERTOMAT® IS.

Las incubaciones se realizaron en baños de agua P SELECTA® modelo PRECISDIG y un bloque térmico FISHER SCIENTIFIC modelo DRY BATH FB15101.

Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio de contraste de fases NIKON 125-2. El recuento de esporas de mohos se llevó a cabo en una cámara de recuento de Thoma BRAND.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrifugas EPPENDORF modelo CENTRIFUGE 5430, EPPENDORF modelo CENTRIFUGE 5430R y ORTO ALRESA DIGICEN 21R.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro CRISON modelo BASIC 20.

Para medir la a_w se utilizó el medidor LabMASTER- a_w de NOVASINA AG.

La extracción de micotoxinas se realizó en una campana TELSTAR modelo AV 30/70.

Para la homogeneización de las muestras en tubos se utilizaron agitadores VELP SCIENTIFICA modelo VORTEX MIXER y HEIDOLPH modelo UNIMAX 2010.

La filtración de los extractos clorofórmicos se llevó a cabo en una campana de extracción de gases CRUMA modelo 1200 utilizando jeringas de la marca TERUMO y filtros de tamaño de poro 0,22 y 0,45 μm de la marca BIOFILM JET®.

Los viales, insertos y tapones utilizados para las micotoxinas fueron provistos por COSELA S.L.

Las concentraciones de ADN y ARN fueron medidas con un biofotómetro NanoDrop 2000c de THERMO SCIENTIFIC.

El ARN fue transcrito a ADN complementario (ADNc) en un termociclador Mastercycler epgradient EPPENDORF AG.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un equipo ViiA™ 7 Real-Time PCR System de APPLIED BIOSYSTEMS.

El análisis de AFB₁ y AFG₁ y ACP se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución y detección con espectrometría de masas utilizando un equipo uHPLC dionex ultimate 3000 pnmp de THERMO SCIENTIFIC, acoplado al espectrómetro de masas de trampa iónica Amazon provisto por la marca Bruker Daltonics.

El análisis de OTA se realizó por cromatografía líquida de alta resolución AGILENT 1260 INFINITY equipado con un autoinyector y un detector de fluorescencia AGILENT 1260 FLD SPECTRA.

El análisis y detección de metabolitos fúngicos producidos por *P. nordicum*, *P. verrucosum* y *P. griseofulvum* durante la estancia en la Universidad de BOKU (Viena) se realizó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas utilizando un equipo AGILENT 1290 SERIES

HPLC SYSTEM acoplado a un detector QTRAP 5500 LCMS/MS equipado con un TURBO ION SPRAY de ionización (ESI).

III.1.5. SOFTWARES

Para determinar la concentración de micotoxinas que había en las muestras analizadas se empleó el programa Quant/Data analysis de BRUKER y para el análisis de los metabolitos secundarios se utilizó el programa MultiQuant™ 2.0.2.

El análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de qPCR se realizó mediante la utilización del programa ViiA™ 7 RUO v1.2.4.

El software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) (<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>) se utilizó para llevar a cabo el análisis de minería de datos.

Para la elaboración de los mapas de contorno se utilizó SigmaPlot v.11.0.

Para la elaboración de las diferentes gráficas se utilizó el programa Microsoft Excel 2016.

El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS v.22.

III.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO

Los microorganismos utilizados en esta Tesis Doctoral procedían de diferentes colecciones de cultivos tipo: IBT (Colección de Cultivos Tipo del Departamento de Biotecnología de la Universidad Técnica de Dinamarca), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) y FSHCC (Colección de Cultivos del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria, Universidad de Extremadura) (Tabla III.8).

Tabla III.8. Microorganismos, referencia de la colección y toxinas producidas.

Microorganismo	Referencia de la colección	Toxina
<i>A. flavus</i>	IBT 3696	AFB ₁
<i>A. flavus</i>	CBS 573.65	AFB ₁
<i>A. parasiticus</i>	CECT 2681	AFB ₁ y AFG ₁
<i>A. parasiticus</i>	CECT 2682	AFB ₁ y AFG ₁
<i>A. parasiticus</i>	CECT 2688	AFB ₁ y AFG ₁
<i>P. griseofulvum</i>	IBT 14319	ACP
<i>P. griseofulvum</i>	CECT 2919	ACP
<i>P. nordicum</i>	CBS 110.769	OTA
<i>P. verrucosum</i>	CECT 2906	OTA
<i>P. verrucosum</i>	FHSCC 21	OTA
<i>P. chrysogenum</i>	CECT 20922	Atoxigénica
<i>D. hansenii</i>	FHSCC 253H	Atoxigénica

III.2. MÉTODOS

III.2.1. ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ELABORADOS CON CARNE DE CERDO, JAMÓN CURADO Y SALCHICHÓN

Los medios de cultivo MBA, MSA, DHA y SBA (sección III.1.3.2) fueron elaborados utilizando carne fresca de lomo de cerdo, jamón curado y salchichón, respectivamente. Para llevar a cabo su liofilización, estos productos fueron loncheados en láminas con un grosor de 0,5 mm y se colocaron en bandejas de poliespan que se cubrieron con papel film transparente y se mantuvieron a -80°C durante 5 horas antes de introducirlas en el liofilizador. El proceso de liofilización provocó una pérdida de agua del 70 – 75% del peso de las muestras. Una vez liofilizadas, se trituraron, se envasaron al vacío y se conservaron a -20°C hasta su uso. En la Figura III.1. se muestra el aspecto del lomo de cerdo tras ser liofilizado y triturado.



Figura III.1. Lomo de cerdo después de ser liofilizado.

Finalmente, los medios de cultivo MBA, MSA, DHA y SBA se prepararon tal y como se indica en la sección III.1.3.2. La composición de la carne o los derivados cárnicos liofilizados para la elaboración de los diferentes medios se muestran en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Composición de los liofilizados de lomo de cerdo, el jamón curado y el salchichón utilizados para la elaboración de los diferentes medios de cultivo elaborados a base de estos productos.

Componentes	Lomo liofilizado	Jamón curado liofilizado	Salchichón liofilizado
Grasa (%)	7,1	8,8	35,16
NaCl (%)	0,35	7,17	3,79
Proteína (%)	74,25	63,05	28,44
Nitrógeno no proteico (%)	3,19	4,42	4,55

III.2.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas de mohos productoras de AFs y ACP, así como la cepa no toxigénica fueron inoculadas en AEM mientras que en el caso de las cepas productoras de OTA se utilizó el medio de cultivo APD. Todas ellas, se incubaron a 25 °C durante 7 días. Las esporas se recogieron utilizando 5 mL de agua estéril con una solución de glicerol 20% (v/v) y se transfirió el contenido a un tubo eppendorf estéril. Por otro lado, la levadura utilizada se inoculó en caldo YES y se incubó en agitación (150 rpm) a 25 °C durante 72 horas, posteriormente y, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y el precipitado que contiene las células, se resuspendió en 5 mL de agua estéril con una solución de glicerol al 20% (v/v). Todas las cepas se conservaron a – 80°C.

A partir de las soluciones madre, se prepararon los inóculos utilizados en cada uno de los experimentos de esta Tesis Doctoral. Los mohos se inocularon en AEM y en APD según la cepa utilizada y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Las esporas se recogieron utilizando 5 mL de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) frotando la superficie con un asa de vidrio. Por otro lado, la levadura se inoculó en caldo YES a 25 °C durante 72 horas en agitación (150 rpm). Una vez centrifugado el caldo (3500 rpm, 5 min), se eliminó el sobrenadante y el precipitado se mezcló con 2 mL de PBS. Tanto la suspensión de esporas como la de células de levaduras fueron cuantificadas empleando una cámara de THOMA y se ajustaron a las concentraciones deseadas dependiendo del tipo de ensayo utilizándose como inóculos.

III.2.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES Y DE MUESTREO

En el presente trabajo se ha llevado a cabo dos estrategias de control para controlar el desarrollo de mohos productores de AFs, OTA y ACP. A continuación, se muestra el diseño experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral (Figura III.2).

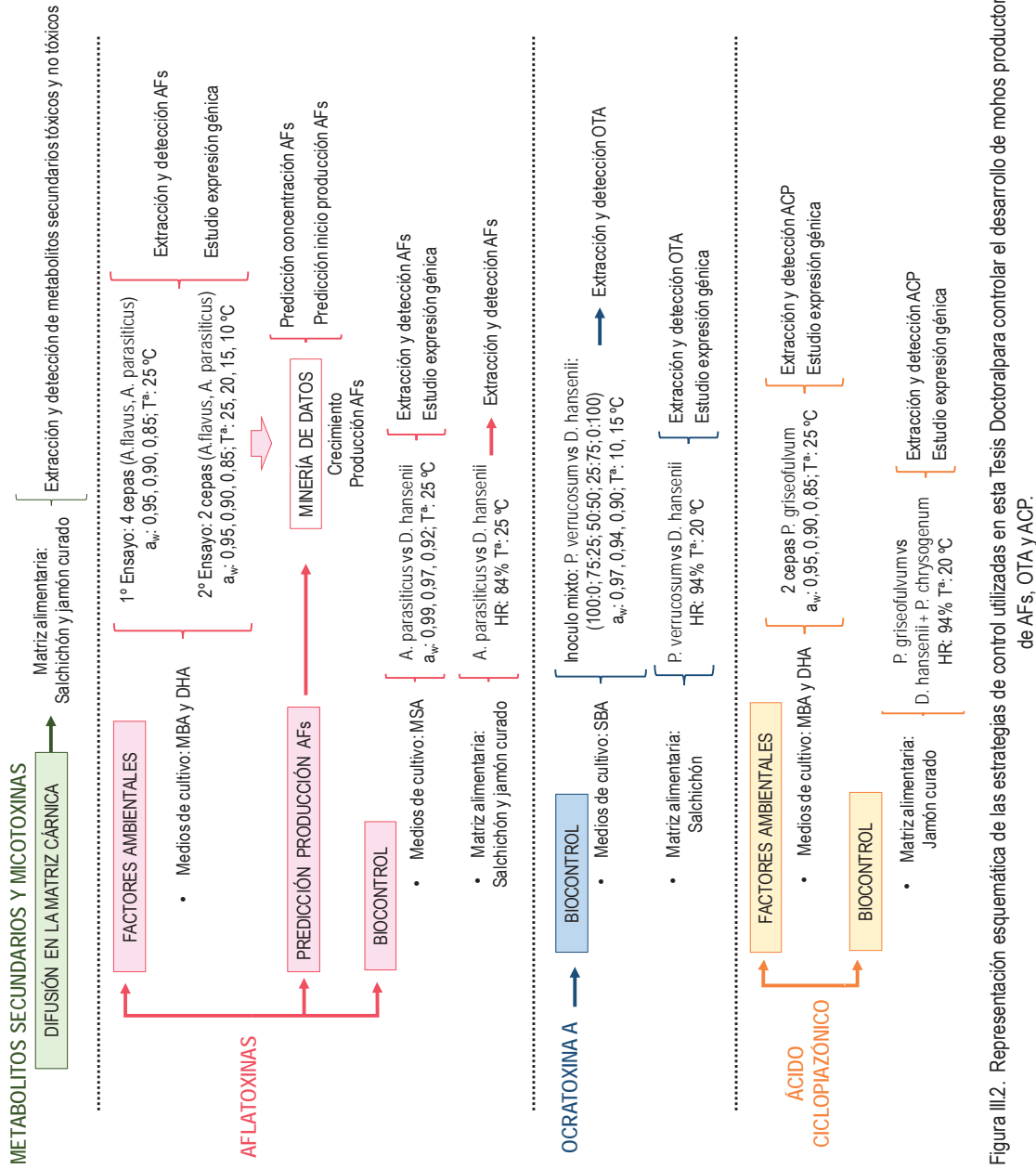


Figura III.2. Representación esquemática de las estrategias de control utilizadas en esta Tesis Doctoral para controlar el desarrollo de mohos productores de AFs, OTA y ACP.

III.2.3.1. Difusión de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados

III.2.3.1.1. Inoculación de los mohos toxigénicos en la superficie de los derivados cárnicos

En este estudio se utilizaron cuatro cepas de mohos toxigénicas, dos de ellas productoras de OTA (*P. nordicum* CBS 110.769 y *P. verrucosum* CECT 2906) y otras dos productoras de ACP (*P. griseofulvum* CECT 2919 y *P. griseofulvum* IBT 14319). Los inóculos se prepararon como se indica en la sección III.2.2. ajustándolos a una concentración de 10^6 esporas/mL.

Se utilizaron piezas de jamón curado y salchichón de un tamaño aproximado de $4 \times 4 \times 3$ cm. Para minimizar la contaminación microbiana de las piezas, éstas se sumergieron en etanol durante 1 minuto y se esterilizaron con luz UV durante 3 horas (Figura III.3), y a continuación se colocaron por separado en recipientes de plástico esterilizados con etanol y luz ultravioleta previamente. Para simular la evolución de a_w durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos curados-madurados, se mantuvo una humedad relativa del 94% en el interior del recipiente utilizando una solución sobresaturada de K_2SO_4 .



Figura III.3. Esterilización de piezas de salchichón y jamón curado con luz UV.

Finalmente, en cada pieza se inocularon 100 μ L de la suspensión de esporas de cada uno de los mohos evaluados y se extendió con ayuda de un asa de siembra. Las muestras se incubaron a 20 °C durante 15 días. El experimento se realizó por duplicado.

III.2.3.1.2. Toma de muestras

Después del periodo de incubación, las piezas se cortaron en tres secciones (A, B, y C), paralelas entre sí, de 1 cm de grosor cada una, con el fin de estudiar la difusión de los metabolitos secundarios producidos por los mohos toxigénicos hacia el interior del jamón curado o del salchichón (Figura III.4). Se pesaron $5 \pm 0,1$ g de cada una de las secciones y se almacenaron a -20°C hasta su análisis químico.

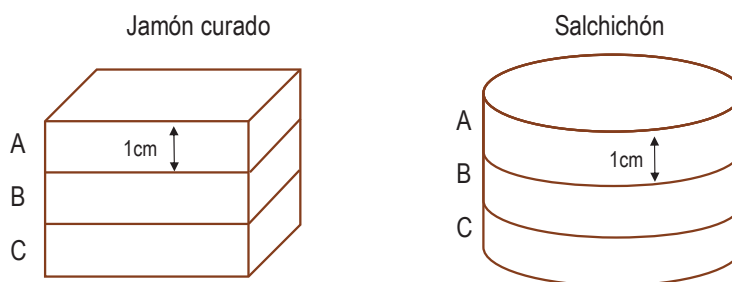


Figura III.4. Representación esquemática de los 3 cortes (A, B y C) realizados en el jamón curado (imagen de la izquierda) y en el salchichón (imagen de la derecha).

Para la extracción de las micotoxinas y los otros metabolitos secundarios y su posterior detección mediante HPLC-MS/MS se utilizó el método desarrollado por el grupo de investigación del Departamento de Agrobiotecnología (IFA Tulln) de la Universidad de BOKU de Viena descritos en las secciones III.2.4.1.1 y III.2.4.2.1.

III.2.3.2. Influencia de las condiciones ambientales en el control de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados

Inicialmente se evaluó el efecto de las condiciones ambientales (temperatura y a_w) en mohos productores de AFs y de ACP. Ambos estudios se han llevado a cabo en los medios MBA y DHA, evaluándose el crecimiento de los mohos, la expresión de genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas y la producción de dichas micotoxinas en diferentes condiciones de temperaturas y a_w relacionadas con el proceso de elaboración o con las etapas de secado-maduración de los derivados cárnicos curado-madurados.

III.2.3.2.1. Inoculación de los mohos toxigénicos

En este estudio se utilizaron las cepas *A. flavus* IBT 3696, *A. flavus* CBS 573.65, *A. parasiticus* CECT 2681 y *A. parasiticus* CECT 2688, *P. griseofulvum* IBT 14319 y *P. griseofulvum* CECT 2919. Los inóculos se ajustaron a 10^6 esporas/mL tal y como se describe en la sección III.2.2, se depositaron 2 μ L del inóculo en el centro de las placas y se incubaron durante 12 días a diferentes combinaciones de temperaturas (25, 20, 15 y 10 °C) y a_w (0,95, 0,90 y 0,85) según los experimentos. En la Tabla III.10 se muestran los diferentes ensayos realizados con las cepas productoras de AFs y ACP.

Tabla III.10. Experimentos realizados con *A. flavus*, *A. parasiticus* y *P. griseofulvum* a diferentes temperaturas y a_w en medios elaborados con carne (MBA) y jamón curado (DHA).

Micotoxina	Experimento	Número de cepas	Temperatura incubación	a_w
AFs	1 ^{er} ensayo	4 cepas ^a	25 °C	0,95, 0,90, 0,85
	2 ^o ensayo	2 cepas ^b	25, 20, 15, 10 °C	0,95, 0,90, 0,85
ACP	Único ensayo	2 cepas ^c	25 °C	0,95, 0,90, 0,85

^a *A. flavus* IBT 3696, *A. flavus* CBS 573.65, *A. parasiticus* CECT 2681 y *A. parasiticus* CECT 2688.

^b *A. flavus* CBS 573.65 y *A. parasiticus* CECT 2688.

^c *P. griseofulvum* IBT 14319 y *P. griseofulvum* CECT 2919.

III. 2.3.2.2. Evaluación del crecimiento

Para evaluar el crecimiento de los mohos toxigénicos se midió el diámetro de las colonias diariamente en dos direcciones en ángulo recto entre sí. Estos datos se utilizaron para la determinación de la fase de latencia (λ) y la velocidad de crecimiento (μ) de las cepas de moho mediante la aplicación del modelo lineal en el que se relaciona la medida del diámetro de la colonia frente al tiempo de incubación (Figura III.5). La velocidad de crecimiento (mm/día) se calculó a partir de la pendiente de la línea de regresión y la fase de latencia se calculó igualando la línea de regresión con el tamaño original del inóculo (mm).

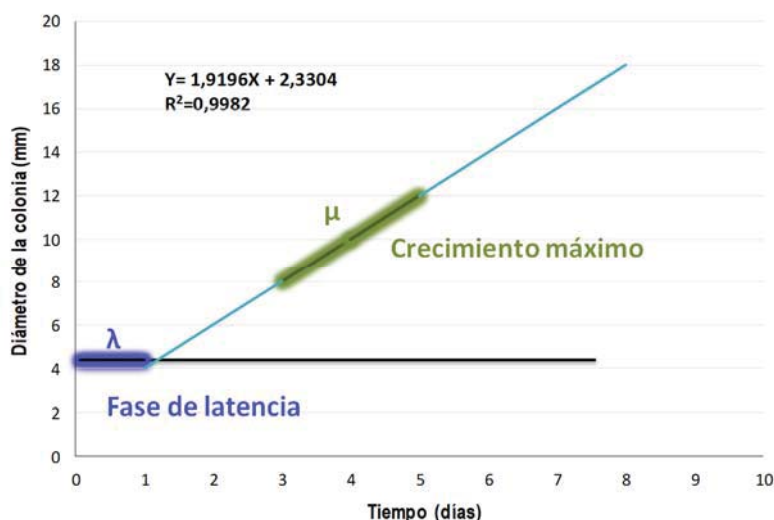


Figura III.5. Curva de crecimiento en condiciones óptimas para mohos siguiendo el modelo lineal con fase de latencia (adaptado de García y col., 2009). μ es el crecimiento máximo del moho (pendiente de la recta) y λ es la fase de latencia.

III.2.3.2.3. Toma de muestras

Durante el periodo de incubación y una vez que comenzaron a crecer las distintas cepas de moho, se tomaron muestras para los estudios de expresión génica y de producción de

micotoxinas. Para ello, se tomaron entre cinco y seis discos de agar con un diámetro de 4 mm y un peso aproximado de 0,5 g de cada una de las colonias de moho por triplicado. En los ensayos para el análisis de las micotoxinas, se tomaron muestras cada dos días mientras que para la extracción de ARN fueron cada tres días. Estas muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de micotoxinas y ARN, respectivamente.

La extracción de AFs, así como su análisis en uHPLC-MS/MS están descritos en las secciones III.2.4.1.2 y III.2.4.2.3.1 respectivamente. Con respecto al ACP, se ha desarrollado un método de extracción y de detección en uHPLC-MS/MS que está detallado en las secciones III.2.4.1.3. y III.2.4.2.3.2 respectivamente. La extracción de ARN se describe en la sección III.2.5.2. y los métodos de RT-qPCR empleados para el estudio de la expresión génica de los mohos productores de AFs y ACP se describen en la sección III.2.5.4.2.1.

III.2.3.3. Estrategias de biocontrol de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados

Se utilizaron para estos ensayos la cepa de *D. hansenii* FHSCC 253H, seleccionada por su actividad antagonista frente a mohos toxigénicos, y la cepa *P. chrysogenum* CECT 20922 productora de la proteína antifúngica PgAFP. Los estudios se llevaron a cabo en los medios MBA, DHA y SBA, así como en los propios derivados cárnicos curado-madurados (salchichón y jamón curado). En estos ensayos se evaluó la capacidad de dichos microorganismos para reducir la producción de micotoxinas y su efecto sobre los genes implicados en la biosíntesis de las mismas, en condiciones ambientales que simulaban el proceso de maduración y/o elaboración de los derivados cárnicos curado-madurados.

III.2.3.3.1. Efecto de D. hansenii sobre mohos productores de aflatoxinas

La capacidad de *D. hansenii* FHSCC 253H para controlar el desarrollo de *A. parasiticus* CECT 2682 se evaluó en el medio MSA y en lonchas de salchichón y jamón curado.

III.2.3.3.1.1. Ensayos en medios de cultivo elaborados con carne y modificados con sal

La composición del medio de cultivo utilizado en este estudio está detallada en la Tabla III.6 y los inóculos se prepararon tal y como se describe en la sección III.2.2. En este caso, 1 mL de una suspensión de 10^6 células/mL de *D. hansenii* se mezcló con 20 mL de cada medio de

cultivo antes de ser depositados en la placa de Petri, de tal manera, que la levadura pudiese crecer en todo el medio. Una vez solidificado los medios, se inocularon 10 μ L de una suspensión de 10^6 esporas/mL de *A. parasiticus* en el centro de las placas y éstas se incubaron a 25 °C y a valores de a_w de 0,99, 0,97 y 0,92 durante 13 días. El experimento se realizó por triplicado.

Durante el periodo de incubación, se determinó la fase de latencia y la velocidad de crecimiento del moho en presencia y ausencia de la levadura, tal y como se indica en la sección III.2.3.2.2. También, se tomaron muestras para los estudios de la producción de micotoxinas y de la expresión génica llevados a cabo tal y como se describe en la sección III.2.3.2.3.

La extracción de AFs, así como su análisis en uHPLC-MS/MS están detallados en las secciones III.2.4.1.2 y III.2.4.2.3.1 respectivamente. La extracción de ARN se describe en la sección III.2.5.2. y los métodos de RT-qPCR empleados para el estudio de la expresión génica de los mohos productores de AFs están en la sección III.2.5.4.2.1.

III.2.3.3.1.2. Ensayos en jamón curado y salchichón

En este experimento se cortaron piezas de salchichón y de jamón curado con una superficie aproximada de 16 cm² (Figura III.6). Las lonchas y los recipientes donde se incubaron se esterilizaron tal y como se describe en la sección III.2.3.1.1. En este caso, la humedad en estos recipientes se mantuvo constante mediante una solución sobresaturada de KCl equivalente a una humedad relativa del 84%.

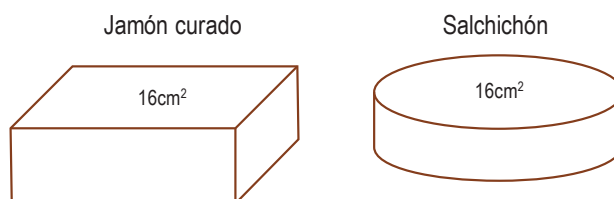


Figura III.6. Representación esquemática de la superficie muestreada de 16 cm² de área y 1 cm de grosor de lonchas de jamón curado (imagen izquierda) y salchichón (imagen derecha).

Se prepararon tres lotes: un control donde se inoculó solamente la cepa de *A. parasiticus*, para asegurarnos su crecimiento y producción de AFs, un lote inoculado con el moho toxigénico junto con el agente de biocontrol y un último lote donde se inoculó *D. hansenii*. Sobre la superficie de cada pieza cárnica se añadieron 100 μ L de una suspensión de 10^6 esporas/mL del moho

toxigénico y 100 μL de una suspensión de 10^6 células/mL del agente de biocontrol. Los inóculos fueron preparados tal y como se indica en la sección III.2.2. Una vez inoculadas las lonchas, los recipientes de plástico se cerraron herméticamente y las lonchas fueron incubadas a 25 °C durante 21 días. El experimento se realizó por triplicado.

Las muestras se tomaron al final del periodo de incubación para el estudio de la producción de micotoxinas congelándose a – 20 °C hasta su extracción.

La extracción de AFs, así como su análisis en uHPLC-MS/MS están descritos en las secciones III.2.4.1.4 y III.2.4.2.3.1.

III.2.3.3.2. Efecto de *D. hansenii* sobre mohos productores de ocratoxina A

Se realizó un primer estudio de evaluación de la capacidad de *D. hansenii* para controlar la producción de OTA por parte de la cepa de *P. verrucosum* FHSCC 21 en los medios SBA y en lonchas de salchichón.

III.2.3.3.2.1. Ensayos en medios de cultivo elaborados con salchichón

La preparación de los medios de cultivo utilizados en este estudio están detallados en la Tabla III.8. Los inóculos del moho y la levadura utilizados se ajustaron a 10^6 esporas/mL y 10^6 células/mL tal y como se detalla en la sección III.2.2. A partir de estos inóculos, se prepararon mezclas de 1 mL con diferentes combinaciones de *P. verrucosum* y *D. hansenii*: 100:0 (*P. verrucosum*); 75:25; 50:50; 25:75 y 0:100 (*D. hansenii*) (Figura III.7) de los cuales 200 μL se extendieron sobre la superficie de la placa y se incubaron a temperaturas propias de la maduración de este derivado cárnico-madurado (10 y 15 °C) y a_w 0,97, 0,94 y 0,90 durante 21 días. El experimento se realizó por triplicado.

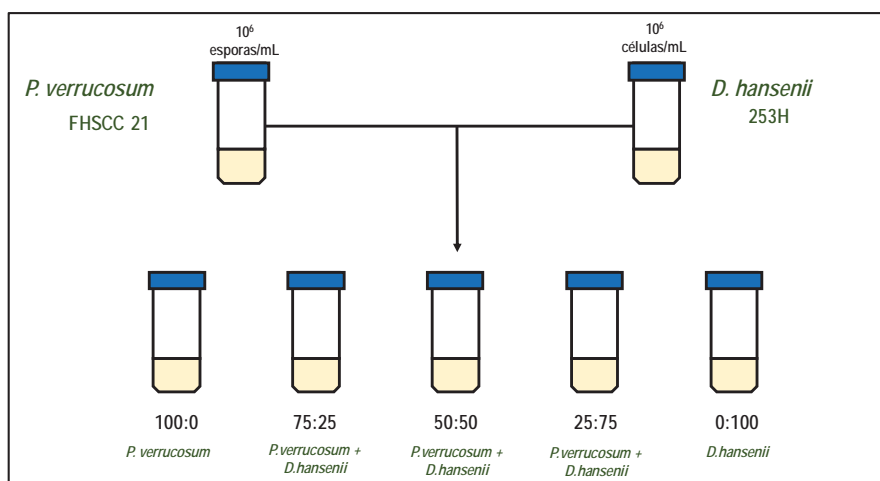


Figura III.7. Preparación de las diferentes mezclas de *P. verrucosum* y *D. hansenii* para su posterior inoculación en los medios de cultivo elaborados con salchichón liofilizado.

Durante el periodo de incubación, se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días para los estudios de la producción de OTA y de la expresión de los genes claves en la biosíntesis de esta micotoxina.

La toma de muestras se realizó como se describe en la sección III.2.3.2.3. Se tomaron discos de agar de todas las mezclas ensayadas (100:0, 75:25, 50:50 y 25:75) para la extracción de OTA.

La extracción de OTA en los medios de cultivo y su detección mediante HPLC-FLD están descritos en las secciones III.2.4.1.2. y III.2.4.2.2, respectivamente. La extracción de ARN se describe en la sección III.2.5.2. y el método de RT-qPCR empleado para el estudio de la expresión génica de los mohos productores de OTA se describe en la sección III.2.5.4.2.1.

III.2.3.3.2.2. Ensayos en salchichón

Se cortaron piezas de salchichón de 3 cm de grosor y éstas, a su vez, de forma transversal, con el fin de obtener un semicilindro con una superficie de piel de alrededor 16 cm² (Figura III.8). Las piezas de salchichón se esterilizaron del mismo modo que en la sección III.2.3.1.1., también se utilizaron los mismos recipientes y la misma solución saturada para mantener la humedad.

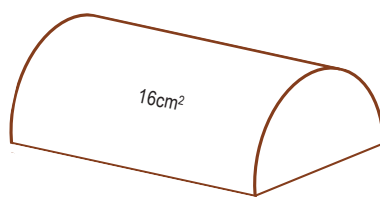


Figura III.8. Representación esquemática de la superficie muestreada de 16 cm² de área y 1 cm de profundidad.

A continuación, se prepararon suspensiones de los microorganismos con concentraciones de 10⁶ esporas/mL del moho toxigénico y 10⁶ células/mL de la levadura (combinación 50:50) tal y como se describe en la sección III.2.3.3.2.1 y, posteriormente, se inocularon 100 µL de la suspensión sobre la superficie de cada pieza de salchichón. Igualmente, se prepararon controles de *P. verrucosum* y *D. hansenii* (combinaciones 100:0 y 0:100) con el fin de asegurarnos el crecimiento de los microorganismos y la producción de micotoxinas del moho cuando fue inoculado individualmente. Una vez inoculadas las lonchas, los recipientes de plástico se cerraron herméticamente y las lonchas fueron incubadas a 20 °C durante 21 días. El experimento se realizó por triplicado.

Durante el periodo de incubación, se tomaron muestras a los 7, 14 y 21 días para el estudio de la expresión génica y a los 21 días para el estudio de la producción de micotoxinas. Con ayuda de un bisturí estéril, se raspó el micelio de la superficie del salchichón y tras congelarlo rápidamente en nitrógeno líquido, se almacenó a – 80 °C hasta la extracción de ARN. Para la extracción de micotoxinas, las piezas de salchichón se congelaron a – 20 °C hasta su extracción.

La extracción de OTA en la matriz cárnica y su detección mediante HPLC-MS/MS están descritos en las secciones III.2.4.1.3. y III.2.4.2.2 respectivamente. La extracción de ARN se describe en la sección III.2.5.2 y el método de RT-qPCR empleado para el estudio de la expresión génica de los mohos productores de OTA se describen en la sección III.2.5.4.2.1.

III.2.3.3.3. Efecto de D. hansenii y P. chrysogenum sobre mohos productores de ácido ciclopiazónico

En este estudio se evaluó la capacidad conjunta de *D. hansenii* FHSCC 253H y *P. chrysogenum* CECT 20922 para controlar el desarrollo de dos cepas de mohos productoras de ACP (*P. griseofulvum* CECT 2919 y *P. griseofulvum* IBT 14319) en lonchas de jamón curado. Los

inóculos preparados se ajustaron a 10^6 esporas de moho o células de levadura por mL como se detalla en la sección III.2.2.

En este experimento se cortaron piezas de jamón curado de 2 cm de grosor y una superficie aproximada de 16 cm². Estas piezas se sumergieron durante 1 minuto en etanol y se esterilizaron con luz ultravioleta durante 6 horas (3 horas por un lado y 3 horas por el otro lado). Transcurrido ese tiempo, las piezas de jamón curado se sumergieron en agua estéril para humedecerlas ligeramente y aumentar así la a_w de las mismas debido a que la esterilización mediante luz ultravioleta era muy efectiva, pero desecaba las muestras en exceso. Por último, las muestras se distribuyeron asépticamente en recipientes de plástico esterilizados con etanol y luz ultravioleta previamente. La humedad en estos recipientes se mantuvo constante mediante vasos de precipitado de 500 mL con una solución sobresaturada de K₂SO₄ equivalente a una a_w de 0,94 con el fin de promover el crecimiento del moho.

Sobre la superficie de cada muestra se inoculó 100 µL del inóculo de cada moho toxigénico y posteriormente, se añadió 100 µL de un inóculo mixto preparado con esporas de la cepa de *P. chrysogenum* y células de *D. hansenii*. Por otro lado, se prepararon controles negativos y positivos en los que sólo se inocularon los mohos toxigénicos con el fin de asegurarnos el crecimiento del moho y la producción de micotoxinas durante el tiempo de incubación. Una vez inoculadas las piezas, los recipientes de plásticos se cerraron herméticamente y las lonchas fueron incubadas a 20 °C durante 15 días. El experimento se realizó por triplicado.

Las muestras se tomaron al final del periodo de incubación tanto para el estudio de la producción de micotoxinas como para el estudio de la expresión génica. Con ayuda de un bisturí estéril, se raspó el micelio de la superficie del jamón curado y tras congelarlo rápidamente en nitrógeno líquido, se almacenó a – 80 °C hasta la extracción de ARN. Para la extracción de micotoxinas, las piezas de jamón curado se congelaron a – 20 °C hasta su análisis.

La extracción de ACP en la matriz cárnica y su detección mediante uHPLC-MS/MS están descritos en las secciones III.2.4.1.3. y III.2.4.2.3.2 respectivamente. La extracción de ARN se describe en la sección III.2.5.2. y los métodos de RT-qPCR empleados para el estudio de la expresión génica de los mohos productores de ACP se describen en la sección III.2.5.4.2.1.

III.2.4. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE MICOTOXINAS

Debido a la diferente naturaleza química de las micotoxinas, y de las distintas matrices en estudio se han desarrollado varios métodos de extracción de estos metabolitos secundarios, y se han utilizado diferentes métodos de detección y cuantificación de las mismas todos ellos basados en la cromatografía líquida de alta resolución junto con un detector de fluorescencia o masas. En la Figura III.9 se muestra un resumen de los métodos de extracción y detección utilizados para cada matriz y micotoxina utilizado en esta Tesis Doctoral.

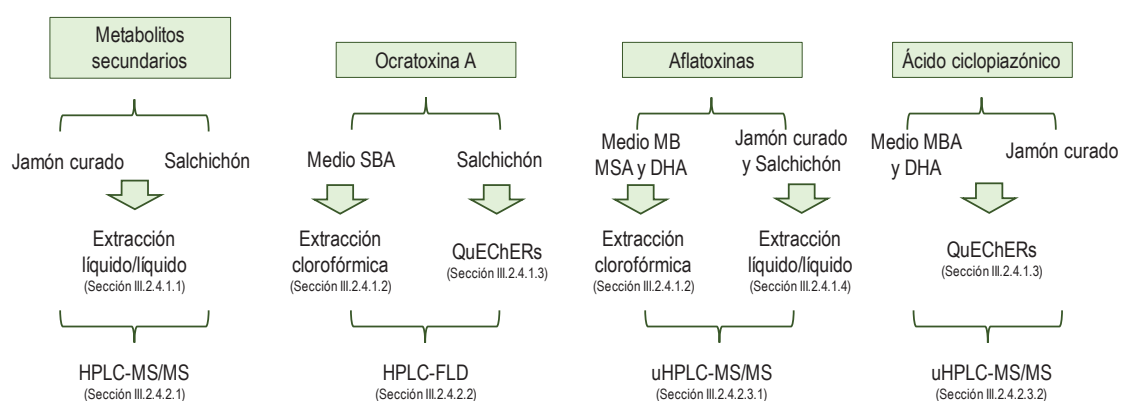


Figura III. 9. Representación esquemática de los métodos de extracción y de detección de metabolitos secundarios y micotoxinas y las secciones en las que se describe su metodología.

III.2.4.1. Extracción de micotoxinas

III.2.4.1.1. Estudio de difusión de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados

La extracción de metabolitos secundarios de lonchas de salchichón y jamón curado inoculadas con mohos productores de OTA y ACP se llevó a cabo a partir de las muestras del estudio de difusión de metabolitos secundarios hacia el interior de la matriz cárnica (Sección III.2.3.1). Esta extracción se realizó utilizando un método optimizado por Sulyok y col., (2006). Para ello, se tomaron $5 \pm 0,1$ g de la muestra, se mezclaron con un disolvente de extracción compuesto por acetonitrilo/agua/ácido acético (79:20:1, v:v:v) y se agitaron a 180 rpm a temperatura ambiente durante 90 min. Se transfirieron 500 μ L del extracto de la muestra a viales y se mezclaron con 500 μ L de un disolvente mixto compuesto por acetonitrilo/agua/ácido acético (20:79:1, v:v:v). Finalmente, los extractos se colocaron en viales opacos ámbar y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.

III.2.4.1.2. Extracción de ocratoxina A y aflatoxinas de los medios de cultivo elaborados con salchichón, carne o jamón curado mediante extracción clorofórmica

Este protocolo se utilizó para la extracción de AFB₁ y AFG₁ y OTA de las muestras recogidas en los experimentos detallados en las secciones 2.3.2.1 y 2.3.2.2.1.1. La extracción de estas micotoxinas se realizó utilizando un método optimizado por nuestro grupo de investigación (Bernáldez y col., 2017b) con algunas modificaciones. Los discos de agar se descongelaron, se colocaron en tubos de 10 mL y se añadieron 5 mL de cloroformo. Posteriormente, los tubos fueron tapados con papel de aluminio para evitar el contacto de la luz con las micotoxinas y se agitaron a 150 rpm a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue transferido a unos viales opacos y se dejaron secar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su total evaporación. Para su posterior análisis, los extractos secos se resuspendieron en 200 µL de acetonitrilo calidad HPLC y se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro, finalmente se colocaron en viales ámbar y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

III.2.4.1.3. Extracción de micotoxinas basado en el método QuEChERS

La naturaleza química y estructural de la molécula de ACP hizo necesaria la optimización de un método de extracción. Para ello, en primer lugar, se inocularon 5 - 7 discos de agar de 3 - 4 mm de diámetro de medio de cultivo AEM con un peso alrededor de 1 g con 100 µl de 1000 ng / g y 100 ng / g de ACP y se colocaron en tubos de vidrio de 10 mL. Las muestras se dejaron en reposo durante 2h antes de la extracción. Los métodos ensayados se detallan a continuación:

Método 1. Las muestras se trataron con 5 ml de cloroformo. Los tubos se taparon con papel de aluminio para evitar el contacto de la luz con la micotoxina y se agitaron a 150 rpm a temperatura ambiente durante toda la noche. El sobrenadante se transfirió a viales de 5 ml.

Método 2. Este método consiste en una modificación del protocolo descrito por Pizzutti y col. (2014). A los tapones de agar se le añadieron 5 mL de agua que contenía 0,1% de ácido acético y se agitaron durante 30 s, a continuación, se añadieron a los tubos 10 mL de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido acético y se agitaron nuevamente. Después estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min a 25 °C, se añadieron 3 g de MgSO₄ a los tubos y se agitaron vigorosamente durante 15 s antes de ser centrifugados a 4000 rpm durante 4 min. 3 mL del extracto orgánico se transfirieron a otro tubo que contenía 0,45 g de MgSO₄ y se agitaron

manualmente durante 60 s. Finalmente se centrifugaron a 4000 rpm durante 4 min a 10 °C y se transfirió 1 ml de sobrenadante a viales de 5 mL.

Método 3. Este método consiste en una modificación del protocolo descrito por Kamala y col. (2015). Las muestras se trataron con 2 mL de agua que contenía 0,1% de ácido acético y se mezclaron durante 30 s. A continuación, se añadieron a las muestras 2 ml de acetonitrilo acidificado con ácido acético (0,1%) y se agitaron durante 1 min. Además, se añadieron $0,4 \pm 0,01$ g de NaCl y $1,6 \pm 0,01$ g de $MgSO_4$ a las muestras y se agitaron manualmente durante 15 s. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 25 °C y se transfirió una alícuota de 1 mL de sobrenadante a viales de 5 ml.

Método 4. Este método consiste en una modificación del método 3. Todos los disolventes y reactivos utilizados en el método 3 se redujeron a la mitad en relación con los volúmenes y cantidades.

En todos los métodos anteriores, los extractos se secaron completamente utilizando una corriente de nitrógeno y se disolvieron en 1 mL de tampón de metanol/acetato de amonio - ácido acético a pH 5,75 (70:30 v/v) y se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,22 μ m de poro antes de ser analizado por uHPLC-MS/MS.

Para la selección del mejor método de extracción se calcularon las recuperaciones con los cuatro métodos evaluados. El método 4 basado en la metodología QuEChERS fue el seleccionado a debido a su simplicidad, rapidez y economía siendo aplicado para la extracción de ACP a partir de medios de cultivo elaborados con carne y jamón curado incluidos en el estudio detallado en la Sección II.2.3.2.1 (Figura III.10).

Para la extracción de las muestras de OTA de las piezas de salchichón y la extracción de ACP de las piezas de jamón curado que se habían tomado en los estudios de biocontrol (Secciones II.2.3.2.2.1 y II.2.3.2.2.1 respectivamente) se realizó una modificación en el método 3 basado en la metodología QuEChERS. En este caso se utilizó el método 3 porque la cantidad de muestra (3 g de matriz cárnica) era superior y se necesitaban más cantidades de los disolventes y reactivos utilizados.

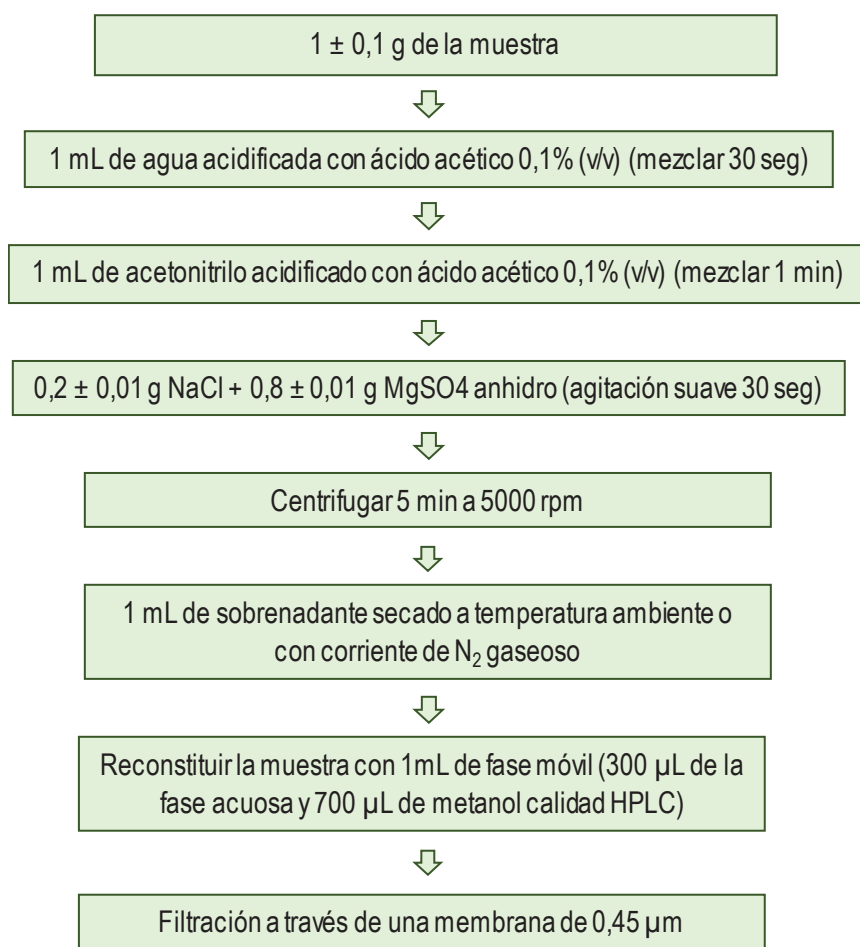


Figura III.10. Método 4 de extracción de ácido ciclopiazónico de medios de cultivos elaborados con carne (MBA) y jamón curado (DHA) siguiendo la metodología QuEChERS descrita por Kamala y col., (2015) con pequeñas modificaciones.

III.2.4.1.4. Extracción de aflatoxinas de la matriz cárnica

El método de extracción de AFs a partir de lonchas de jamón curado y salchichón recogidas en los estudios de biocontrol detallados en la sección III.2.3.3.1.2 fue previamente descrito por Bernáldez y col., (2013).

Se tomaron $5\text{g} \pm 0,1\text{ g}$ de las muestras cárnicas y se maceraron con una mezcla de 50 mL de hexano y 60 mL de acetonitrilo/agua (9:1 v/v), con 0,1% de ácido fórmico, durante 1 hora en un matraz erlenmeyer opaco con agitación. El homogeneizado resultante se transfirió a un embudo de decantación, y la fase inferior se filtró dos veces a través de un filtro con sulfato sódico anhidro, este filtrado se mezcló con 50 mL de hexano, se agitó 30 min en la oscuridad y se transfirió nuevamente a un embudo de decantación. La fase inferior se filtró dos veces a través de sulfato sódico anhidro y el filtrado fue evaporado en un rotavapor a 40 - 45 °C. El residuo obtenido se resuspendió en 1 mL de cloroformo, se filtró mediante filtros de nylon de 0,45 µm de tamaño de

poro y se evaporó con un flujo de nitrógeno, para concentrar la muestra. El residuo se resuspendió en 200 µL de acetonitrilo antes de ser analizado por uHPLC-MS/MS.

III.2.4.2. Análisis de micotoxinas

Para analizar las diferentes micotoxinas se utilizaron varios métodos de detección acorde con la naturaleza de las mismas.

III.2.4.2.1. Detección y cuantificación de micotoxinas y otros metabolitos secundarios en el estudio de difusión

El sistema de cromatografía líquida utilizado para análisis de metabolitos secundarios fue un HPLC de Agilent Serie 1290 acoplado a un sistema LCMS / MS QTrap 5500 y equipado con una fuente de ionización ESI. La separación cromatográfica se realizó a 25 °C en una columna Gemini® C₁₈ de 15 cm de longitud 4,6 mm de diámetro interior y 5 µm de tamaño de partícula, protegida por un cartucho protector de seguridad C₁₈, 4 × 3 mm de diámetro interno. Las fases móviles A y B estaban compuestas por metanol/agua/ácido acético (10/89/1 y 97/2/1, v/v/v, respectivamente) que, además contenían acetato de amonio 5 mM. La separación de los metabolitos se realizó mediante una cromatografía en fase reversa, cuya fase móvil evolucionaba siguiendo un gradiente programado según se describe en la Tabla III.11, a un flujo de 1000 µl/min siendo el tiempo total de la carrera 20,5 min.

Tabla III.11. Gradiente utilizado para la separación mediante HPLC-MS/MS.

Tiempo (min)	Composición del gradiente		
	%A	%B	Duración (min)
0,0	100	0	2
2,0	50	50	3
5,0	0	100	5
14,0	0	100	4
18,0	90	10	2,5
20,5	90	10	0

La validación del método se llevó a cabo mediante la inoculación de forma artificial de muestras de salchichón. Para ello, se pesaron cuatro muestras de salchichón de $0,25 \pm 0,1$ g en

viales de 16 ml. A tres de estas muestras se le añadieron una alícuota de la solución madre que contenía más de 100 analitos (entre los que se encontraban algunos como ACP, OTA, AFB₁, deoxinivalenol, griseofulvina, penicilina y roquefortina C) y se dejaron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del disolvente. Después de esto, estas tres muestras junto con la muestra control sin contaminar se procesaron de acuerdo con la sección III.2.4.1.1. La muestra control se usó para conocer la capacidad de recuperación del método, para ello el extracto obtenido a partir de esta muestra control de salchichón fue inoculados con diferentes concentraciones de la solución mixta con los analitos (1; 3; 10; 30; 100; 300; 1000), para determinar si había diferencias entre la inoculación antes y después de la extracción, lo que permitió la determinación directa de la recuperación aparente (R_A), así como la evaluación de los efectos de la matriz causados por la supresión o mejora de la señal del analito (EM).

Para evaluar la linealidad del método, se utilizó el software MultiQuant™ 2.0.2. Después de la integración de los picos de los distintos tipos de muestra (extractos de salchichón y muestras de salchichón inoculadas, así como los patrones), las áreas de los mismos se utilizaron para la construcción de las curvas de calibración lineal. A continuación, las recuperaciones aparentes y el efectos de la matriz se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

Las R_A (recuperaciones absolutas del método) se calcularon de la siguiente manera:

$$R_A (\%) = \frac{\text{area media (muestras de salchichón inoculadas)}}{\text{area media (patrones)}} \times 100$$

Los efectos de la matriz se expresaron como EM:

$$EM (\%) = \frac{\text{area media (extractos de salchichón)}}{\text{area media (patrones)}} \times 100$$

El límite de detección (LOD) se determinó como la mínima concentración detectable de cada analito cuya transición cualificada presentó una señal ruido S/N ≥ 10. El límite de cuantificación (LOQ) fue determinado como la mínima cantidad detectable de cada analito con una S/N ≥ 10 para la transición cuantificada.

$$LOD (\mu\text{g} / \text{Kg}) = ((\text{concentración de picos})) / (\text{promedio de } S / N) \times 3$$

$$LOQ (\mu\text{g} / \text{Kg}) = ((\text{concentración de picos})) / (\text{promedio de } S / N) \times 10$$

Finalmente, todos los resultados obtenidos para las muestras naturalmente contaminadas se multiplicaron con el factor de dilución de 8 y se corrigieron con las recuperaciones aparentes

determinadas durante la validación. Para el cálculo de los valores medios, se tomaron en consideración todas las muestras contaminadas; para los valores por debajo de la LOQ, se utilizó la mitad de la LOQ de la matriz respectiva.

III.2.4.2.2. Detección de la producción de ocratoxina A mediante HPLC-FLD

Para la detección y cuantificación de OTA se utilizó un equipo AGILENT 1260 INFINITY equipado con un autoinyector. Se utilizó una columna Luna-C₁₈ de 25 cm de longitud, 4,6 mm de diámetro interior y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil empleada fue agua/acetonitrilo/ácido acético (41/57/2, v/v/v) a una velocidad de 1 mL/min en modo isocrático. El volumen de inyección de cada muestra fue de 10 µl y el tiempo de la carrera de 25 min, siendo el tiempo de retención para OTA de 8 min. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para la detección de esta micotoxina fueron 333 y 460 nm, respectivamente.

Las curvas de calibración se construyeron en base a la relación lineal entre el área de los picos y la concentración de los patrones comerciales de OTA utilizados (0,5, 5, 10, 50 y 100 ppb) ($R^2 \geq 0,99$). El valor del LOD se estimó a partir de la curva de calibración con la ecuación establecida por Long y Winefordner (1983): $3 (s_B^2 + s_i^2 + (i/m)^2 s_m)^{1/2}/m$, siendo "m" la pendiente de la curva de calibración, "i" el término de intersección y "s_B", "s_i" y "s_m" los errores estándar de la respuesta del blanco, la ordenada en el origen y la pendiente de la curva de calibración, respectivamente. De esta manera, asumiendo una distribución normal de las cantidades estimadas, α (error del primer tipo) = β (error del segundo tipo) = 0,05, el LOQ fue calculado como $LOQ = 3,04 LOD$ (Currie, 1999). Los valores de LOD y LOQ fueron de 1 y 3 ppb respectivamente.

III.2.4.2.3. Detección de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico mediante uHPLC-MS/MS

Para la detección y cuantificación de las AFB₁ y AFG₁ y ACP se utilizó un equipo uHPLC-MS Dionex Ultimate 3000 acoplado al espectrómetro de masas con trampa iónica Amazon S.L. La fase estacionaria utilizada fue una columna de fase reversa Poroshell 120 EC-C₁₈ de 10 cm de longitud, 2,1 mm de diámetro y con un tamaño de partícula de 1,8 µm de diámetro y para el análisis de ACP se utilizó una columna Poroshell 120 EC-C₁₈, de 15 cm de longitud, 2,1 mm de diámetro y con un tamaño de partícula de 2,7 µm de diámetro. El volumen de inyección fue de 10 µL y el tiempo de ejecución fue de 15 min.

III.2.4.2.3.1. Aflatoxinas

Para la detección de AFs la fase móvil empleada consistió en un tampón 0,1% ácido fórmico – 10 mM formiato amónico (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La separación se realizó con un flujo de 0,2 ml / min mediante un gradiente programado según se describe en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Gradiente utilizado para la separación mediante uHPLC-MS/MS.

Composición del gradiente (%)		
Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B
0,00	98	2
0,10	60	40
4,00	40	60
7,00	20	80
8,50	20	80
8,51	2	98
12,00	2	98
12,01	98	2
15,00	98	2

La detección de las AFs se llevó a cabo utilizando una fuente de ionización por electroespray (ESI) y la identificación de las micotoxinas analizadas fue realizada en función de su relación masa molecular / carga atómica (m/z) y el tiempo de retención. Los iones precursores de la AFB₁ y la AFG₁ fueron 313 y 329 y los iones de cuantificación fueron 285 y 311 respectivamente. El volumen de inyección de cada muestra fue de 5 μ l y el tiempo de la carrera de 15 min, siendo detectada AFB₁ a $6,4 \pm 0,5$ min y AFG₁ a $6,3 \pm 0,5$ min. El software Hystar 3.2 (Bruker Daltonics Inc.) se utilizó para el almacenamiento, manipulación y comparación de los espectros de masas obtenidos. El LOD y el LOQ se calcularon del mismo modo que en la sección III.2.4.2.2. Los valores de LOD fueron 4 ppb para AFB₁ y 1,5 ppb para AFG₁ y los valores de LOQ fueron 12 ppb para AFB₁ y 4,5 para AFG₁.

III.2.4.2.3.2. Ácido ciclopiazónico

La detección y cuantificación de ACP mediante uHPLC-MS/MS precisó la optimización de un nuevo método cromatográfico.

Para ello, se evaluó la composición de la fase móvil, la velocidad del flujo, los factores relacionados con el gradiente y los disolventes utilizados para la resuspensión de los extractos para ser analizados mediante uHPLC-MS/MS.

a) Comparación de la composición de las fases móviles y velocidad del flujo:

Inicialmente se usaron dos fases móviles:

1. Solvente A: tampón ácido fórmico – 10 mM formiato amónico (pH 4,70)
Solvente B: acetonitrilo.
2. Solvente A: tampón ácido acético – 10 mM acetato amónico (pH 5,75)
Solvente B: metanol.

A continuación, se aplicó un gradiente con una velocidad de flujo de 0,2 ó 0,3 ml/min: 0 - 0,2 min con un 2% de B; 0,2 - 0,4 min con aumento de B al 40%; 0,4 - 11 min con un incremento lineal de 40 a 95% de B que se mantuvo hasta el min 12,9, seguido por reequilibrio de la columna hasta el min 15.

b) Comparación del gradiente de fase móvil:

Una vez seleccionada la composición de la fase móvil y la velocidad del flujo, se evaluaron diferentes gradientes de fases móviles tal y como se muestran en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Diferentes gradientes utilizados para la separación de ácido ciclopiazónico mediante uHPLC-MS/MS.

Fase del proceso de optimización (parámetro utilizado)	Denominación	Principales características del gradiente
Fase inicial	Gradiente 1 (Condiciones iniciales)	0,2-0,4 min 40% B, 0,4-11 min incremento lineal de 40 a 95% B
Fase 1 (% B)	Gradiente 2	0,2-0,4 min 50% B, 0,4-11 min incremento lineal de 50 a 95% B
	Gradiente 3	0,2-0,4 min 60% B, 0,4-11 min incremento lineal de 60 a 95% B
	Gradiente 4	0,2-0,4 min 70% B, 0,4-11 min incremento lineal de 70 a 95% B
Fase 2 (Tiempo que tarda B en alcanzar 95%)	Gradiente 5	0,2-0,4 min 60% B, 0,4-4 min incremento lineal de 60 a 95% B.
	Gradiente 6	0,2-0,4 min 70% B, 0,4-4 min incremento lineal de 70 a 95% B
Fase 3 (Tiempo que tarda B en alcanzar 95%)	Gradiente 7	0.2-0.4 min 60% B, 0.4-5 min incremento lineal de 60 a 95% B.
	Gradiente 8	0.2-0.4 min 60% B, 0.4-7 min incremento lineal de 60 a 95% B

c) Comparación de disolventes para la resuspensión de la muestra:

Una vez que las muestras se secaron en una corriente de nitrógeno, se volvieron a disolver los extractos secos en 1 ml de tampón acetato de amonio-ácido acético pH 5,75 / metanol (50/50, v/v) y (30/70, v/v) y el ACP se detectó y cuantificó mediante uHPLC-MS/MS.

La detección de ACP se llevó a cabo utilizando una fuente ESI y la identificación de ACP se realizó en función de su relación m/z y el tiempo de retención como en el caso de las aflatoxinas. El gas de secado, así como el gas nebulizador, era nitrógeno. El flujo de gas se ajustó a 8 L/min. Para el funcionamiento en modo MS/MS, el gas de colisión fue de Helio 50,55% con una presión diferencial de aproximadamente 1,60e-006 mbar en la célula de colisión de onda T. Se aplicó voltaje capilar de 4,5 kV en modo de ionización por electrospray negativo. La temperatura de la interfaz se ajustó a 200°C y la columna de temperatura se ajustó a 31,7 °C. Se escogió una velocidad de escaneo de 32.500 u/s. m/z variaban de 70 a 2.200. El ion precursor 335 m/z y el ion de cuantificación 180 m/z se utilizaron para la detección y cuantificación de ACP, respectivamente. Las señales fueron procesadas por el software Hystar 3.2.

Para verificar las características de rendimiento del método, se realizó la validación incluyendo los siguientes parámetros: linealidad, selectividad (efecto matriz), LOD y LOQ, precisión (recuperación) y precisión del método (repetitividad y precisión).

El efecto de la matriz se determinó mediante la inoculación de 3 g de jamón curado con 20 ng/g y 100 ng/g de ACP. Estas muestras se dejaron equilibrar durante 2 h antes de la extracción y se transfirieron a un tubo de vidrio de 10 ml de volumen. A continuación, las muestras se procesaron de acuerdo con el método 4 seleccionado basado en la metodología QuEChERS tal y como se detalla en la sección III.2.4.1.3. El experimento se realizó por triplicado y al menos se repitió dos veces.

La linealidad se determinó utilizando soluciones preparadas a partir de las soluciones de trabajo, por triplicado, de ocho niveles de concentraciones de las normas ACP (1.000, 750, 500, 250, 150, 100, 50, 25, 10 ng / ml).

Finalmente, el LOD y el LOQ se estimaron utilizando la misma fórmula de la sección II.2.4.2.2.

III.2.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

III.2.5.1. Extracción de ADN a partir de cultivos puros de mohos toxigénicos

Con el fin de evaluar la sensibilidad de los cebadores utilizados y diseñados para la qPCR se extrajo ADN de los mohos toxigénicos *A. flavus* IBT 3696, *A. flavus* CBS 573.65, *A. parasiticus* CECT 2681, *A. parasiticus* CECT 2688, *P. griseofulvum* IBT 14319, *P. griseofulvum* CECT 2919, *P. nordicum* CBS 110.769 y *P. verrucosum* FHSCC 21.

El método de extracción utilizado fue previamente descrito por Rodríguez y col. (2012b). Para ello, se cultivaron las cepas en caldo YES a 25 °C y 150 rpm durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, el micelio fue recogido y filtrado y se congeló con nitrógeno líquido para facilitar su posterior ruptura. El micelio fue pulverizarlo con ayuda de un mortero y una maza, mezclado con 500 µL de un tampón CTAB que contenía β-mercaptoetanol e incubado a 37 °C durante 30 min. Seguidamente se añadieron 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó durante 1 h a 65 °C, a continuación, la muestra se mezcló con 500 µL de cloroformo, se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante fue mezclado con 10 µL de ARNasa (10 mg/ml) e incubado

nuevamente a 37 °C durante 1 h. Se hizo otro lavado con 500 µL de cloroformo, y la muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min. Una vez eliminado el cloroformo, se añadió isopropanol para precipitar el ADN, y se mantuvo a – 20 °C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min para precipitar el ADN. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 100 µl de tampón Tris-EDTA pH 8 y se congeló (– 20 °C) hasta su posterior empleo.

III.2.5.2. Extracción de ARN de mohos de medios de cultivo y matrices cárnicas

Para el método de extracción de ARN se utilizó el kit comercial “RNeasy® Plant Mini Kit” siguiendo la metodología descrita por Bernáldez y col. (2017b). Una vez descongelado el micelio, se mezcló con 500 µL del tampón Lysis Solution que contenía 10 µl de β-mercaptoetanol y las muestras se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ARN obtenido se diluyó en 50 µL de agua libre de ARNasas y se mantuvo a – 80 °C hasta su utilización.

Por otro lado, las muestras fueron tratadas con el kit comercial “DNase I, RNase-free” que contenía la enzima ADNasa para eliminar cualquier contaminación del ADN genómico. La concentración y pureza del ARN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop. Se estima que una concentración de 40 µg/mL se corresponde con una unidad de densidad óptica, considerándose que la pureza es adecuada para llevar a cabo estudios de expresión génica cuando el ratio A_{260}/A_{280} es superior a $2,0 \pm 0,1$.

III.2.5.3. Síntesis del ADN complementario

A partir del ARN total obtenido anteriormente, se sintetizó el ADNc, que fue el material genético utilizado en las posteriores reacciones de RT-qPCR. Para llevar a cabo esta síntesis, se utilizó el kit comercial “PrimeScript™ RT Reagent”, realizando la mezcla de la reacción según las instrucciones del fabricante: 2 µL del tampón de reacción 5X (PrimeScript Buffer), 0,5 µL de la enzima transcriptasa inversa “PrimeScript RT Enzyme Mix I”, 0,5 µL de OligoDT (50 µM), 0,5 µL de los cebadores aleatorios “Random 6 mers” (100 µM), 5 µL de la muestra de ARN y agua ultrapura estéril para llevar el volumen de la reacción final a 10 µL.

Las condiciones de amplificación de la reacción de transcripción inversa (RT) consistieron en un ciclo de 15 min a 37 °C para que actúe de forma óptima la enzima transcriptasa inversa, un

ciclo de 5 s a 85 °C para la inactivación de la enzima y una etapa final de enfriamiento a 4 °C. Finalmente, el ADNc obtenido se conservó a – 20°C hasta su uso.

III.2.5.4. Métodos de RT-qPCR para el estudio de la expresión génica en mohos productores de micotoxinas

Para llevar a cabo el estudio de la expresión relativa de genes implicados en la síntesis de las micotoxinas es necesario, en primer lugar, seleccionar los cebadores específicos para la amplificación de genes relacionados con la síntesis de las micotoxinas estudiadas en esta Tesis Doctoral. Para AFs y OTA se utilizaron cebadores descritos en la bibliografía, tal como se describen a continuación y para los mohos productores de ACP, se diseñaron cebadores a partir de secuencias conocidas de genes implicados en la producción de esta micotoxina. Por otro lado, también se seleccionaron los cebadores para la amplificación del gen de la β -tubulina que fue utilizado como control endógeno.

III.2.5.4.1. Estudio de la expresión génica de mohos productores de micotoxinas

III.2.5.4.1.1. Genes utilizados como control endógeno

Se utilizaron dos parejas de cebadores que amplificaban el gen de la β -tubulina, para el estudio de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de AFs se diseñó una pareja a partir de la secuencia de *A. parasiticus* (nº de acceso en GenBank FR775333.1) disponible en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), utilizando el software Primer3web para el diseño de los cebadores (Tabla III.14).

Por otro lado, para el estudio de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de OTA y ACP, se utilizó una pareja de cebadores previamente diseñados por Rodríguez y col. (2012g) (Tabla III.14).

Tabla III.14. Secuencias de nucleótidos de los cebadores diseñados para los protocolos de RT-qPCR basados en el gen de la β -*tubulina*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Posición dentro del gen
β - <i>tubulina</i>	F- <i>TUBjd</i>	TCTTCATGGTTGGCTTCGCT	98	964 ^a
	R- <i>TUBjd</i>	CTTGGGGTCGAACATCTGCT		1042 ^a
β - <i>tubulina</i>	β - <i>tubF1</i>	GCCAGCGGTGACAAGTACGT	93	279 ^b
	β - <i>tubR1</i>	TACCGGGCTCCAAATCGA		354 ^b

^a Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen β -*tubulin* para la cepa *A. parasiticus* (Número de acceso en GeneBank FR775333.1).

^b Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen β -*tubulin* para la cepa *P. nordicum* (Número de acceso en GeneBank AY674319.1).

III.2.5.4.1.2. Genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas

Para el estudio de la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de AFs, se utilizaron un gen estructural (*afP*) y dos genes reguladores (*afR* y *afS*), cuyos cebadores habían sido diseñados previamente por Rodríguez y col. (2012g), Medina y col. (2015b) y Bernáldez y col. (2017a) respectivamente. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Secuencias de nucleótidos de los cebadores diseñados para los protocolos de RT-qPCR basados en los genes *afP*, *afR* y *afS*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Posición dentro del gen
<i>afP</i>	F- <i>omt</i>	GGCCGCCGCTTTGATCTAGG	123	1485 ^a
	R- <i>omt</i>	ACCACGACCGCCGCC		1593 ^a
<i>afR</i>	<i>AfRTaq1</i>	TCGTCCTTATCGTTCTCAAGG	110	1646 ^b
	<i>AfRTaq2</i>	ACTGTTGCTACAGCTGCCACT		1735 ^b
<i>afS</i>	<i>AfSqPCR1</i>	TGGTGCGACCATATTTACA	114	832 ^c
	<i>AfSqPCR2</i>	GGTTGGGTCACGAAGTGGTT		926 ^c

^a Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *afP* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank L25835.1).

^b Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *afR* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank AF441435.2).

^c Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *afS* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank AF441435.2).

III.2.5.4.1.3. Genes implicados en la biosíntesis de ocratoxina A

Para la expresión relativa de genes implicados en la biosíntesis de OTA, se emplearon los cebadores previamente diseñados por Rodríguez y col. (2011, 2014) para los genes *otapksPN* y *otanpsPN* respectivamente. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla III.16.

Tabla III.16. Secuencias de nucleótidos de los cebadores diseñados para los protocolos de RT-qPCR basados en los genes *otapksPN* y *otanpsPN*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Posición dentro del gen
<i>otapksPN</i>	F- <i>pkstr</i>	CGAAGATGTCTCCACGGAAT	79	1527 ^a
	R- <i>pkstr</i>	TTGCGAGTGTCTTTGGTCAG		1586 ^a
<i>otanpsPN</i>	F- <i>npstr</i>	GCCGCCCTCTGTCATTCCAAG	113	5090 ^a
	R- <i>npstr</i>	GCCATCTCCAAACTCAAGCGTG		5181 ^a

^a Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *otapksPN* para *P. nordicum*. (Número de acceso en GeneBank AY557343).

III.2.5.4.1.4. Genes implicados en la biosíntesis del ácido ciclopiazónico

En el caso del ACP, los cebadores para la amplificación de los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* implicados en su biosíntesis, fueron diseñados a partir de las secuencias de *A. flavus* disponibles en la base de datos GenBank con referencias de acceso JN712216.1 y JF418470.1, obtenidos del NCBI. Posteriormente se utilizó el software Primer3web para el diseño de los cebadores (Tabla III.17).

Tabla III.17. Secuencias de nucleótidos de los cebadores diseñados para los protocolos de RT-qPCR basados en los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Posición dentro del gen
<i>dmaT</i>	F- <i>dmaT</i> -BP	CAAACATCGGAGCTGTGCTA	139	3556 ^a
	R- <i>dmaT</i> -BP	AGATCTCCAGGAAAGCAGCA		3675 ^a
<i>pks-nrps</i>	F- <i>pks-nrps</i> -ACP	CCTACGGTGTGACCGAGATT	152	14385 ^b
	R- <i>pks-nrps</i> -ACP	AGGTTGCAGTCCGTATCCAC		14517 ^b
<i>mfs-1</i>	F- <i>mfs-1</i> -ACP	CCTTCCTCGCCATAGTCCTT	108	5 ^c
	R- <i>mfs-1</i> -ACP	ATTGGTGCTCTTTGCTACGG		93 ^c

^a Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *dmaT* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank JN712216.1).

^b Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *pks-nrps* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank JN712216.1).

^c Posiciones de acuerdo a la secuencia publicada del gen *mfs-1* para *A. flavus* (Número de acceso en GeneBank JF418470.1).

III.2.5.4.1.5. Genes que codifican la proteína antifúngica de *P. chrysogenum*

Los cebadores de los genes *Pc* relacionados con la proteína antifúngica PgAFP utilizados fueron diseñados previamente por Bernáldez y col. (2014) respectivamente. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla III.18.

Tabla III.18. Secuencias de nucleótidos de los cebadores diseñados para los protocolos de RT-qPCR basados en el gen *pgafp*.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Posición dentro del gen
<i>pgafp</i>	F- <i>pgafp</i>	CAGATCACCAGCATTGCCA	91	4 ^a
	R- <i>pgafp</i>	CTCGGGCATCAAGATCGTCC		75 ^a

^a Posiciones de acuerdo a las secuencias publicadas del gen *PgAFP* para la cepa *P. chrysogenum* (Rodríguez-Martín y col., 2010).

III.2.5.4.2. Desarrollo de los métodos de RT-qPCR basados en la metodología SYBR GREEN

Para el estudio de la expresión relativa de los genes implicados en la ruta biosintética de AFs, OTA y ACP y con la expresión de la proteína PgAFP se utilizó el termociclador Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System. El desarrollo de las reacciones de amplificación se prepararon por triplicado en un volumen total de 12,5 µL en una placa de 96 pocillos, cubierta con una lámina óptica adhesiva. En todas las reacciones se incluyeron tres réplicas de una muestra control sin la secuencia de ADNc diana.

III.2.5.4.2.1. Método de qPCR para el estudio de la expresión génica en mohos toxigénicos

Para la detección y cuantificación de los mohos productores de AFs, y OTA y su relación con la expresión de la proteína PgAFP y el estrés osmótico se utilizaron los métodos de qPCR basados en la metodología SYBR Green propuestos por Rodríguez y col. (2012f, 2014, 2016), y Bernáldez y col. (2014). Para detectar y cuantificar mohos productores de ACP se diseñaron los cebadores de los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* y se optimizaron las cantidades de cebadores en cada una de las reacciones, para ello, se extrajo el ADN, de las cepas productoras de ACP utilizadas en este estudio, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.5.1. Las concentraciones de cebadores ensayadas variaron de 150 a 600 nM y las más eficientes fueron seleccionadas para desarrollar el método de qPCR.

La mezcla de la reacción contenía un volumen final de 12,5 μ L, con 6,25 μ L de 2x SYBR® Premix Ex Taq™, 0,5 μ L de 50x ROX™ Reference Dye, 2,5 μ L de ADNc y diferentes concentraciones de cada cebador recogidas en la Tabla III.19.

Tabla III.19. Concentraciones de los cebadores de los genes específicos de aflatoxinas, ocratoxina A, ácido ciclopazónico, y los genes relacionados con la expresión de la proteína PgAFP utilizados en los protocolos de qPCR basados en la metodología SYBR Green.

	Genes	Cebadores	Concentración de los cebadores (nM)
AFs	<i>aflP</i>	F- <i>omt</i>	160
		R- <i>omt</i>	320
	<i>aflR</i>	AfRTaq1	300
		AfRTaq2	300
	<i>aflS</i>	AfSqPCR1	300
		AfSqPCR2	300
OTA	<i>otapksPN</i>	F- <i>pkstr</i>	600
		R- <i>pkstr</i>	600
	<i>otanpsPN</i>	F- <i>npstr</i>	400
		R- <i>npstr</i>	400
ACP	<i>dmaT</i>	F- <i>dmaT</i> -BP	600
		R- <i>dmaT</i> -BP	600
	<i>pks-nrps</i>	F- <i>pks-nrps</i> -ACP	150
		R- <i>pks-nrps</i> -ACP	150
	<i>mfs-1</i>	F- <i>mfs-1</i> -ACP	150
		R- <i>mfs-1</i> -ACP	150
proteína PgAFP	<i>pgafp</i>	F- <i>pgafp</i>	160
		R- <i>pgafp</i>	300

Las condiciones de amplificación ensayadas en los protocolos de qPCR se describen en la Tabla III.20.

Tabla III.20. Condiciones de amplificación ensayadas en los protocolos de qPCR basados en la metodología SYBR Green.

Cebadores	Temperatura y tiempos de hibridación y extensión
<i>afIP, aflR, aflS, otapksPN, otanpsPN</i>	1 ciclo de 50 °C, 2 min, 1 ciclo de 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s y 60 °C 1 min
<i>dmaT, pks-nrps y mfs-1</i>	1 ciclo de 50 °C, 2 min, 1 ciclo de 95 °C 10 min, 50 ciclos de 95 °C 15 s y 60 °C 1 min
<i>pgafp</i>	1 ciclo de 50 °C 2 min, 1 ciclo de 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s, 58 °C 2 s, 60 °C 20 s y 62 °C 25 s.

Después del ciclo final de la qPCR, se llevó a cabo el análisis de la curva de disociación de los productos amplificados mediante el calentamiento de los mismos desde 60 a 95 °C y se tomaron continuas medidas de la fluorescencia para verificar los productos de PCR esperados. Los valores del C_t representan el ciclo de la PCR en el que se detecta el primer incremento de fluorescencia, sobre un umbral definido.

III.2.5.4.2.2. Cálculo de la expresión génica relativa

Previo a la utilización de los métodos de RT-qPCR para el estudio de la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas, se comprobó que cumplían los requisitos del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ desarrollado por Livak y Schmittgen (2001). Así, se demostró que, en primer lugar, la diferencia entre las eficiencias de las curvas estándar de los genes diana y del control endógeno era inferior a 10% en todos los casos, y, en segundo lugar, se evidenció que las condiciones experimentales no afectaban a la expresión del control endógeno seleccionado.

Para calcular la expresión relativa temporal se consideraron las muestras del día 3 de incubación como control/calibrador para poder compararlas con los demás tiempos de muestreo. Del mismo modo, para calcular el efecto de la levadura o el moho antifúngico sobre la expresión relativa de los genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas y de los genes relacionados con la expresión de la proteína PgAFP y el estrés osmótico se utilizaron como control/calibrador los valores de la expresión relativa de los mohos toxigénicos sin la presencia del agente de biocontrol.

III.2.6. ELABORACION DE MODELOS DE PREDICCIÓN MEDIANTE MINERÍA DE DATOS

A partir de los datos obtenidos del crecimiento y la producción de AFs de las cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus* a diferentes temperaturas y a_w en los medios de cultivo elaborados con carne y jamón curado (sección III.2.3.2) se realizó un análisis de datos donde se han utilizado diferentes técnicas de minería de datos con el fin de predecir la producción de AFs. Para ello se determinó la producción de AFs en un periodo de 2 a 24 días, en diferentes condiciones de temperaturas y a_w , en los medios MBA y DHA (Tabla III.21), a partir de los cuales se ha realizado el análisis de predicción.

Tabla III.21. Días de análisis de la producción de aflatoxinas (AFB₁ (n=12) y AFG₁ n=6)) de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* a diferentes temperaturas y a_w en los medios elaborados con carne (MBA) y jamón curado (DHA) liofilizados.

Cepa	Temperatura (°C)	AFB ₁			AFG ₁		
		a_w			a_w		
		0,95	0,90	0,85	0,95	0,90	0,85
<i>A. flavus</i> CBS 573.65 <i>A. parasiticus</i> CECT 2688	10	----	----	----	----	----	----
	15	----	18 ^a , 20 ^b	13 ^a , 15 ^b	----	----	13 ^a , 15 ^b
	20	24 ^{ab}	12 ^a , 24 ^b	11 ^a , 13 ^b	----	12 ^a , 14 ^b	11 ^a , 13 ^b
<i>A. flavus</i> CBS 573.65 <i>A. flavus</i> IBT 3696 <i>A. parasiticus</i> CECT 2688 <i>A. parasiticus</i> CECT 2681	25	2, 4, 6, 8, 10, 12 ^{ab}	2, 4, 6, 8, 10, 12 ^{ab}	2, 4, 6, 8, 10, 12 ^{ab}	6, 8, 10, 12 ^{ab}	4, 6, 8, 10, 12 ^{ab}	2, 4, 6, 8, 10, 12 ^{ab}

^a Día de muestreo en el medio MBA.

^b Día de muestreo en el medio DHA.

En esta tesis doctoral han sido aplicadas dos técnicas de predicción de minería de datos: Regresión Lineal Múltiple (RLM) y Regresión Isotónica (RI) para predecir el momento exacto de la producción de AFs en función de las condiciones de temperatura y la a_w relacionadas con el proceso de maduración del jamón curado.

III.2.6.1. Regresión Lineal Múltiple

RLM es una técnica predictiva que consiste en representar la relación lineal entre una variable dependiente y numerosas variables independientes. Con esta técnica se obtiene una ecuación de regresión lineal que puede usarse para predecir valores futuros (Hastie y col., 2001). Esta ecuación es de primer orden y tiene la siguiente forma:

$$y = \omega_0 + \sum_1^n \omega_i x_i$$

Para aplicar esta técnica, se utilizó el método de selección de atributos M5. Este método está basado en los criterios de Akaike y evalúa los atributos uno por uno, eliminando el que tiene el menor coeficiente de estandarización hasta que no se observan mejoras en la reducción del error. Para llevar a cabo la validación de las predicciones realizadas con RLM, el procedimiento de estimación se ha aplicado con validación cruzada de 10 campos (Dietterich, 1998), donde el conjunto de datos es dividido en 10 subconjuntos de igual tamaño, probando un subconjunto cada vez, y los subconjuntos restantes se utilizan para ajustar el modelo. El proceso se repite secuencialmente hasta que se prueban todos los subconjuntos, por tanto, se usa el conjunto de datos completos para entrenar y para validar el sistema.

III.2.6.2. Regresión Isotónica

RI es una técnica de minería de datos de predicción que se basa en la estimación de valores ordenados para una variable independiente en función de una de las variables dependientes que, en este caso, son los parámetros de entrada, seleccionando el parámetro que alcanza los mejores resultados (Barlow y col., 1972; Borge, 1985). Finalmente, se interpola una función a partir de los datos extraídos y esta línea de tendencia se compara con el conjunto de datos que contiene los valores originales de la base de datos, obteniendo una ecuación de orden 6 de la siguiente forma:

$$y = \sum_0^n \omega_i x^i$$

La aplicación de RI está especialmente indicada cuando los valores de la base de datos están muy correlacionados, principalmente porque, en estos casos, se recomienda siempre el uso de regresión no lineal.

III.2.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el software SPSS v.22.0. En primer lugar, se probó si los datos obtenidos en este trabajo seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Debido al hecho de que todos los conjuntos de datos fallaron en la prueba de normalidad, se realizó una transformación variable para mejorar la normalidad u homogeneizar

las varianzas, pero sin ningún éxito, por lo que el análisis de datos no paramétricos se llevó a cabo utilizando la prueba Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre las medias. Posteriormente, aquellas muestras que diferían, se les aplicó el test U de Mann-Whitney para comparar los valores medios obtenidos. La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

El análisis de componentes principales (PCA) en la matriz de correlación de las variables se realizó como esta descrito por Nielsen, y col. (2012). Los resultados del PCA fueron interpretados gráficamente dibujando biplots donde el diagrama de dispersión de la matriz de puntuación como punto y la matriz de carga como flechas para los dos primeros componentes se superponen para una representación condensada de la correlación entre las variables originales y la distribución de las muestras. La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. DIFUSIÓN DE MICOTOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

IV.1.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Antes de la realización de los estudios de difusión, se realizó la validación del método de HPLC-MS/MS optimizado por Malachová y col. (2014) para la determinación de 295 metabolitos fúngicos y bacterianos, utilizando una matriz cárnica.

Para ello, en primer lugar, se evaluó la eficiencia de extracción y el efecto matriz procedente de la matriz cárnica. Los parámetros de rendimiento del método se obtuvieron a partir de muestras de salchichón inoculadas con una disolución madre de múltiples metabolitos secundarios tal y como se ha descrito en la sección III.2.4.2.1 de Material y Métodos. Aunque la inoculación se realizó con todos los metabolitos secundarios disponibles, el análisis de los datos se limitó a los analitos más importantes producidos por cepas de moho de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* comúnmente encontrados de los derivados cárnicos curado-madurados. En total, se evaluaron los parámetros que determinan el rendimiento del método para 19 analitos entre los que se incluye la AFB₁, la OTA y el CPA (Tabla IV.1). Tal y como se observa en la Tabla IV.1 los valores de R_A oscilaron entre 80 – 106% para estos metabolitos, como por ejemplo AFB₁ (81,4%), OTA (89%), Roquefortina C (99,3%), griseofulvina (101,1%); observándose, además, una buena repetitividad (desviaciones estándar inferiores al 10%) en todos los casos (Tabla IV.1).

Con respecto a los valores obtenidos del efecto de la matriz (EM), estos variaron entre un 67% en el caso de ácido 3-Nitropropionico y un 208% en el caso del ACP (Tabla IV.1). Entre los 19 analitos analizados, 12 de ellos, estaban dentro del rango 90 – 110%. Además, la detección de AFB₁, OTA, griseofulvina, esterigmatocistina y ácido micofenólico, que son las toxinas más comúnmente encontradas en los derivados cárnicos curado-madurados, no se vieron prácticamente afectadas por el efecto de la matriz. Por otro lado, se observaron valores superiores al 120% para 4 analitos: norverrucosidina (121,7%), chanoclavina (163,5%), penitrem A (193,6%) y ACP (207,9%), mientras que para la roquefortina C (77%) y el ácido 3-nitropropiónico (67,9%) mostraron los valores más bajos de EM (Tabla IV.1).

Finalmente, el LOD y el LOQ de los metabolitos secundarios más importantes se muestran en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Parámetros del rendimiento del método analítico utilizado para la determinación de los analitos más relevantes en salchichón.

Metabolitos secundarios	LOD ($\mu\text{g/Kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/Kg}$)	R _A (%) \pm DE	EM (%)
Aflatoxina B ₁	0,31	1,03	81,4 \pm 2,0	97,9
Ocratoxina A	0,29	0,99	89 \pm 3,7	96,4
Norverrucosidina	0,88	2,94	85,6 \pm 3,4	121,7
Griseofulvina	0,29	0,99	101,1 \pm 2	98,9
Roquefortina C	7,37	24,59	99,3 \pm 9,1	77,0
Quinolactacina A	0,32	1,07	89,4 \pm 7	102,0
Penitrem A	0,35	1,19	106,8 \pm 6,3	193,6
Ciclofenol	0,44	1,49	98,8 \pm 9,3	102,7
Ciclofemina	0,28	0,96	97,2 \pm 6,4	98,3
Esterigmatocistina	0,33	1,1	90,5 \pm 1,3	97,4
Chanoclavina	0,98	3,29	98,8 \pm 7,7	163,5
Ácido micofenólico	0,58	1,96	98,6 \pm 0,8	100,0
Andrastina A	0,50	1,69	87,6 \pm 2,9	106,3
Ácido ciclopiazónico	12,16	40,54	85,3 \pm 5,3	207,9
Viridicatol	3,79	12,65	99,1 \pm 2,3	102,8
Ácido 3-Nitropropionico	0,18	0,62	88,4 \pm 1,8	67,9
Verufin	0,17	0,57	90,5 \pm 6,1	88,0
Griseofenona C	0,34	1,14	93,2 \pm 4,9	100,6
Ocratoxina α	8,03	26,78	98,4 \pm 7,9	105,4

LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación; R_A: Recuperación aparente; DE: desviación estándar; EM: Efecto matriz.

IV.1.2. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Los resultados del estudio experimental detallado en la sección II.2.3.1. donde se inocularon varias cepas de mohos toxigénicas: *P. nordicum* CBS 110.769, *P. verrucosum* CECT 2906, *P. griseofulvum* CECT 2919 y *P. griseofulvum* IBT 14319 en piezas de salchichón y jamón curado se muestran en la Tablas IV.2 y IV.3, respectivamente. Tal y como muestra en ambas tablas, se detectaron un total de 29 metabolitos secundarios diferentes.

En general, la mayoría de los metabolitos secundarios producidos por los mohos toxigénicos inoculados en la superficie de ambos productos cárnicos difundieron hacia el interior hasta 3 cm de profundidad (cortes B y C), sin embargo, la concentración de estos metabolitos fúngicos disminuyó a medida que se difundían hacia el interior. Entre los metabolitos secundarios detectados se encontraron algunas de las micotoxinas más comunes producidas por las cepas fúngicas utilizadas en este estudio como ACP, OTA, roquefortina C y verrucosidina.

Tabla IV.2. Difusión de metabolitos secundarios ($\mu\text{g/Kg} \pm$ desviación estándar) producidos por *P. griseofulvum* IBT 14319, *P. griseofulvum* CECT 2919, *P. nordicum* CBS 110.769 y *P. verrucosum* CECT 2906 a diferente profundidad (A, B y C) en setchición después de 15 días de incubación a 20°C.

Metabolitos secundarios	<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319			<i>P. griseofulvum</i> CECT 2919			<i>P. nordicum</i> CBS 110.769			<i>P. verrucosum</i> CECT 2906		
	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)
7-Hidroxipectabolina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	331,1 ± 18,7	16,7 ± 0,2	0,7 ± 1	337,3 ± 40,1	46,7 ± 6,1	19,5 ± 11,1
Atlantion A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,4 ± 3,4	8,9 ± 12,6	1,2 ± 1,3
Brevianamida F	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,03	0,56 ± 0,02	68,1 ± 7,9	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,1
Ciclo (L-Pro-L-Tir)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,6 ± 0,2	5,5 ± 0,7	5,9 ± 0,1	4,6 ± 0,3	5,8 ± 0,1	6,5 ± 0,8
Ciclo (L-Pro-L-Val)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,9 ± 0,3	5,2 ± 0,6	5,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,5
Ácido ciclopiazónico	4604,5 ± 921,3	795,2 ± 174,2	251 ± 56,9	952,3 ± 0,2	164,9 ± 5,8	51,2 ± 9,6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Decdrogriseofulvina	318,7 ± 35,7	1,04 ± 0,5	0,4 ± 0,01	161,3 ± 17,8	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,3	0,18 ± 0,26	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Dehidrogriseofulvina	6,5 ± 0,5	0,01 ± 0,007	< LOD	5,09 ± 1,1	0,001 ± 0,001	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Desoxiverrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Dihidrogriseofulvina	251,5 ± 26,3	1,7 ± 1,1	0,6 ± 0,1	163,5 ± 14,5	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Erodina	0,15 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,005	0,1 ± 0,01	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Flavoglaucina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,2 ± 0,2	0,06 ± 0,06	0,03 ± 0,01	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,3	5,7 ± 7,9
Griseofulvina	492,9 ± 1,7	6,3 ± 4,05	2,3 ± 0,4	429,5 ± 20,3	1,8 ± 0,3	1,6 ± 1,4	1,08 ± 1,3	0,09 ± 0,1	0,08 ± 0,03	< LOD	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,1
Griseofenona B	512,7 ± 96,4	2,05 ± 1,3	< LOD	174,2 ± 30,9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Griseofenona C	9,2 ± 2,2	< LOD	< LOD	4,8 ± 0,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Melegrina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	21,5 ± 28,1	7,1 ± 4,1	3,6 ± 2,1	5,02 ± 5,2	26,4 ± 34,7	5,4 ± 0,3
Neoxalina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Notihexantona	36,6 ± 5,6	0,16 ± 0,1	< LOD	11,7 ± 1,7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Nonverrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,1 ± 0,14	0,2 ± 0,3	< LOD
Ocratoxina A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1,09 ± 0,2	0,31 ± 0,08	< LOD	1,02 ± 0,5	0,17 ± 0,09	< LOD
Ocratoxina B	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,4 ± 0,3	< LOD	< LOD	0,9 ± 0,6	< LOD	< LOD
Peniolina G	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Pestabolina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	205,5 ± 3,9	4,8 ± 2,7	0,3 ± 0,4	17,1 ± 2,3	2,1 ± 0,6	1,6 ± 0,8
Questiomicina A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	644 ± 7,9	7,1 ± 6	0,7 ± 0,8	343,2 ± 27,2	18,8 ± 2,2	24,1 ± 1,1
Roquefortina C	70075 ± 1393	2020,5 ± 758,7	572,5 ± 110,1	71715 ± 1110,1	1200,5 ± 183,1	462 ± 268,5	323,2 ± 382,5	40,3 ± 11,5	25,8 ± 9,2	6,9 ± 1,3	32,6 ± 9,3	37,8 ± 19,3
Roquefortina D	48,7 ± 7,4	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,01	31,8 ± 6,4	0,2 ± 0,05	0,07 ± 0,1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,1 ± 0,1	< LOD
Triptofaina B	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	33,3 ± 9,9	0,7 ± 0,4	0,2 ± 0,3
Triptófil	6,6 ± 0,1	2,6 ± 0,05	3,2 ± 0,3	2,8 ± 0,6	2,2 ± 0,02	3,9 ± 0,5	3,8 ± 0,8	1,7 ± 0,3	2,4 ± 0,5	7,2 ± 0,4	2,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3
Verrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,8	0,07 ± 0,1

LOD: Límite de detección.

Tabla IV.3. Difusión de metabolitos secundarios ($\mu\text{g}/\text{kg}$ \pm desviación estándar) producidos por *P. griseofulvum* IBT 14319, *P. griseofulvum* CECT 2919, *P. nordicum* CBS 110.769 y *P. verrucosum* CECT 2906 a diferente profundidad (A, B y C) en jamón curado después de 15 días de incubación a 20 °C.

Metabolitos secundarios	<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319			<i>P. griseofulvum</i> CECT 2919			<i>P. nordicum</i> CBS 110.769			<i>P. verrucosum</i> CECT 2906		
	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)	A (0-1 cm)	B (1-2 cm)	C (2-3 cm)
7-Hidroxisetabolina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	63,6 \pm 8,1	7,6 \pm 44,7	5,5 \pm 0,8	89,7 \pm 59,5	5,2 \pm 2,06	2,8 \pm 0,8
Atlantion A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,06	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	0,064 \pm 0,091	< LOD
Brevianamida F	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	24,04 \pm 0,4	25,6 \pm 0,7	25,2 \pm 8,1	48,2 \pm 26,2	34,8 \pm 2,5	29,03 \pm 0,7
Ciclo (L-Pro-L-Tir)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	72,3 \pm 2,4	81,5 \pm 1,6	81,06 \pm 17,9	103,3 \pm 11,5	113,4 \pm 17,5	97,8 \pm 5,1
Ciclo (L-Pro-L-Val)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	63,6 \pm 0,4	71,5 \pm 4,6	72,3 \pm 5,7	76,6 \pm 8,2	80,9 \pm 12,6	73,5 \pm 7,1
Ácido ciclopiazonico	127,1 \pm 153,4	35,6 \pm 31,8	15,3 \pm 11,8	157,9 \pm 31,6	74,9 \pm 29,8	48,1 \pm 22,2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Declorogriseofulvina	56,7 \pm 10,005	< LOD	< LOD	9,8 \pm 2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Dehidrogriseofulvina	0,06 \pm 0,006	< LOD	< LOD	0,06 \pm 0,03	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Desoxiverrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Dihidrogriseofulvina	9,9 \pm 2,3	< LOD	< LOD	3,1 \pm 0,9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Emodina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Flavoglucina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Griseofulvina	35,3 \pm 9,7	< LOD	< LOD	10,9 \pm 3,2	0,06 \pm 0,09	0,1 \pm 0,1	< LOD	< LOD	0,01 \pm 0,2	< LOD	< LOD	< LOD
Griseofenona B	8,7 \pm 0,1	< LOD	< LOD	2,06 \pm 0,3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Griseofenona C	0,6 \pm 0,01	< LOD	< LOD	0,1 \pm 0,02	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Meleagrina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,4 \pm 0,01	15,3 \pm 13,6	20,1 \pm 21,5	6,1 \pm 5,9	7,4 \pm 3,4	3,5 \pm 2,6
Orabaxina A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1,02 \pm 0,02	0,17 \pm 0,3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Orabaxina B	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,95 \pm 0,1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Neoxalina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,03	< LOD	< LOD	< LOD
Norlichexantina	0,3 \pm 0,05	< LOD	< LOD	0,5 \pm 0,6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Norverrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Penicilina G	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Pestabolina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	20,4 \pm 0,7	1,8 \pm 1,3	1,5 \pm 0,5	21,5 \pm 2,9	1,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3
Questioncina A	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	72,6 \pm 3,6	4,1 \pm 48,6	1,6 \pm 1,1	147,5 \pm 36,4	4,1 \pm 3,7	3,1 \pm 1,1
Roquefortina C	2101,5 \pm 1546,4	18,5 \pm 6,6	12,7 \pm 3,2	105,9 \pm 44,7	38,1 \pm 24,9	48,1 \pm 40,1	3,6 \pm 2,1	6,7 \pm 2,6	9,5 \pm 8,7	3,9 \pm 3,1	3,1 \pm 3,4	1,01 \pm 1,4
Roquefortina D	0,4 \pm 0,3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,05 \pm 0,07	< LOD	< LOD	< LOD
Triplosatina B	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,051 \pm 3,706	0,141 \pm 0,2	< LOD
Triptobol	2,9 \pm 2,1	1,4 \pm 0,2	2,3 \pm 1,7	4,05 \pm 3,9	3,01 \pm 2,8	3,3 \pm 0,7	1,2 \pm 0,05	1,5 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4	4,8 \pm 5,9	0,9 \pm 0,5	1,9 \pm 0,5
Verrucosidina	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,2 \pm 0,2	0,06 \pm 0,1	< LOD	< LOD

LOD: Límite de detección.

IV.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DE DETECCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN JAMÓN CURADO USANDO UN MÉTODO QuEChERS Y uHPLC-MS/MS

En este ensayo se optimizó un protocolo de extracción de ACP basado en la metodología QuEChERS para ser utilizado indistintamente en medios de cultivo sintéticos o en matrices cárnicas, así como un método de uHPLC-MS/MS para su cuantificación sensible en jamón curado.

IV.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR DE MASAS

Para la optimización de las condiciones del espectrómetro de masas se utilizó una solución estándar de ACP de 1 $\mu\text{g/mL}$, preparada en ácido acético – 5 mM acetato amónico/metanol (1:1, v:v). En esta condición, se aisló la molécula desprotonada y se sometió a una disociación inducida por colisión, utilizando como gas el helio y a una radiofrecuencia con una amplitud de fragmentación de entre 0 – 1 V para lograr la amplitud de fragmentación óptima, que, en este caso, fue de 0,52 V. Los experimentos se llevaron a cabo en ambos modos de ionización, positiva y negativa, y de acuerdo con el carácter ácido del ACP, los mejores resultados se obtuvieron en el modo de ionización negativa. El espectrómetro de masas funcionó en modo MS/MS. Los iones precursores, de cuantificación y de calificación del ACP fueron 355, 180 y 140, respectivamente, por lo que las transiciones MS/MS fueron de 355 a 180 y 355 a 140 m/z, que se utilizaron para la cuantificación y detección de ACP, respectivamente.

IV.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

A partir de las condiciones cromatográficas utilizadas en un método de uHPLC-MS/MS desarrollado por nuestro grupo de investigación para detectar otras micotoxinas, se modificaron la composición de la fase móvil, la velocidad del flujo, los factores relacionados con el gradiente de la fase móvil y los disolventes utilizados para la resuspensión de los extractos con el fin de optimizar la detección y cuantificación específica de ACP.

IV.2.2.1. Comparación de la composición de las fases móviles y los flujos

En primer lugar, se probaron dos composiciones diferentes de la fase móvil: a) tampón ácido fórmico – 10 mM formiato amónico (pH 4,70) / acetonitrilo (fase móvil A) y b) tampón ácido acético – 10 mM acetato amónico (pH 5,75) / metanol (fase móvil B) así como dos velocidades de flujo (0,2 y 0,3 mL/min). Con el uso de la fase móvil más ácida (fase móvil A) y las velocidades de flujo 0,2 y 0,3 mL/min (Figura IV.1 A y C) se obtuvieron amplios picos cromatográficos con cola larga que fueron difíciles de cuantificar. Cuando se utilizó la fase móvil B a una velocidad de flujo 0,2 mL/min mejoró la sensibilidad y la resolución de la detección de ACP, obteniéndose picos más definidos (Figura IV.12 B).

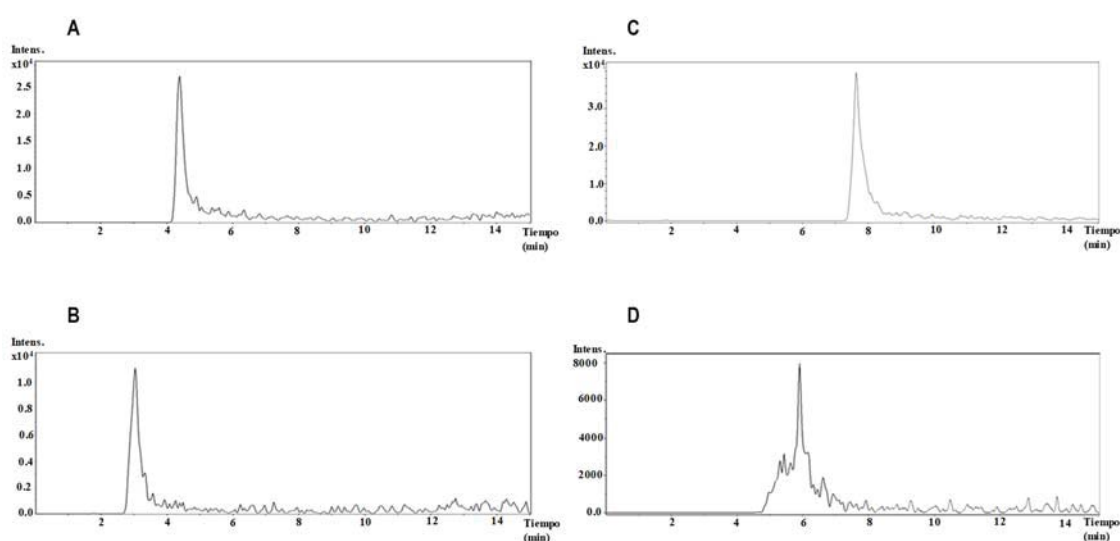


Figura IV.1. Cromatogramas de uHPLC-MS/MS correspondientes a: A) fase móvil A y 0,2 mL/min de velocidad de flujo; B) fase móvil B y 0,2 mL/min de velocidad de flujo, C) fase móvil A y 0,3 mL/min de velocidad de flujo y, D) fase móvil B y 0,3 mL/min de velocidad de flujo.

IV.2.2.2. Comparación del gradiente de la fase móvil

Con el fin de obtener una mejor resolución del pico cromatográfico se realizaron varias modificaciones en el gradiente de la fase móvil seleccionada (Tabla III.13). En primer lugar, se probaron las condiciones iniciales (gradiente 1) y la resolución de los picos no fue satisfactoria. Posteriormente se incrementó el porcentaje del eluyente B (metanol) al 50, 60 y 70 % (gradientes 2, 3 y 4) (Figura IV.13). Se observó que una mayor proporción del eluyente A (tampón ácido acético – 10 mM acetato amónico (pH 5,75)) afectaba negativamente a la forma y a la resolución del pico, de modo que se descartó el gradiente 2. A continuación, se evaluó un tiempo de gradiente más corto para que el eluyente B alcanzase el 95 % (de 0,4-11 a 0,4 min) (gradientes 5 y 6), observando

que al comenzar el aumento lineal del eluyente B en el 70 % (gradiente 6) originaba un pico con baja resolución, sin embargo, cuando el aumento del eluyente B comenzaba en el 60 %, se obtenía una mejor resolución del pico (Figura IV.2). Finalmente se evaluaron dos tiempos diferentes para que el eluyente B alcanzara el 95% (de 0,4 a 5 min y de 0,4 a 7 min) usando el 60% de metanol al comienzo del aumento lineal (gradientes 7 y 8). Los resultados mostraron que cuanto mayor fue el tiempo utilizado, mejor es la resolución de pico cromatográfico (gradiente 8; Figura IV.2). El uso de los gradientes 3, 7 y 8 mostraron las mejores resoluciones del pico, seleccionando, finalmente, el gradiente 3 debido a que se obtuvo el área de pico más alto.

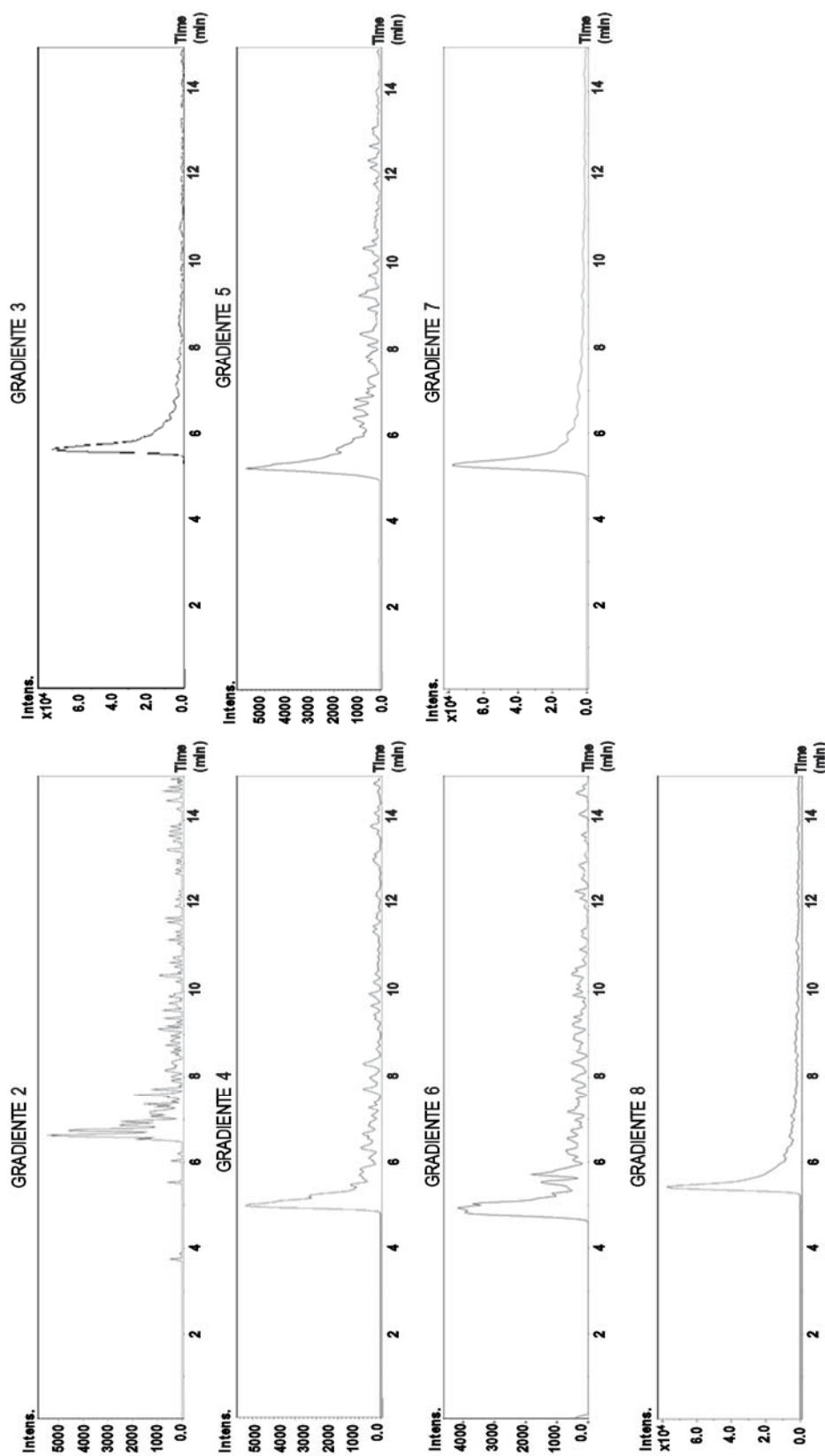


Figura IV.2. Cromatogramas correspondientes a los diferentes gradientes (gradiente 2-8) de la fase móvil compuesta por ácido-acetato amónico/metanol.

IV.2.2.3. Comparación de disolventes para la resuspensión de la muestra

En este caso, las muestras se disolvieron en 1 mL de tampón ácido acético – 10 mM acetato amónico (pH 5,75) /metanol 50/50, (v/v) y 30/70, (v/v), obteniendo los mejores resultados cuando las muestras se resuspendieron en este disolvente en proporción 30/70 (v/v).

IV.2.2.4. Parámetros de rendimiento del método

Finalmente, para evaluar el rendimiento del método, se prepararon ocho concentraciones en orden descendente de un patrón comercial de ACP (1000, 750, 500, 250, 150, 100, 50, 25, 10 ng/mL). Las curvas de calibración que relacionaron el área del pico cromatográfico y la concentración de cada uno de los patrones comerciales de ACP mostraron una $R^2 > 0,99$, y el LOD y LOQ obtenidos de la técnica fueron 18 y 56 ng / mL, respectivamente.

IV.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

A partir de las muestras de AEM inoculadas con 100 y 10 ng/g de ACP, se probaron cuatro métodos de extracción. En los dos primeros (métodos 1 y 2), se utilizó la clásica extracción líquido-líquido usando mezclas de cloroformo y acetonitrilo con agua; y los otros dos métodos (métodos 3 y 4) se basaron en la metodología QuEChERS; con la única diferencia que en el método 4 se usó la mitad de la cantidad de reactivos y disolventes que en el caso del método 3. Los resultados mostraron que se obtuvieron elevados porcentajes de recuperación en los 4 métodos de extracción ensayados (Tabla IV.4), no encontrando diferencias significativas después de analizar estadísticamente los datos obtenidos. Finalmente, el método 4 fue el método seleccionado debido a su simplicidad, rapidez y a que es más económico debido al menor consumo de solventes en comparación con los otros.

Tabla IV.4. Porcentajes de recuperación de ácido ciclopiazónico de las dos concentraciones inoculadas en AEM utilizando 4 métodos de extracción.

Métodos de Extracción	Recuperación (%) \pm Desviación estándar	
	10 ng/g inoculados	100 ng/g inoculados
Método 1	78,6 \pm 3,12	82,2 \pm 4,63
Método 2	79,9 \pm 2,15	83,2 \pm 3,44
Método 3	80,1 \pm 1,99	92,0 \pm 2,01
Método 4	80,1 \pm 2,10	91,6 \pm 0,95

Una vez seleccionado el método 4, se evaluó el efecto matriz en lonchas de jamón curado. Las recuperaciones medias fueron de 90,2 y 91,8% cuando las lonchas fueron inoculadas con 20 y 100 ppb de un patrón comercial del ACP.

IV.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Una estrategia que puede ser empleada para evitar el crecimiento de mohos productores de micotoxinas en los derivados cárnicos curado-madurados y la posterior producción de las mismas sería la utilización o manejo de las condiciones ambientales relacionadas con el procesado de estos productos que controlen el desarrollo de estos mohos indeseables en la superficie de los mismos. Para ello, se evaluó el efecto de diferentes temperaturas y a_w sobre el crecimiento, la expresión de los genes implicados en las rutas biosintéticas del ACP y las AFs y la producción de estos metabolitos secundarios producidos por cepas de mohos productoras de ACP (*P. griseofulvum*) y de AFs (*A. parasiticus* y *A. flavus*).

IV.3.1. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO DE *Penicillium griseofulvum* EN SISTEMAS MODELO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

En este estudio se evaluó el efecto de diferentes a_w en el crecimiento, la producción de ACP y la expresión relativa de los genes implicados en la ruta biosintética de esta micotoxina

producida en dos cepas de *P. griseofulvum* en sistemas modelo de carne y jamón curado durante 12 días a 25 °C.

IV.3.1.1. Efecto en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento

En la figura IV.3 se muestra el efecto a 25 °C de diferentes a_w en las fases de latencia y las velocidades de crecimiento de dos cepas de *P. griseofulvum* en los medios MBA y DHA. Tal y como se observa, el crecimiento de cada cepa fue similar en ambos medios de cultivo, así como el de las dos cepas en el mismo medio. En general, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las fases de latencia y las velocidades de crecimiento de ambas cepas cuando se comparó el comportamiento de una cepa en el mismo medio de cultivo a diferentes a_w , y cuando se comparó el comportamiento entre cepas en la misma a_w (Figura IV.3). El descenso de la a_w alargó la fase de latencia y disminuyó la velocidad de crecimiento, observándose que a una a_w de 0,85 ninguna de las dos cepas fue capaz de crecer durante los 12 días de incubación en ningún medio de cultivo a 25 °C. Aunque ambas cepas tenían fases de latencia similares, la cepa CECT 2919 creció más rápido que la cepa IBT 14319 en todas las condiciones analizadas.

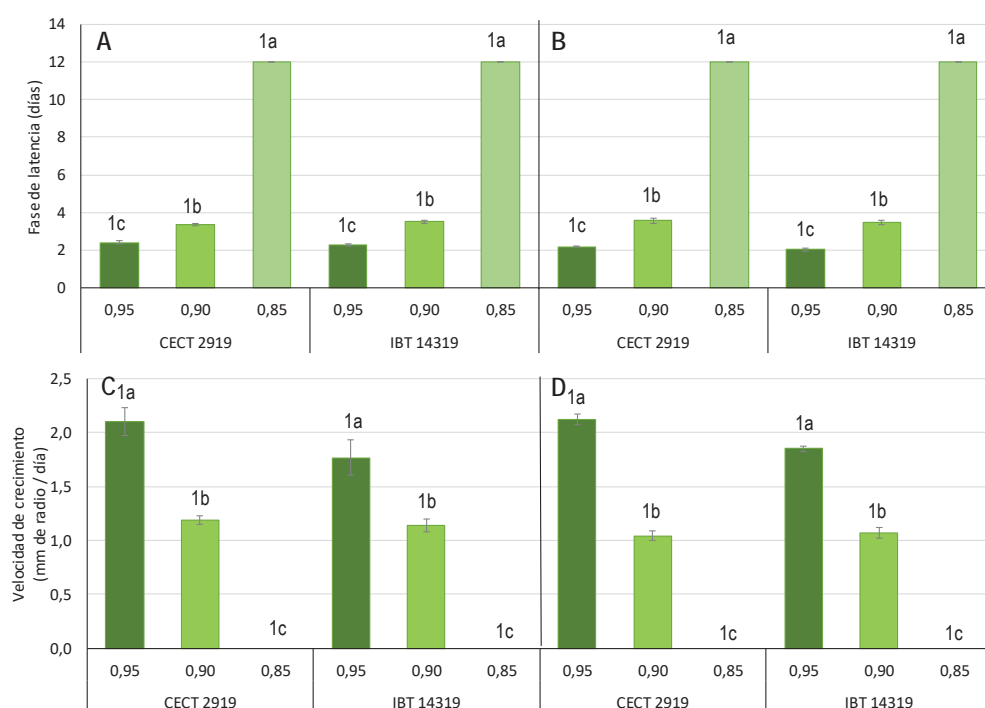


Figura IV.3. Efecto de la actividad del agua (a_w) en las fases de latencia (A, B) y las velocidades de crecimiento (C, D) de las cepas de *P. griseofulvum* (CECT 2919 e IBT 14319) en los medios elaborados con carne (MBA) (A, C) y jamón curado (DHA) (B, D) durante un período de incubación de 12 días a 25 °C. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios. Las diferencias significativas entre diferentes a_w se indican con diferentes letras ($p \leq 0,05$). Las diferencias significativas entre cepas en la misma a_w se indican con diferentes números ($p \leq 0,05$).

IV.3.1.2. Efecto en la producción de ácido ciclopiazónico

La Figura IV.4 muestra el efecto de diferentes a_w a 25 °C en la producción de ACP por las cepas de *P. griseofulvum* CECT 2919 e IBT 14319 a los 6 y 12 días de incubación en los medios MBA y DHA. En ambos medios de cultivo, la producción de ACP de las dos cepas de *P. griseofulvum* se vio afectada por el descenso de la a_w ($p \leq 0,05$), no produciéndose ACP en la a_w de 0,85. Además, se observó que la cepa IBT 14319 produjo una concentración de toxina mucho más alta que la cepa CECT 2919 en ambos medios de cultivo, aunque, en general, ambas cepas sintetizaron más toxina en el medio DHA que en el medio MBA. Se comprobó que en el medio DHA a una a_w de 0,95 ambas cepas produjeron las concentraciones más altas de ACP a los 6 días de crecimiento, mientras que, a los 12 días, la producción se redujo a la mitad ($p \leq 0,05$). Sin embargo, en el medio MBA a la misma a_w la producción de ACP fue máxima a los 12 días de incubación.

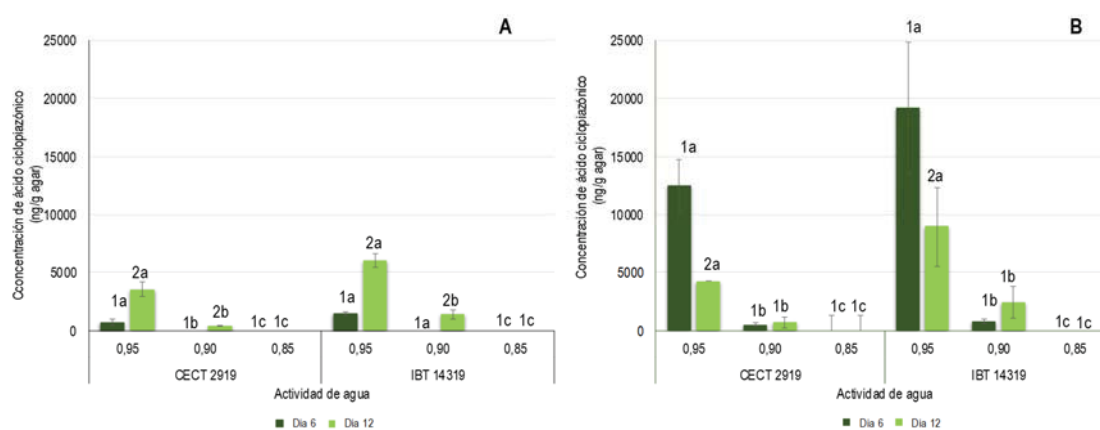


Figura IV.4. Efecto de la actividad del agua (a_w) en la producción de ácido ciclopiazónico (ACP) por las cepas de *P. griseofulvum* (CECT 2919 e IBT 14319) en los medios elaborados con carne (MBA) (A) y jamón curado (DHA) (B) durante un período de incubación de 12 días a 25 °C. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios. Las diferencias significativas entre los días de producción de ACP en la misma a_w se indican con diferentes números ($p \leq 0,05$). Las diferencias significativas entre a_w en el mismo día se indican con letras diferentes ($p \leq 0,05$).

IV.3.1.3. Efecto de la actividad de agua en la expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis del ácido ciclopiazónico producido por *P. griseofulvum*

La influencia de la a_w en la expresión temporal relativa de los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* de *P. griseofulvum* en el medio DHA se muestra en la Figura IV.5. En general, los tres genes mostraron diferentes perfiles de expresión relativa, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los niveles de transcripción en los diferentes días de muestreo. Con respecto a la expresión relativa del gen *dmaT*, se observaron perfiles de expresión similares cuando se

compararon las dos cepas a la mayor a_w , siendo los niveles de expresión menores que los del calibrador. En la a_w de 0,90, la expresión del gen *dmaT* de la cepa IBT 14319 fue estimulada observándose un pico de expresión máximo en el día 9 de incubación, sin embargo, en la cepa CECT 2919, la expresión de dicho gen fue inhibida. Por otro lado, se encontraron algunas pequeñas diferencias entre los patrones de expresión del gen *pks-nrps* cuando se comparó la misma cepa a diferentes a_w . La cepa IBT 14319, mostró una inhibición de la expresión génica en los diferentes tiempos de muestreo en ambas a_w , sin embargo, en el caso de la cepa CECT 2919, en la a_w de 0,95, la expresión del gen *pks-nrps* aumentó al final del tiempo de incubación, mientras que a a_w de 0,90 la mayor expresión de este gen fue en el día 9 de incubación. Finalmente, ambas cepas de *P. griseofulvum* mostraron diferentes perfiles de expresión relativa del gen *mfs-1* en las diferentes a_w analizadas, aunque en ambas cepas, hubo una represión del gen *mfs-1* durante todo el tiempo de incubación en la a_w de 0,95. Por el contrario, a la a_w de 0,90 ambas cepas mostraron bajos niveles de expresión del gen *mfs-1*, a excepción de la cepa CECT 2919 en los días 9 y 12 de incubación.

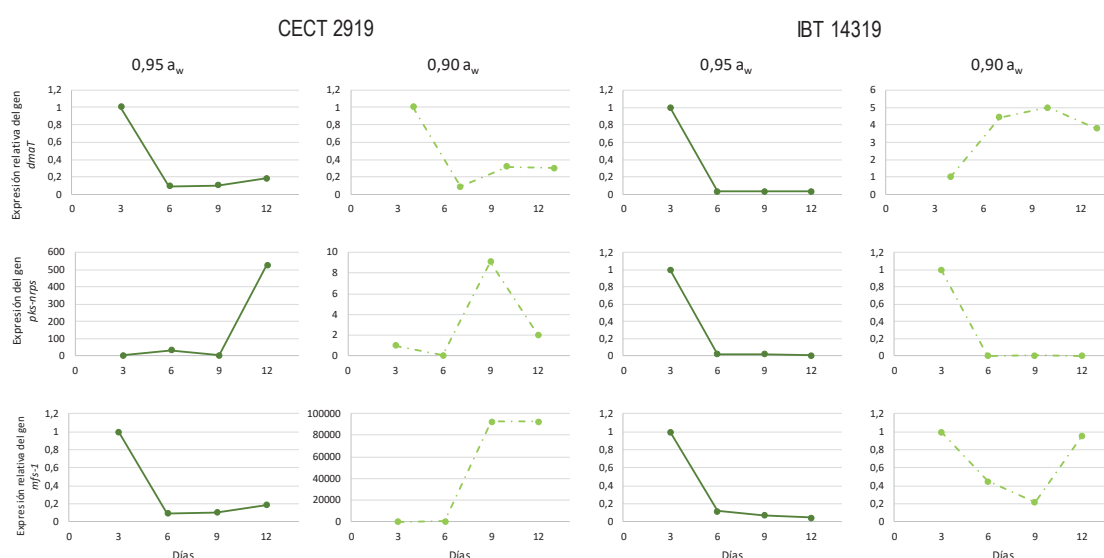


Figura IV.5. Efecto de la actividad de agua (0,95 y 0,90) en la expresión relativa de los genes *dmaT* (A, B), *pks-nrps* (C, D) y *mfs-1* (E, F) de *P. griseofulvum* en el medio de cultivo elaborado con jamón curado (DHA) durante un período de incubación de 12 días a 25 °C.

IV.3.2. EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS DE *Aspergillus flavus* Y *Aspergillus parasiticus*

En este estudio se evaluó la influencia de la a_w y la temperatura en la fase de latencia, la velocidad de crecimiento, la producción de AFs y la expresión relativa de los genes asociados con la síntesis de estas micotoxinas producidas por dos cepas de *A. parasiticus* y dos cepas de *A. flavus* en sistemas modelo de carne y jamón curado durante 12 días.

IV.3.2.1. Selección de cepas aflatoxigénicas

En primer lugar, se realizó un ensayo inicial utilizando las cuatro cepas con el fin de evaluar similitudes y diferencias en los patrones de crecimiento y producción de AFB₁ de las mismas en medios de cultivo elaborados con derivados cárnicos curado-madurados en las tres condiciones de a_w evaluadas (0,95, 0,90 y 0,85) a una temperatura de 25 °C.

La Figura IV.6 muestra el efecto de diferentes a_w (0,95, 0,90 y 0,85) a 25 °C en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de las dos cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus* en medios MBA y DHA. Los valores de la fase de latencia y de velocidad de crecimiento oscilaron entre 0,19 y 3,6 días y entre 0,8 y 5,9 mm/día, respectivamente, dependiendo principalmente de la a_w evaluada. Se observó que, en general, el comportamiento de las cuatro cepas aflatoxigénicas fue similar en relación al crecimiento en el medio de cultivo y cuando se comparó la misma cepa entre ambos medios de cultivo. Tal y como se observa en la figura IV.6, las fases de latencia se alargaron y las velocidades de crecimiento se ralentizaron a medida que disminuía la a_w , tanto en el medio MBA como en el medio DHA a 25 °C.

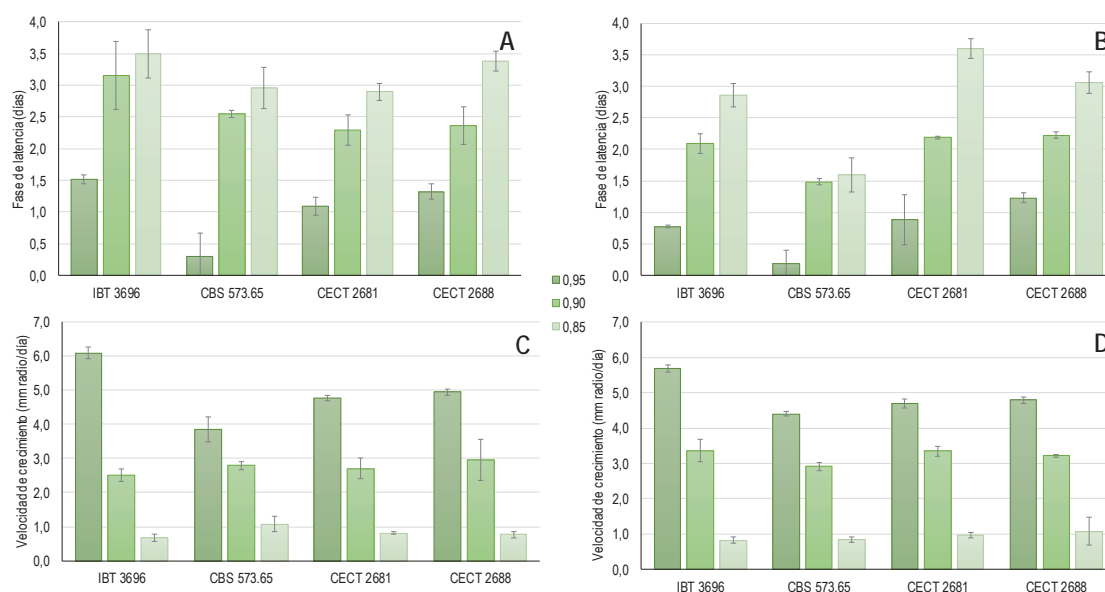


Figura IV.6. Efecto de la actividad del agua (0,95, 0,90 y 0,85) en las fases de latencia (A, B) y las velocidades de crecimiento (C, D) de las cepas de *A. flavus* IBT 3696, CBS 573.65 y *A. parasiticus* CECT 2681, CECT 2688 en medio elaborado con carne (MBA) (A, C) y medio elaborado con jamón curado (DHA) (B, D) durante un periodo de incubación de 12 días a 25 °C. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios.

Con respecto a la producción de AFB₁, en las Tablas IV.5 y IV.6 se recogen las concentraciones de AFB₁ de las cepas de *A. flavus* y de *A. parasiticus* evaluadas cada 2 días durante un periodo de incubación de 12 días a 25 °C en los medios MBA y DHA respectivamente, en tres a_w diferentes (0,95, 0,90 y 0,85). Se puede observar que todas las cepas comenzaron a producir esta micotoxina a partir del cuarto día de incubación en las tres a_w evaluadas, excepto en el caso de la cepa *A. parasiticus* CECT 2688 que no sintetizó esta micotoxina hasta el día 8 de incubación en el medio DHA con una a_w de 0,85 (Tabla IV.5). En ambos medios de cultivo, la cepa *A. flavus* CBS 573.65 produjo mayor concentración de AFB₁ que las otras tres cepas en todas las a_w evaluadas. Cabe destacar que al final del tiempo de incubación, los valores de producción de la toxina varían desde 4,2 µg/g hasta 2069,2 µg/g en función de la cepa, la a_w y el medio de cultivo analizado. la producción de AFG₁ de las cepas de *A. parasiticus* evaluadas cada dos días durante un periodo de incubación de 12 días a 25 °C en los medios MBA y DHA se muestran en la tabla IV.7 Ambas cepas produjeron mayor cantidad de AFG₁ en el medio DHA que en MBA.

Tabla IV.5. Concentración de aflatoxina B₁ (ng/g) de las cepas *A. flavus* IBT 3696 y CBS 573.65 y *A. parasiticus* CECT 2681 y CECT 2688 a lo largo del periodo de incubación de 12 días en el medio elaborado con carne (MBA) con tres actividades de agua (a_w) diferentes (0,95, 0,90 y 0,85).

Cepas	a _w	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<i>A. flavus</i> IBT 3696	0,95	< LOD ^a	295,5 ± 69,9	391,5 ± 72,5	498,3 ± 130,7	638,2 ± 172,8	632,5 ± 156,9
	0,90	< LOD ^a	105,4 ± 49,3	157,3 ± 99,3	103,3 ± 28	179,7 ± 136,7	164,7 ± 9,7
	0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	< LOD ^a	0,6 ± 1,1	5,8 ± 10,1	4,2 ± 3,3
<i>A. flavus</i> CBS 573.65	0,95	432,6 ± 178,8	500,8 ± 137,9	795,7 ± 312,5	1007,2 ± 319,4	1098,7 ± 157,8	1735,2 ± 502,2
	0,90	< LOD ^a	514,6 ± 346,8	867,3 ± 50,4	1030,8 ± 201,8	1170,8 ± 169,2	2069,2 ± 442,8
	0,85	< LOD ^a	31,2 ± 16,4	589,1 ± 199,3	634,6 ± 324	1854,7 ± 69,4	1947 ± 463,5
<i>A. parasiticus</i> CECT 2981	0,95	218,5 ± 153,4	316,6 ± 89,7	521,9 ± 70,5	586,06 ± 137,1	789,6 ± 79,8	741,4 ± 287,5
	0,90	< LOD ^a	127,1 ± 60,9	262,5 ± 68,1	251 ± 47,5	611,7 ± 234,1	475,2 ± 96,7
	0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	10,7 ± 1,4	53,5 ± 67,1	25,5 ± 20,8	383,3 ± 78,8
<i>A. parasiticus</i> CECT 2988	0,95	133,1 ± 39,1	180,1 ± 66,3	263,4 ± 95,1	337,7 ± 78,9	382,5 ± 169,6	341,2 ± 22,1
	0,90	< LOD ^a	157,8 ± 63,5	151,9 ± 77,3	223,7 ± 27,2	241,6 ± 80,9	232,2 ± 116,7
	0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	< LOD ^a	58,3 ± 32	57,5 ± 9,9	197,4 ± 58,4

^aLOD: Límite de detección.

Tabla IV.6. Concentración de aflatoxina B₁ (ng/g) de las cepas *A. flavus* IBT 3696 y CBS 573.65 y *A. parasiticus* CECT 2681 y CECT 2688 a lo largo del periodo de incubación de 12 días en el medio elaborado con jamón curado (DHA) con tres actividades de agua (a_w) diferentes (0,95, 0,90 y 0,85).

CEPAS	a _w	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<i>A. flavus</i> IBT 3696	0,95	535,3 ± 36,7	403,1 ± 58,1	525,3 ± 80,2	683,02 ± 58,7	750,3 ± 355,7	769,6 ± 84,3
	0,90	< LOD ^a	491,8 ± 87,6	301,3 ± 98,2	539,8 ± 127,9	624,9 ± 254,8	757,2 ± 94,8
	0,85	< LOD ^a	5,8 ± 10,1	178,6 ± 161,5	222,2 ± 51,6	281,3 ± 127,1	641,8 ± 475,5
<i>A. flavus</i> CBS 573.65	0,95	586,2 ± 154,9	606,1 ± 115,7	702,5 ± 57,9	760,1 ± 316,3	1140,8 ± 413,1	1679,7 ± 951
	0,90	< LOD ^a	361,3 ± 301,6	465,8 ± 90,3	638,2 ± 186,9	1092,3 ± 588,2	1257,2 ± 300,1
	0,85	< LOD ^a	140,9 ± 171,4	541,2 ± 181,1	1118,6 ± 299,2	1100,5 ± 544,5	1970,5 ± 474,5
<i>A. parasiticus</i> CECT 2981	0,95	346,2 ± 231,6	301,4 ± 209,6	432,9 ± 139,7	615,4 ± 34,7	666,7 ± 99,9	772,5 ± 75,3
	0,90	< LOD ^a	630,4 ± 275,5	249,1 ± 15,1	286,8 ± 86,7	363,05 ± 9,03	391,8 ± 51,2
	0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	9,5 ± 4,7	236,1 ± 107,9	227,4 ± 89,9	442,02 ± 88,6
<i>A. parasiticus</i> CECT 2988	0,95	21,4 ± 18,8	184,2 ± 92	202,1 ± 61,2	340,5 ± 49,4	368,2 ± 97,9	453 ± 118,9
	0,90	< LOD ^a	242,3 ± 52,5	226,1 ± 103,3	317,8 ± 87,7	349,4 ± 114,7	388,3 ± 88,7
	0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	< LOD ^a	73,6 ± 26,1	299,1 ± 92,5	555,9 ± 253,1

^aLOD: Límite de detección.

Tabla IV.7. Concentración de aflatoxina G₁ (ng/g) de las cepas *A. parasiticus* CECT 2681 y CECT 2688 a lo largo del periodo de incubación de 12 días en el medio elaborado con carne (MBA) y con jamón curado (DHA) con tres actividades de agua (a_w) diferentes (0,95, 0,90 y 0,85).

CEPAS	Medio de cultivo	a _w	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12
<i>A. parasiticus</i> CECT 2981	MBA	0,95	148,1 ± 57,4	932,6 ± 47	1383,3 ± 374,1	1795,5 ± 432,5	2000,3 ± 555,7	1875,2 ± 362,4
		0,90	< LOD ^a	393,2 ± 196,1	1550,1 ± 492,3	1412,5 ± 315,7	2014,5 ± 1242,7	2381,4 ± 546,4
		0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	4,6 ± 9,04	83,1 ± 71	339,9 ± 288,3	1782,9 ± 480,5
	DHA	0,95	279,8 ± 234,1	600,3 ± 483,1	897,7 ± 298	1540,6 ± 565,9	1883,1 ± 333,4	2024,4 ± 207,5
		0,90	< LOD ^a	801,7 ± 144,8	838,7 ± 324,6	1256,6 ± 271,5	1900,4 ± 387,2	1679,6 ± 66,5
		0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	4,8 ± 2,3	1314,3 ± 443,9	1883,8 ± 899,5	3188,2 ± 1025
<i>A. parasiticus</i> CECT 2988	MBA	0,95	78,9 ± 67,1	1599 ± 633,7	1661,5 ± 346,6	1912,9 ± 416,1	2188,3 ± 712,9	1879,9 ± 620,5
		0,90	< LOD ^a	1232,5 ± 470,9	1785,4 ± 247,1	1323,3 ± 566,6	1949,9 ± 316,9	2228,1 ± 805,3
		0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	34,6 ± 15,3	928,3 ± 97,6	667 ± 133,6	1224,7 ± 303,6
	DHA	0,95	7,6 ± 1,3	884,7 ± 483,8	915,4 ± 56,6	1615,9 ± 268,6	1732,4 ± 699,3	2060,7 ± 258,6
		0,90	< LOD ^a	1377,3 ± 772,1	1535,2 ± 386,6	2475,5 ± 293,3	1850,6 ± 676,8	1671,8 ± 327,8
		0,85	< LOD ^a	< LOD ^a	< LOD ^a	1176,9 ± 218,8	3944,6 ± 731,8	4054,1 ± 1014,7

^aLOD: Límite de detección.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio inicial, se seleccionaron las cepas *A. parasiticus* CECT 2688 y *A. flavus* CBS 573.65 para examinar con detalle la influencia de la a_w (0,95, 0,90 y 0,85) y la temperatura (25, 20, 15 y 10 °C) sobre el crecimiento de *A. parasiticus* y *A. flavus* y su producción de AFs en los medios MBA y DHA. Los criterios de selección se basaron en la elección de una cepa de cada especie para estudiar las diferencias entre especies y la existencia de diferentes perfiles de crecimiento y producción de AFs entre las dos cepas seleccionadas.

IV.3.2.2. Efecto de la actividad de agua y temperatura en el crecimiento de *A. parasiticus* y *A. flavus* y su producción de aflatoxinas

*IV.3.2.2.1. Efecto en la fase de latencia de *A. parasiticus* y *A. flavus**

La Figura IV.7 muestra el efecto de diferentes a_w y temperaturas en la fase de latencia de las cepas *A. parasiticus* CECT 2688 y *A. flavus* CBS 573.65 en los medios MBA y DHA durante 12 días de incubación. Ninguna de las dos cepas fue capaz de crecer a 10 °C, independientemente de la a_w. En general, a medida que disminuían los valores de la a_w y la temperatura las fases de

latencia se alargaban, mostrando *A. flavus* fases de latencia más cortas que *A. parasiticus* en todas las condiciones evaluadas ($p \leq 0,05$). Además, se observó que las fases de latencia de *A. parasiticus* fueron bastante similares en todas las condiciones probadas, siendo este valor menor cuando la cepa se incubó a 25 °C y a_w de 0,95. Sin embargo, *A. flavus* mostró fases de latencia más largas a a_w de 0,90.

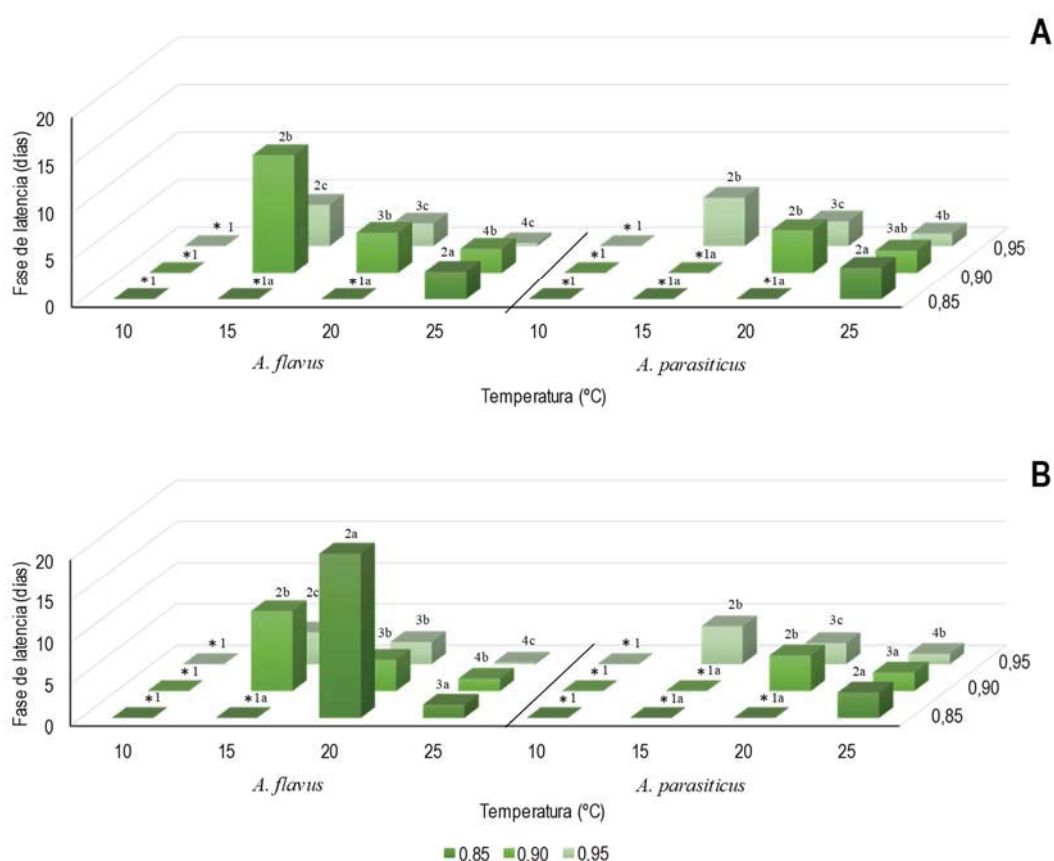


Figura IV.7. Efecto de la interacción de la actividad del agua y la temperatura en las fases de latencia de *A. parasiticus* CECT 2688 y *A. flavus* CBS 573.65 en el medio elaborado con carne (MBA) (A) y en el medio elaborado con jamón curado (DHA) (B) durante un período de incubación de 12 días. Los * indican las condiciones en que la fase de latencia fue más larga que la duración del experimento. Las diferencias significativas entre los valores medios de la a_w a diferentes temperaturas se indican con letras diferentes ($p \leq 0,05$). Las diferencias significativas entre los valores medios de la temperatura a diferente a_w se indican con números diferentes ($p \leq 0,05$).

IV.3.2.2.2. Efecto en la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* y *A. flavus*

Respecto al efecto de la a_w y la temperatura en la velocidad de crecimiento de las dos especies aflatoxigénicas, se observó que en las temperaturas más altas (20 y 25 °C), *A. parasiticus* creció más rápido que *A. flavus*, sin embargo, cuando la temperatura era inferior a 20 °C el crecimiento de *A. parasiticus* fue más lento en ambos medios de cultivo (Figura IV.8).

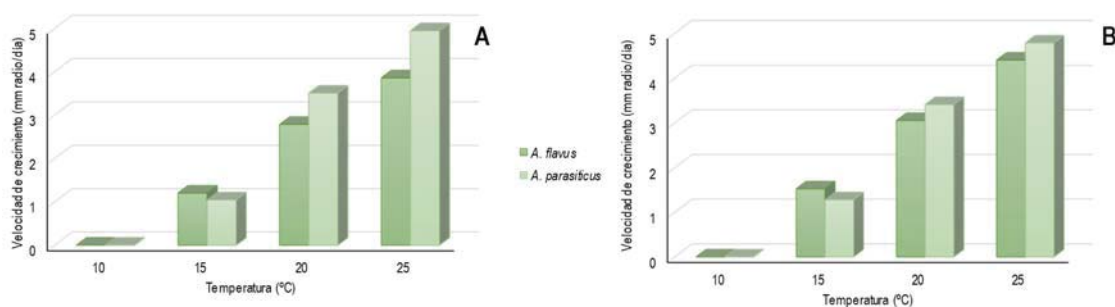


Figura IV.8. Efecto de la temperatura en las velocidades de crecimiento de *A. parasiticus* CECT 2688 y *A. flavus* CBS 573.65 en los medios elaborados con carne (MBA) (A) y con jamón curado (DHA)(B) con una actividad de agua de 0,95 durante un período de incubación de 12 días.

En la figura IV.9 se muestran los mapas de contorno que representan las velocidades de crecimiento de ambas cepas a diferentes a_w y temperaturas en ambos medios de cultivo. En general, la velocidad de crecimiento de las dos cepas fue similar en los dos medios de cultivo, siendo ligeramente superior en el caso de *A. flavus* independientemente de la temperatura y a_w evaluada. El crecimiento óptimo de las dos cepas se obtuvo a a_w de 0,95 y 25 °C, mientras que las condiciones limitantes de crecimiento fueron cercanas a a_w de 0,90 y 15 °C (Figuras IV.8. y IV.9).

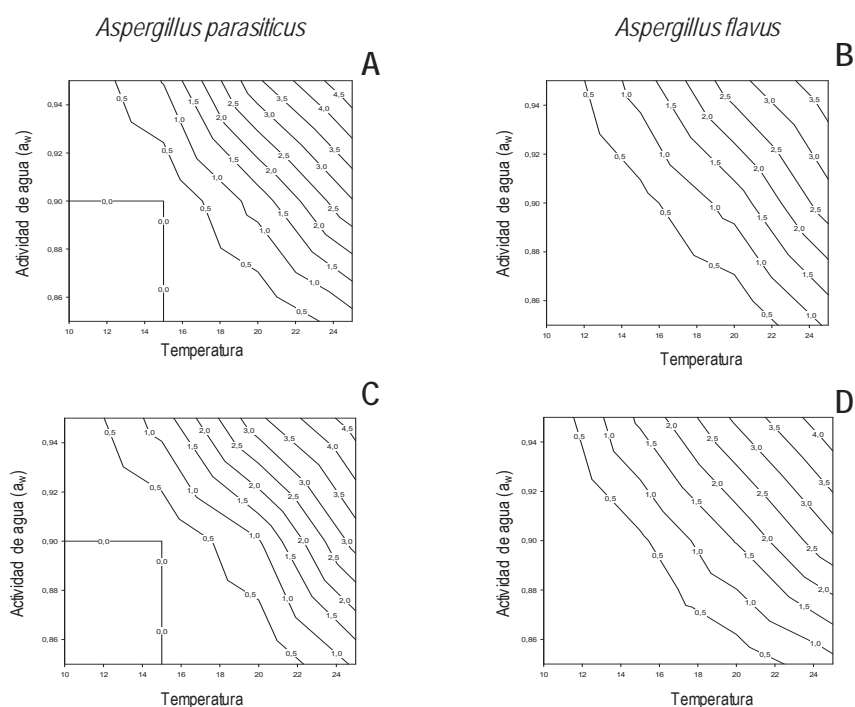


Figura IV.9. Mapas de contorno bidimensionales de las cepas *A. parasiticus* CECT 2688 (A, C) y *A. flavus* CBS 573.65 (B, D) en los medios de cultivo elaborados con carne (MBA) (A, B) y jamón curado (DHA) (C, D), en relación con la actividad de agua y la temperatura. Los números representan la velocidad de crecimiento (mm / día) de las cepas en diferentes condiciones de a_w y temperaturas. Solo se representó un mapa de contorno para cada cepa debido a la similitud de los mapas obtenidos en los dos medios de cultivo.

IV.3.2.2.3. Efecto en la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* y *A. flavus*

La Figura IV.10 muestra el efecto de la interacción de la a_w y la temperatura en la producción de AFB₁ y AFG₁ producida por ambas cepas a los días 8 y 10 de incubación en los medios MBA y DHA. Ambas cepas aflatoxigénicas mostraron perfiles de producción de AFB₁ similares en el medio DHA; sin embargo, *A. flavus* sintetizó mayor cantidad de esta toxina que *A. parasiticus*. En este medio de cultivo, la producción de AFs se vio afectada por la temperatura y por la interacción a_w y temperatura (Figura IV.10). En el medio MBA, *A. flavus* produjo mayores cantidades de AFB₁ que las obtenidas en el medio DHA, y, de igual modo, también sintetizó mayores cantidades que *A. parasiticus*. En este caso, la producción de micotoxinas se vio afectada por los dos factores ambientales estudiados (a_w y temperatura) y sus interacciones (Figura IV.10). Con respecto a la producción de AFG₁ por *A. parasiticus*, en general, se observó que esta cepa sintetizó más toxina cuando la a_w era más alta (a_w 0,95) en todas las temperaturas ensayadas, y también cuando la cepa se incubó a 25 °C a todas las a_w evaluadas. En general, ambas cepas produjeron toxinas en ambos medios cuando la temperatura y la a_w fueron ≥ 15 °C y $\geq 0,90$, respectivamente.

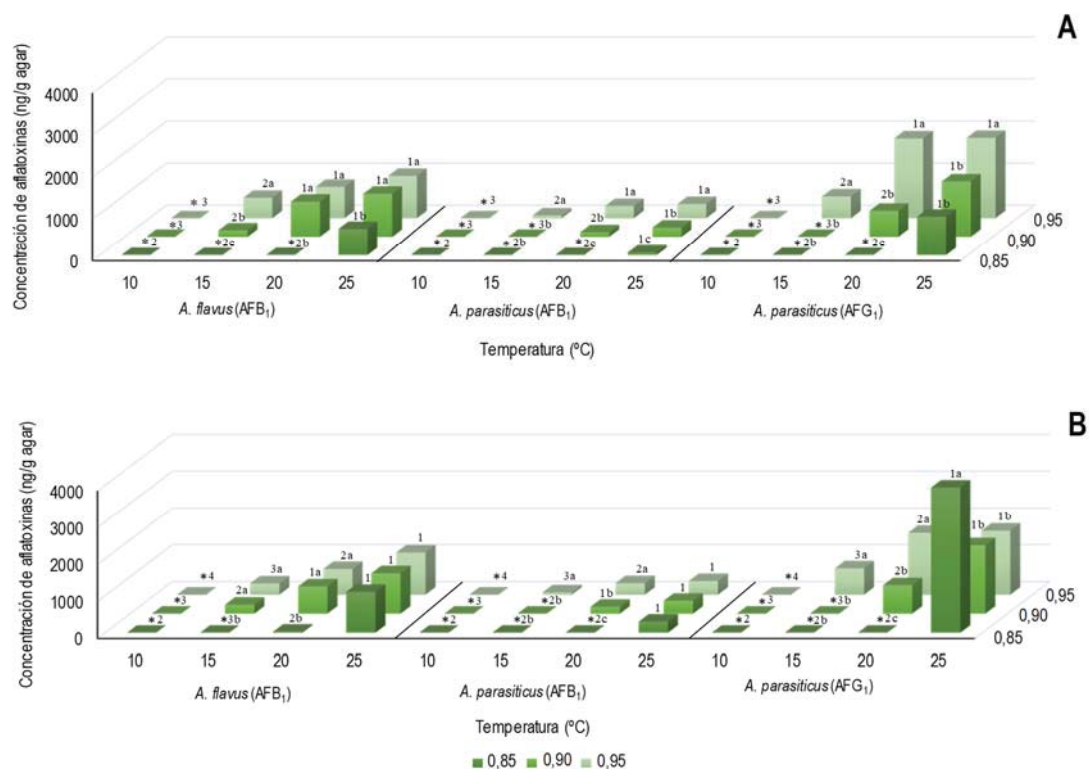


Figura IV.10. Efecto de la actividad del agua y la temperatura en la producción de AFB₁ y AFG₁ por las cepas *A. parasiticus* CECT 2688 y *A. flavus* CBS 573.65 en los medios elaborados con carne (MBA) (A) y con jamón curado (DHA) (B) con actividades de agua (a_w) de 0,95, 0,90 y 0,85 e incubados a 25, 20, 15 y 10 °C a los días 8 y 10 de incubación, respectivamente. Los * indican las condiciones en las que no hubo producción de aflatoxinas. Las diferencias significativas entre los valores medios de a_w a diferentes temperaturas se indican con letras diferentes ($p \leq 0,05$). Las diferencias significativas entre los valores medios de la temperatura a diferente a_w se indican con diferentes números ($p \leq 0,05$).

IV.3.2.3. Efecto de la actividad de agua y la temperatura en la expresión relativa de los genes implicados en la ruta biosintética de aflatoxinas

IV.3.2.3.1. Efecto de las condiciones ambientales en la expresión génica relativa de *A. flavus*

La Figura IV.11 muestra el efecto de diferentes a_w y temperaturas en la expresión temporal relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* asociados con la síntesis de AFB₁ producida por *A. flavus* en el medio DHA durante un periodo de incubación de 12 días. Los dos genes reguladores (*afR* y *afS*) mostraron perfiles de expresión génica similares en todas las temperaturas evaluadas donde hubo crecimiento fúngico. Los valores de expresión más altos se observaron en los primeros días de incubación (días 3 y 6) en las condiciones con la a_w más elevada (0,95) y las tres temperaturas analizadas; con una disminución de los niveles de expresión en los siguientes días. A las temperaturas de 20 y 25 °C y una a_w de 0,90, los niveles de transcripción de los genes *afR* y *afS* se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo; sin embargo, en la a_w de 0,85 se observó un

aumento de la expresión de estos genes, siendo los niveles de expresión del gen *affS* mayores que los del gen *affR*. La expresión máxima de los genes *affR* y *affS* se observó al final del tiempo de incubación en las condiciones experimentales de 20 °C y a_w 0,85 y 15 °C y a_w 0,90, respectivamente ($p \leq 0,05$). En general, se observó que la disminución de la a_w , independientemente de la temperatura, provocó un aumento de la expresión de los genes *affR* y *affS*, especialmente al final del período de incubación. Con respecto al estudio temporal de la expresión relativa del gen *affP*, los perfiles de expresión fueron distintos a los obtenidos con los genes reguladores, obteniéndose los valores más altos cuando los valores de las condiciones ambientales fueron más bajos. La expresión del gen *affP* se estimuló a a_w 0,85 y 20 °C y a_w 0,90 y 15 °C en el día 12 de incubación, mientras que a 25 °C el valor máximo de expresión de este gen se observó a a_w 0,90 en el día 6 de incubación.

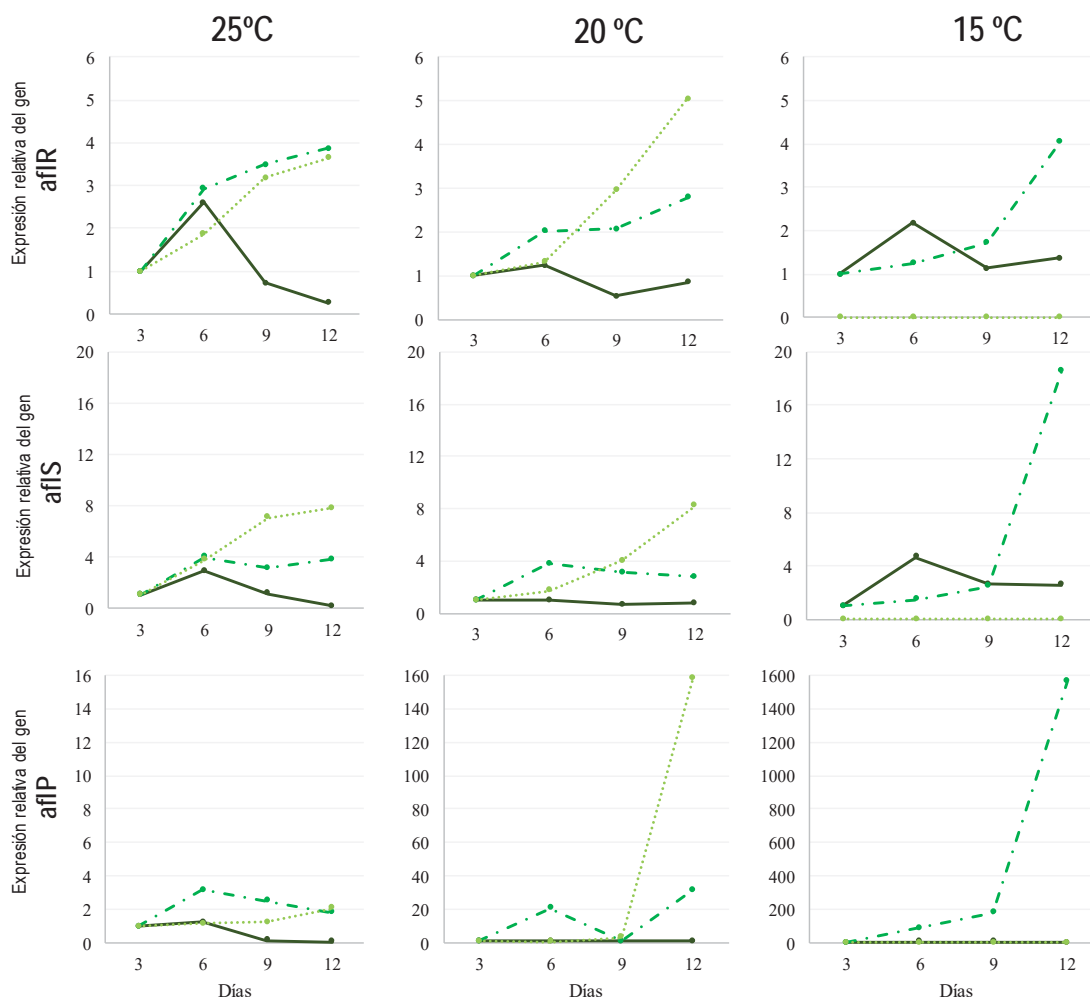


Figura IV.11. Efecto de la actividad de agua de 0,95 (—), 0,90 (- -) y 0,85 (.....) en la expresión relativa de los genes *afIR*, *afIS* y *afIP* de *A. flavus* en los medios de cultivo elaborados con jamón curado (DHA) incubados a 25, 20 y 15 °C durante un período de 12 días.

En la Figura IV.12 se muestran los mapas de contorno que representan el efecto de la interacción de diferentes condiciones de a_w y temperaturas en la expresión relativa de los genes *afIR*, *afIS* y *afIP* implicados en la biosíntesis de AFs por *A. flavus* en el medio DHA en el día 9 de crecimiento. En general, la expresión relativa de los genes reguladores *afIR* y *afIS* se vio muy afectada por la temperatura, observándose patrones similares, sin embargo, a temperaturas > 18 °C y $a_w \geq 0,90$, la expresión del gen *afIS* estuvo influenciada principalmente por la a_w . El perfil de la expresión del gen estructural *afIP* fue muy diferente a la de los genes reguladores, mostrando valores de expresión relativa más altos que los obtenidos en los genes *afIR* y *afIS* y viéndose afectada tanto por la temperatura y la a_w , como por la interacción de ambos parámetros. Los niveles de expresión más altos de dicho gen se observaron en la a_w 0,90 y 15 °C.

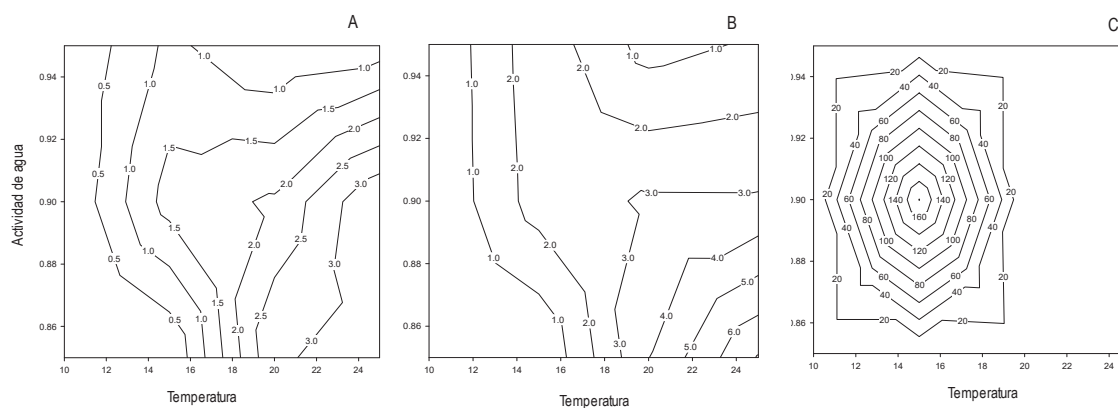


Figura IV.12. Mapas de contornos bidimensionales de la expresión relativa de los genes *afR* (A), *afS* (B) y *afP* (C) de *A. flavus* en un medio elaborado con jamón curado (DHA) en relación con los valores de actividad de agua y temperatura en el día 9 de crecimiento.

IV.3.2.3.2. Efecto de las condiciones ambientales en la expresión génica relativa de *A. parasiticus*

El efecto de diferentes a_w y temperaturas en la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* de *A. parasiticus* en el medio DHA a lo largo de todo el periodo de incubación se muestran en la Figura IV.13. Aunque se encontraron pequeñas diferencias entre los perfiles de expresión de los dos genes reguladores (*afR* y *afS*), estos eran en general bastante similares. En general, los niveles de expresión más altos y más bajos se encontraron en las a_w más alta y más baja, respectivamente (Figura IV.13). Es destacable que a 20 °C, la expresión relativa de los dos genes reguladores se vio estimulada en la a_w de 0,95 al final del periodo de incubación, mientras que, a 25 y 15 °C y a esta misma a_w , el aumento significativo de los niveles de expresión ocurrió a los 6 días de incubación. Con respecto al estudio temporal de la expresión relativa del gen *afP*, se observó un perfil de expresión muy diferente al perfil mostrado por los genes reguladores cuando se incubaron a 25 y 20 °C, con un aumento de los niveles de expresión en la a_w intermedia evaluada (0,90). La expresión más alta encontrada de este gen estructural se detectó siempre a los 6 y 9 días dependiendo de las condiciones de temperatura y a_w evaluadas.

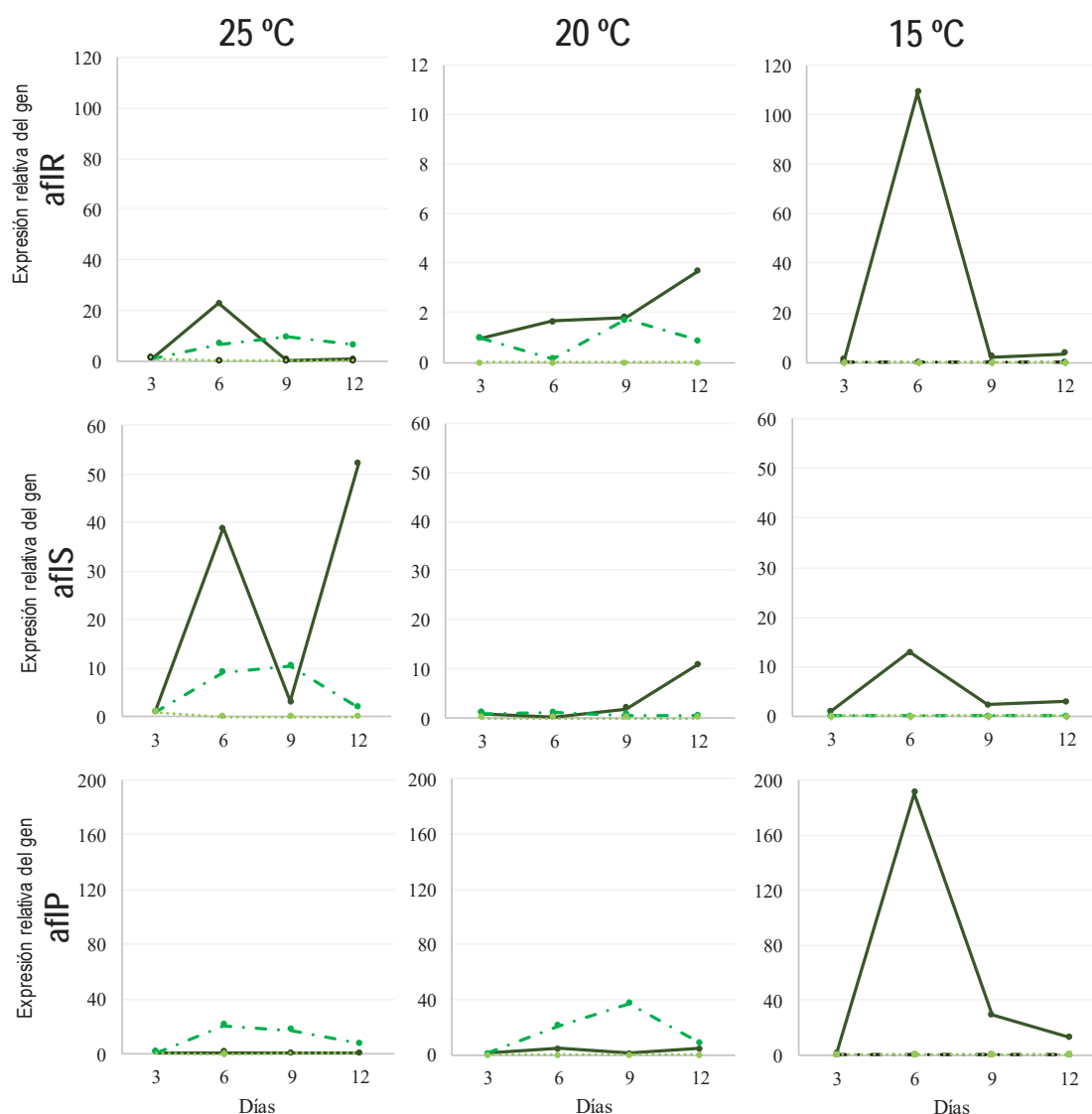


Figura IV.13. Efecto de la actividad de agua 0,95 (—), 0,90 (- -) y 0,85 (.....) en la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* de *A. parasiticus* en los medios de cultivo elaborados con jamón curado (DHA) a 25, 20 y 15 °C durante un período de incubación de 12 días.

En la figura IV.14 se muestran los diferentes mapas de contorno que representan la influencia de diferentes a_w y temperaturas en la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* de *A. parasiticus* en el medio de cultivo elaborado con jamón curado en el día 9 de crecimiento. Esta cepa no mostró expresión de los tres genes asociados con la síntesis de AFs a una $a_w \leq 0,90$ y a una temperatura ≤ 15 °C. Los genes reguladores *afR* y *afS* mostraron perfiles de expresión relativa muy similares. Se observó que a temperaturas inferiores a 20 °C, la expresión de ambos genes se vio afectada tanto por la temperatura y la a_w como por la interacción de ambos parámetros. La expresión del gen estructural *afP*, mucho más alta que la expresión de los genes *afR* y *afS*, también se vio afectada por los factores ambientales evaluados.

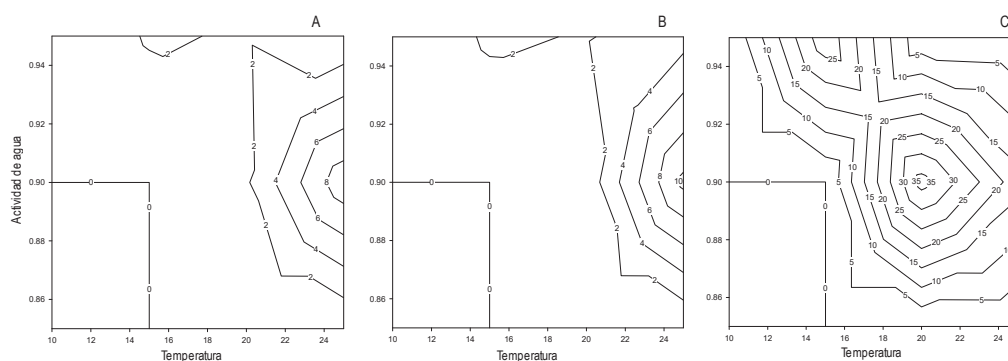


Figura IV.14. Mapas de contornos bidimensionales de la expresión relativa de los genes *afR* (A), *afS* (B) y *afP* (C) de *A. parasiticus* en el medio elaborado con jamón curado (DHA) en relación con la actividad de agua y la temperatura en el día 9 de crecimiento.

IV.3.2.4. CORRELACIONES ENTRE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS Y LA EXPRESIÓN RELATIVA TEMPORAL DE LOS GENES BIOSINTÉTICOS

Los resultados del análisis de componentes principales (PCA) se presentan como biplots, donde se incluye la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* en el día 9 de incubación en combinación con las cantidades de AFB₁ producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* y AFG₁ de *A. parasiticus* en los medios DHA después de 10 días de incubación (Figuras IV.15 y IV.16). Estas representaciones biplots mostraron tanto la distribución de las muestras en las dos dimensiones descriptivas de los datos como en las variables que abarcan estas dos direcciones, el eje Y muestra el componente 1 y el eje X muestra el componente 2. En el caso de *A. flavus* (Figura IV.15), el componente 1 describe el 56,6% de la variabilidad y el componente 2 describe el 26,6% adicional de la variabilidad original de los datos. El PCA de *A. flavus* muestra una relación clara entre la concentración de AFB₁ y la expresión relativa temporal de los genes *afR* y *afS*, mientras que esta relación fue menor con la expresión relativa del gen *afP*. El PCA de *A. parasiticus* se puede observar en la Figura IV.16 donde se muestra que el componente 1 describe el 42,2% de la variabilidad y el componente 2 describe el 41,1% adicional de la variabilidad original de los datos. A partir de los resultados obtenidos es evidente que la expresión relativa de los genes *afR* y *afS*, así como las cantidades de AFB₁ y AFG₁ se correlacionaron; sin embargo, no se observó relación entre la expresión del gen *afP* y las cantidades de AFs producida por *A. parasiticus*.

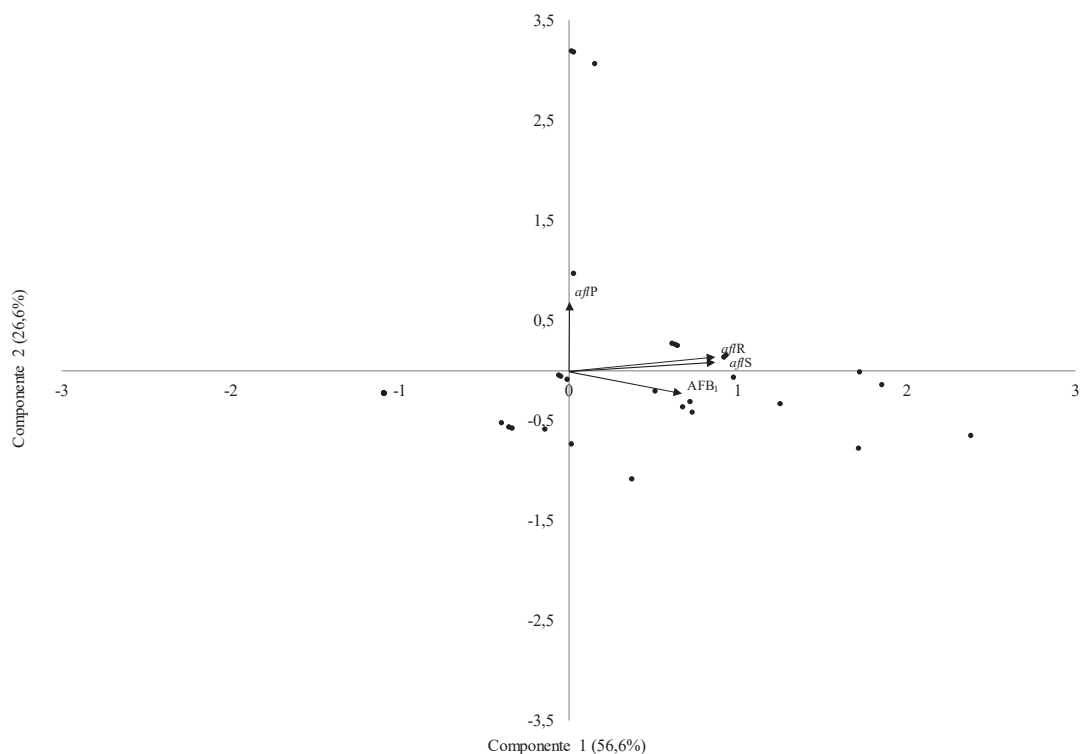


Figura IV.15. Representación Biplot del análisis de componentes principales de la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* en el día 9 de incubación y la concentración de AFB₁ producida por *A. flavus* en el día 10 de crecimiento en el medio elaborado con jamón curado (DHA).

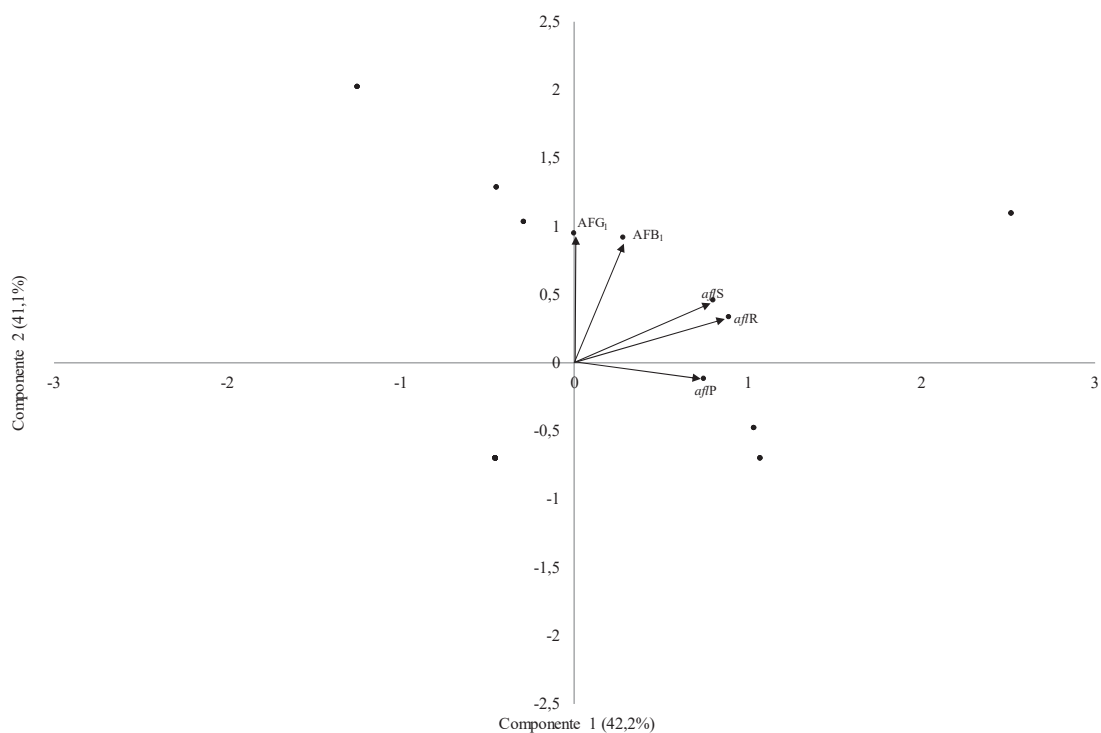


Figura IV.16. Representación Biplot del análisis de componentes principales de la expresión relativa de los genes *afR*, *afS* y *afP* en el día 9 de incubación y la concentración de AFB₁ y AFG₁ producida por *A. parasiticus* en el día 10 de incubación en el medio elaborado con jamón curado (DHA).

IV.4. PREDICCIÓN DE MICOTOXINAS

Se aplicaron dos técnicas predictivas de minería de datos, RLM y RI, a partir de los datos obtenidos en la sección IV.3.2 de crecimiento y producción de AFB₁ de *A. flavus* y *A. parasiticus* y AFG₁ de *A. parasiticus* en diferentes condiciones de a_w y temperaturas en los medios MBA y DHA, con el fin de obtener ecuaciones que permitan la predicción de la cantidad de AFs en un tiempo concreto, así como del momento en que se inicia la síntesis de AFs en condiciones similares a las alcanzadas durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos curado-madurados.

Los valores de R de las ecuaciones para predecir las cantidades de AFs producidas por las dos especies aflatoxigénicas se muestran en la Tabla IV.8 cuando se aplicaron las técnicas RLM y RI. Se observó que los valores de R de AFB₁ y AFG₁ son superiores cuando se aplica RLM en comparación con RI, siendo mayores a 0,55 en todos los casos.

Tabla IV.8. Coeficientes de correlación (R) obtenidos de las ecuaciones de predicción de las concentraciones de aflatoxinas B₁ y G₁ cuando se aplicaron las técnicas predictivas RML y RI a partir de los datos de crecimiento y producción de aflatoxinas de cuatro cepas aflatoxigénicas a diferentes actividades de agua y temperaturas en medios de cultivo de carne (MBA) y jamón curado (DHA).

Micotoxina	Técnica de predicción	Variables independientes	Coefficiente de correlación (R)
AFB ₁	RLM	Día, temperatura, a _w	0,7647
AFG ₁			0,7492
AFB ₁	RI	Día	0,6973
AFB ₁		Temperatura	0,6877
AFB ₁		a _w	0,6711
AFG ₁		Día	0,6153
AFG ₁		Temperatura	0,5927
AFG ₁		a _w	0,5553

Las variables independientes para la elaboración de todas las ecuaciones para predecir las cantidades de AFB₁ y AFG₁ en condiciones similares a las alcanzadas durante el proceso de maduración de los productos cárnicos fueron: días, temperatura y a_w. A continuación, se pueden observar las ecuaciones obtenidas para predecir la concentración de AFB₁ y AFG₁ utilizando RLM:

$$\text{Concentración AFB}_1 = 2,506 * \text{días} + 2,9009 * \text{temperatura} + 185,6894 * a_w - 234,4559$$

$$\text{Concentración AFG}_1 = 3,1031 * \text{días} + 4,1587 * \text{temperatura} + 184,5612 * a_w - 266,1552$$

Para la obtención de las ecuaciones para predecir el inicio de la síntesis de AFB₁ y AFG₁ en las condiciones relacionadas con el proceso de elaboración de los derivados cárnicos curado-

madurados, sólo se aplicó la técnica de RLM, pues fue necesario utilizar como variables independientes tanto la a_w como la temperatura. Los valores de R obtenidos para las ecuaciones de predicción de AFB₁ y AFG₁ fueron 0,8858 y 0,8717, respectivamente. Las ecuaciones obtenidas fueron:

$$\text{Inicio producción AFB}_1 = -0,9779 * \text{temperatura} - 30,1574 * a_w + 52,3498$$

$$\text{Inicio producción AFG}_1 = -0,6737 * \text{temperatura} - 0,0868 * a_w + 17,3908$$

IV.5. BIOCONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Otras de las estrategias de control estudiada en esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de varios microorganismos que habitualmente crecen en los derivados cárnicos curado-madurados como agentes de biocontrol sobre el crecimiento, la expresión génica de los genes implicados en las rutas biosintéticas de la OTA, AFs y ACP y en la producción de estos metabolitos secundarios en cepas de *P. verrucosum*, *A. parasiticus* y *P. griseofulvum*.

IV.5.1. EFECTO DE *D. hansenii* SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

Con el fin de estudiar la capacidad antifúngica de *D. hansenii* sobre *A. parasiticus* CECT 2682 se realizaron dos estudios. Uno de ellos se realizó en medios de cultivo elaborados con carne liofilizada a diferentes a_w , con el fin de evaluar su efecto sobre el crecimiento, la producción de AFs y sobre la expresión de los genes involucrados en la ruta biosintética. El otro estudio se realizó en lonchas de salchichón y jamón curado, donde se evaluó el efecto de *D. hansenii* sobre la producción de AFB₁ y AFG₁ de *A. parasiticus*.

IV.5.1.1. Estudios en sistemas modelo de carne

IV.5.1.1.1. Efecto de *D. hansenii* sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus*

En la Figura IV.17 se puede observar el efecto *D. hansenii* a diferentes a_w (0,99, 0,97 y 0,92) y 25 °C sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* inoculado individualmente y junto con *D. hansenii* en medios MSA. En general, las fases de latencia se alargaron y las velocidades de crecimiento aumentaron cuando descendió la a_w del medio de cultivo, siendo el crecimiento máximo en la a_w de 0,92. Cuando se comparó la fase de latencia de *A. parasiticus* inoculado individualmente con la fase de latencia del moho co-inoculado con la levadura se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las tres a_w , encontrándose un retardo en el crecimiento del moho de hasta 4 días en presencia de *D. hansenii* en la menor a_w evaluada. La velocidad de crecimiento de *A. parasiticus*, también se vio afectada significativamente ($p \leq 0,05$) cuando el moho fue tratado con la levadura, registrándose la mayor velocidad de crecimiento del moho en presencia de *D. hansenii* en la a_w 0,97.

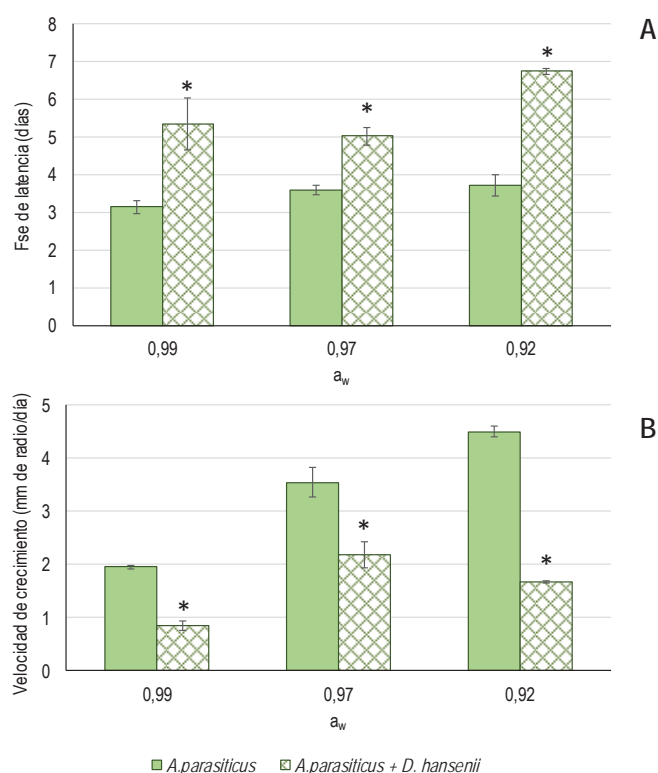


Figura IV.17. Efecto de *D. hansenii* sobre la fase de latencia (A) y la velocidad de crecimiento (B) de *A. parasiticus* a diferentes actividades de agua (a_w ; 0,99, 0,97 y 0,92) en medios de cultivo elaborados con carne y modificados con sal (MSA) durante un periodo de incubación de 14 días a 25 °C. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios. Las diferencias significativas entre *A. parasiticus* inoculado individualmente y junto con la levadura están indicados por un asterisco.

IV.5.1.1.2. Efecto de D. hansenii sobre la producción de AFB₁ y AFG₁ de A. parasiticus

La Figura IV.18 muestra la concentración de AFB₁ y AFG₁ producida por *A. parasiticus* en presencia y ausencia de *D. hansenii* a diferentes a_w (0,99, 0,97 y 0,92) en medios MSA a 25 °C durante todo el periodo de incubación. En general, la concentración de AFG₁ fue mayor que la de AFB₁ en todas las a_w analizadas, alcanzándose niveles máximos de ambas AFs al final del tiempo de incubación a la a_w más baja evaluada. En la condición de a_w de 0,99 se observó que la presencia de la levadura provocó un aumento significativo de ambas AFs ($p \leq 0,05$) cuando se comparó con la producción de *A. parasiticus* inoculado individualmente. Por otro lado, *D. hansenii* no influyó en la producción de AFs de *A. parasiticus* cuando se inocularon conjuntamente en la a_w de 0,97, sin embargo, en la a_w de 0,92, *D. hansenii* disminuyó significativamente la concentración de ambas AFs producidas por *A. parasiticus*, particularmente al final del tiempo de incubación ($p \leq 0,05$).

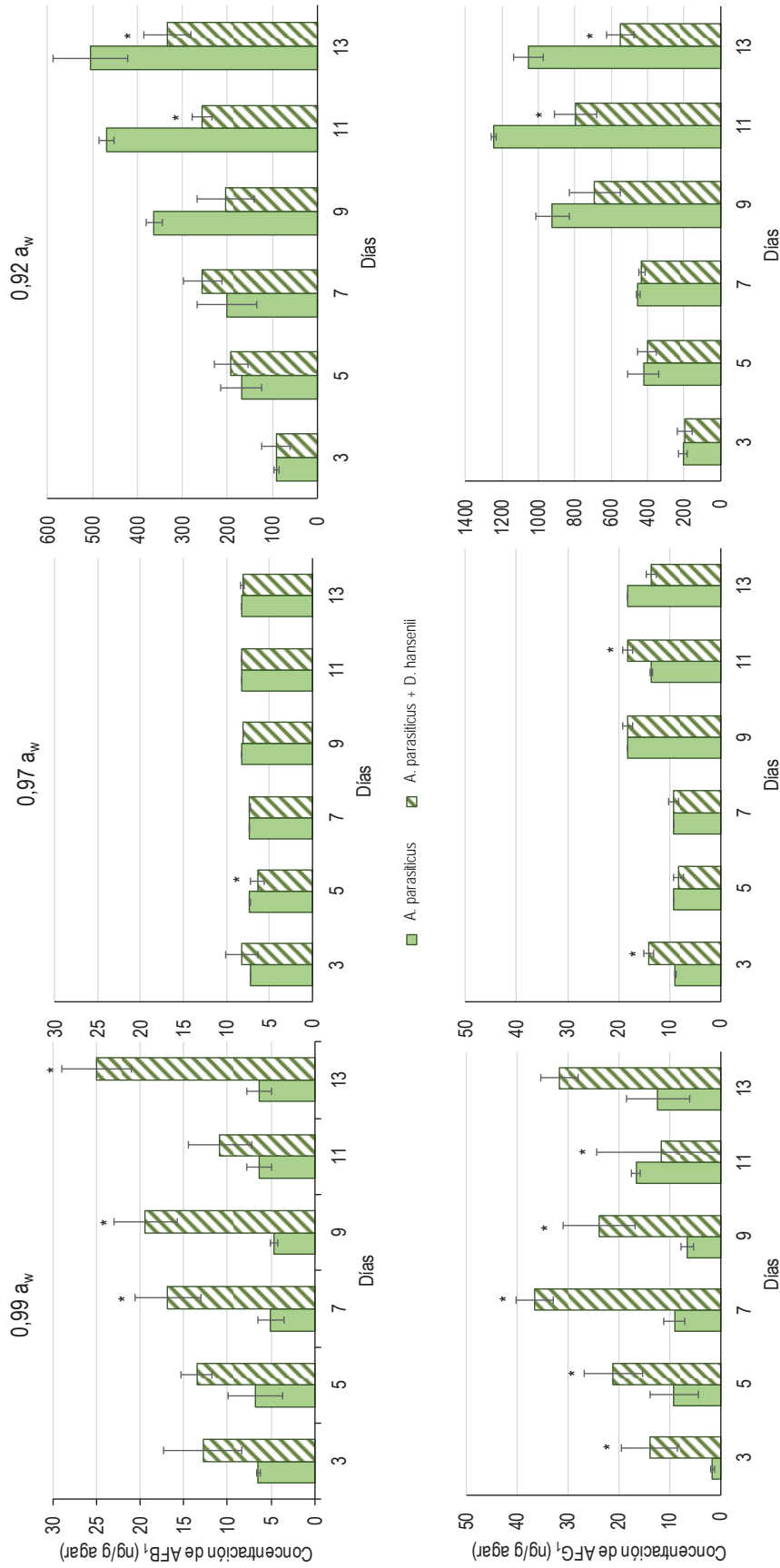


Figura IV.18. Efecto de *D. hansenii* sobre la concentración de AFB₁ y AFG₁ producidas por *A. parasiticus* a diferentes actividades de agua (a_w: 0,99, 0,97 y 0,92) en medios de cultivo elaborados con carne y modificados con sal (MSA) durante un periodo de incubación de 14 días a 25 °C. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios. Las diferencias significativas entre *A. parasiticus* inoculado individualmente y junto con la levadura están indicados por un asterisco.

IV.5.1.1.3. Efecto de *D. hansenii* sobre la expresión relativa de los genes *afIR* y *afIS* de *A. parasiticus*

La Figura IV.19 muestra los valores obtenidos en la expresión relativa de los genes *afIR* y *afIS* de *A. parasiticus* cuando se inocularon en presencia y ausencia de *D. hansenii* en las a_w de 0,99, 0,97 y 0,92 los días 6 y 12 de incubación a 25 °C en el medio MSA. Se evaluó la influencia de *D. hansenii* sobre la expresión relativa de los genes reguladores *afIR* y *afIS* de *A. parasiticus* a diferente a_w a los días 6 y 12 de incubación a 25 °C. Los perfiles de expresión relativa de ambos genes reguladores fueron bastante similares, en el día 6 de incubación se observó una sobreexpresión de ambos genes en las tres a_w ensayadas cuando *A. parasiticus* se inoculó junto a *D. hansenii*, siendo ésta significativa ($p \leq 0,05$) en la menor a_w ensayada. Además, hubo mayor expresión del gen *afIS* que del gen *afIR* en las tres condiciones evaluadas. Con respecto al día 12 de incubación, en las a_w de 0,99 y 0,97 la presencia de *D. hansenii* estimuló la expresión de los genes reguladores de *A. parasiticus*, en cambio, en la a_w 0,92 se observó una inhibición significativa ($p \leq 0,05$).

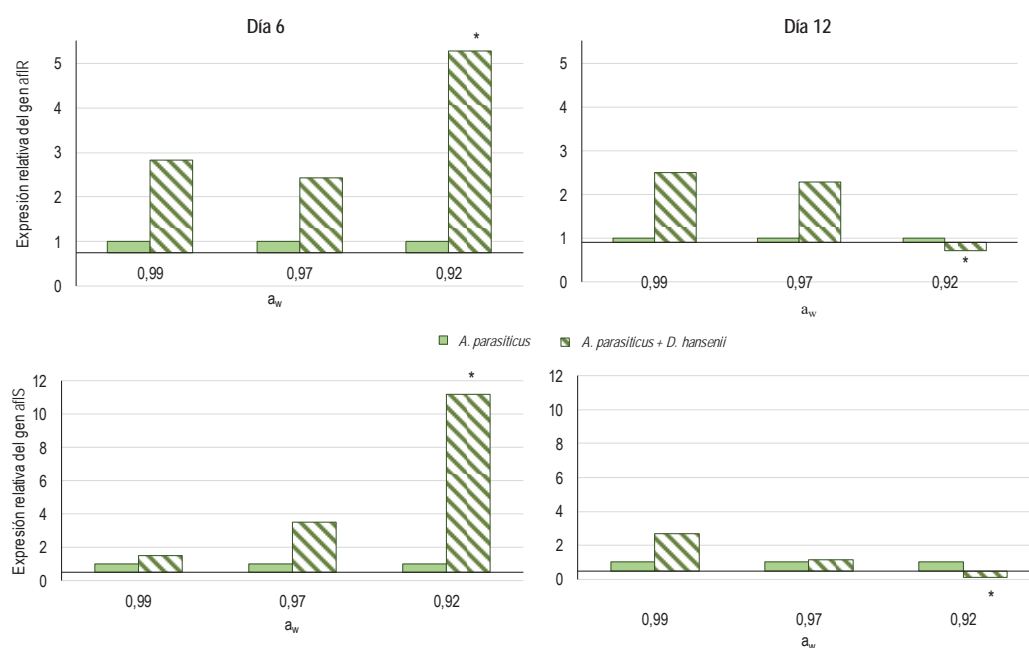


Figura IV.19. Expresión relativa de los genes *afIR* y *afIS* de *A. parasiticus* cuando se inocula individualmente o junto a *D. hansenii* en las actividades de agua (a_w) de 0,99, 0,97 y 0,92 en los días 6 y 12 de incubación a 25 °C en el medio de carne modificado con sal (MSA). Las diferencias significativas entre los valores medios de la expresión de los genes *afIR* y *afIS* en el mismo día de incubación están indicados por un asterisco ($p \leq 0,05$).

IV.5.1.2. Estudio en derivados cárnicos curado-madurados

La eficacia de *D. hansenii* como agente de biocontrol sobre la producción de AFs de *A. parasiticus* se evaluó en salchichón y jamón curado después de 21 días de incubación. En presencia de *D. hansenii*, *A. parasiticus* redujo significativamente ($p \leq 0,05$) la producción de AFs en ambos productos cárnicos (Tabla IV.9). La reducción de la concentración de AFB₁ y AFG₁ en salchichón en presencia de la levadura fue superior al 63% y al 59% respectivamente, mientras que, en jamón curado, las cantidades de AFB₁ y AFG₁ fueron reducidas un 37 y un 87%, respectivamente.

Tabla IV.9. Efecto de *D. hansenii* sobre la síntesis de AFB₁ y AFG₁ producida por *A. parasiticus* en lonchas de salchichón y jamón curado después de 21 días de incubación.

Microorganismos	Salchichón		Jamón curado	
	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₁
<i>A. parasiticus</i>	151,43 ± 63,64	356,51 ± 91,57	0,16 ± 0,04	4,14 ± 1,51
<i>A. parasiticus</i> + <i>D. hansenii</i>	55,81 ± 29,13	145,94 ± 59,75	0,06 ± 0,06	0,53 ± 0,85

IV.5.2. EFECTO DE *D. hansenii* SOBRE MOHOS PRODUCTORES DE OCRATOXINA A

Para evaluar la actividad antagonista de *D. hansenii* sobre el desarrollo de *P. verrucosum* FHSCC 21, cepa productora de OTA en derivados cárnicos curado-madurados, se realizaron dos estudios tal y como se detalla en la sección III.2.3.3.2. de Material y Métodos de esta Tesis Doctoral, uno se realizó en medios de cultivo elaborados con salchichón liofilizado, y el otro sobre lonchas del propio embutido.

IV.5.2.1. Estudio en sistemas modelo de salchichón

En este primer estudio se evaluó la influencia de diferentes ratios de concentraciones de *P. verrucosum* : *D. hansenii* (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100 respectivamente) sobre la síntesis de OTA a los 7, 14 y 21 días de incubación a distintas a_w (0,97, 0,94 y 0,90) y temperaturas (15 y 10 °C) en medios de cultivo elaborados con salchichón.

IV.5.2.1.1. Efecto de la actividad de agua y la temperatura en la actividad antagonista de D. hansenii sobre la producción de ocratoxina A

La Figura IV.20 muestra las cantidades de OTA producidas por *P. verrucosum* cuando se inocula con diferentes concentraciones de *D. hansenii* después de 7, 14, 21 días de incubación a diferentes a_w y temperaturas. En la mayor a_w y 15 °C la levadura fue capaz de reducir

significativamente la concentración de OTA a los 21 días de incubación ($p \leq 0,05$) en todas las concentraciones evaluadas; sin embargo, a esta misma a_w y 10 °C, no se encontraron diferencias significativas en la producción de OTA cuando el moho fue inoculado individualmente o en conjunto con la levadura. Por otro lado, en la a_w de 0,94 y a las dos temperaturas, *D. hansenii* no fue capaz de inhibir significativamente la producción de OTA e incluso, en algunas condiciones, estimuló la síntesis de esta micotoxina. En los ensayos realizados con la menor a_w la levadura, en general, no fue capaz de inhibir la síntesis de la micotoxina en ninguna de las ratios, días de incubación ni temperaturas evaluados.

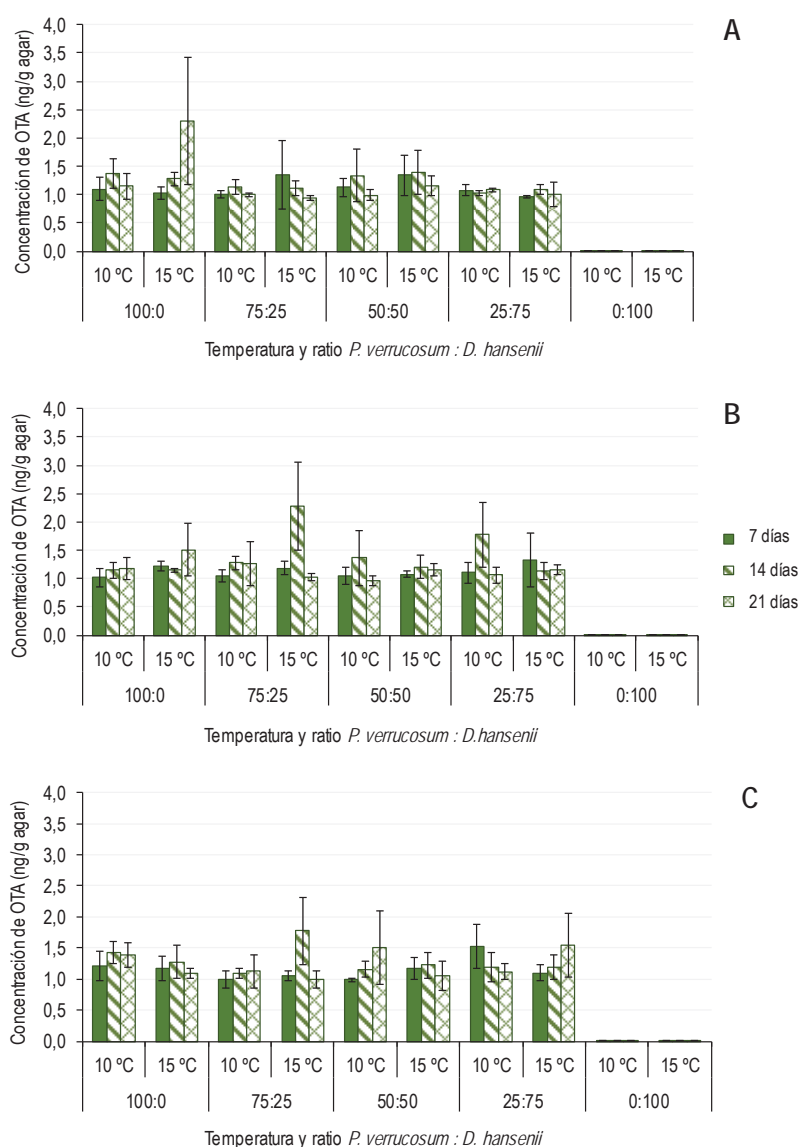


Figura IV.20. Efecto de la interacción de *P. verrucosum* y *D. hansenii* en diferentes ratios (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) sobre la producción de OTA a diferentes actividades de agua: 0,97 (A), 0,94 (B) y 0,90 (C) y temperaturas (15 y 10 °C) en medios elaborados con salchichón curado. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios.

IV.5.2.2. Estudio en un embutido curado-madurado

IV.5.2.2.1. Efecto de *D. hansenii* en la producción de OTA

En este caso se evaluó la capacidad inhibitoria de *D. hansenii* en la producción de OTA de *P. verrucosum* en lonchas de salchichón después de 21 días de incubación. *P. verrucosum* fue capaz de producir $6096,86 \pm 1408,90$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OTA en las muestras sin la levadura, sin embargo, cuando se incubó junto con *D. hansenii* hubo una reducción significativa del 66 % en la producción de OTA por parte del moho ($2037,22 \pm 1093,35$ $\mu\text{g}/\text{kg}$; $p \leq 0,05$).

IV.5.2.2.2. Efecto de *D. hansenii* en la expresión relativa de los genes *otapks* y *otanps*

La Figura IV.21 muestra los valores obtenidos en la expresión relativa de los genes *otapks* y *otanps* de *P. verrucosum* cuando se inoculó en presencia y ausencia de *D. hansenii* en salchichón. Los dos genes estudiados mostraron valores de expresión génica similares en todos los tiempos de muestreo. La expresión relativa de los dos genes se inhibió significativamente cuando *P. verrucosum* se inoculó conjuntamente con *D. hansenii* a los 14 días de incubación ($p \leq 0,01$), en cambio, a los 21 días se observó una sobreexpresión significativa ($p \leq 0,01$) de los genes implicados en la ruta biosintética de OTA, siendo mayor en el caso del gen *otapks*.

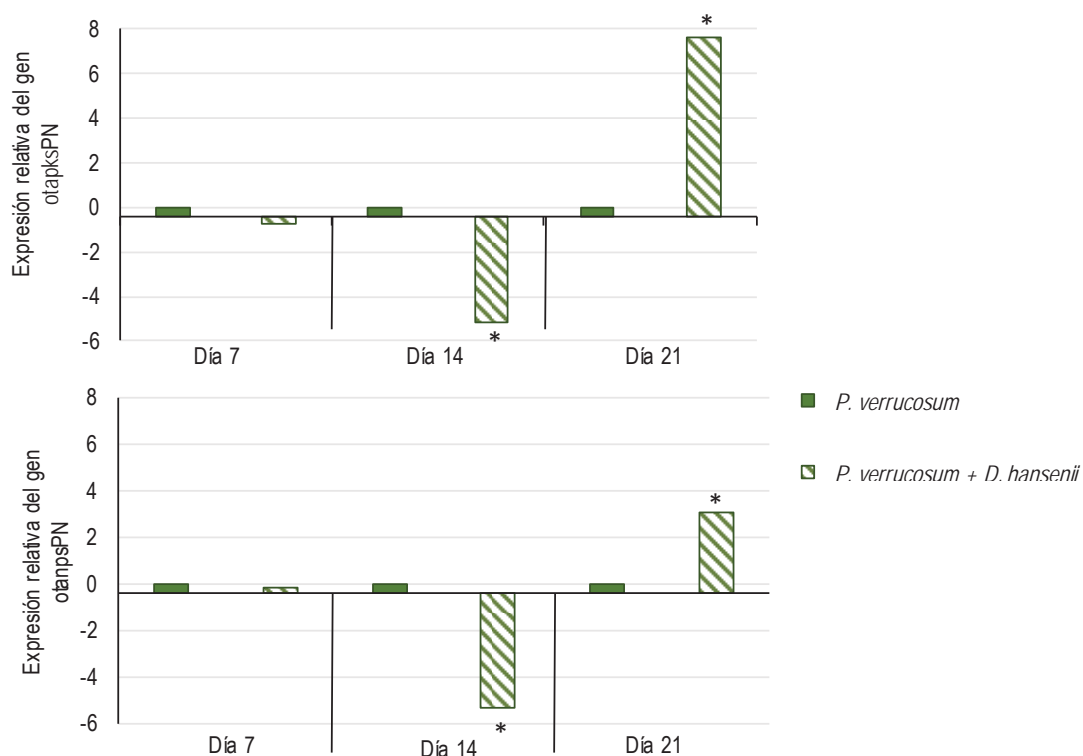


Figura IV.21. Expresión relativa de los genes *otapks* y *otanps* de *P. verrucosum* cuando se inocula individualmente o conjuntamente con *D. hansenii* en salchichón. Las diferencias significativas entre los valores medios de la expresión de los genes *otapks* y *otanps* en el mismo día de incubación están indicados por un asterisco ($p \leq 0,01$). Los valores de la expresión relativa están expresados en \log_2 .

IV.5.3. EFECTO DE AGENTES DE BIOCONTROL SOBRE EL DESARROLLO DE MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

Finalmente se evaluó el efecto de un inóculo mixto de agentes de biocontrol consistente en la levadura *D. hansenii* 253H y el moho *P. chrysogenum* CECT 20922 productor de la proteína antifúngica sobre la producción de ACP de dos cepas de *P. griseofulvum* en piezas de jamón curado durante un periodo de incubación de 21 días de incubación a 20 °C.

IV.5.3.1. Efecto en la producción de ácido ciclopiazónico

Las dos cepas de *P. griseofulvum* produjeron cantidades similares de ACP en jamón curado después de 21 días de incubación a 20 °C, la cepa IBT 14319 fue capaz de producir 266,79 ± 105,21 ng/g, y la cepa CECT 2919, produjo 239,11 ± 133,16 ng/g (Tabla IV.10).

El inóculo mixto utilizado como cultivo protector no causó una reducción visible del crecimiento de *P. griseofulvum* después de 21 días de incubación; sin embargo, la aplicación de este cultivo sí redujo de una manera efectiva la producción de ACP de ambas cepas de *P. griseofulvum* hasta un 79 % ($p \leq 0,05$) (Tabla IV.10).

Tabla IV.10. Efecto del cultivo protector mixto (*D. hansenii* + *P. chrysogenum*) sobre la concentración de ácido ciclopiazónico (ACP) producido por *P. griseofulvum* en piezas de jamón curado después de 21 días de incubación.

Microorganismos	ACP (ng/g)
<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319	266,79 ± 105,21
<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319 + <i>D. hansenii</i> + <i>P. chrysogenum</i>	55,44 ± 14,16
<i>P. griseofulvum</i> CECT 2919	239,11 ± 133,16
<i>P. griseofulvum</i> CECT 2919 + <i>D. hansenii</i> + <i>P. chrysogenum</i>	49,39 ± 8,80

IV.5.3.2. Efecto en la expresión de genes asociados con la producción de ácido ciclopiazónico

Los resultados de la influencia del cultivo protector mixto en la expresión relativa de los genes *dmaT*, *pkS-nrps* y *mfs-1* de las cepas de *P. griseofulvum*, así como del gen *pgaI* de la proteína antifúngica de la cepa de *P. chrysogenum* al final del periodo de incubación se muestran en la Figura IV.22. Los tres genes implicados en la ruta biosintética de ACP mostraron, en general, perfiles de expresión génica similares en las dos cepas de moho evaluadas cuando se inocularon junto al cultivo protector mixto. Ambas cepas de *P. griseofulvum* mostraron que la expresión de los

tres genes se estimuló cuando se inocularon conjuntamente con el cultivo protector, aunque la cepa CECT 2919 mostró niveles de expresión más elevados que la cepa IBT 14319. Excepcionalmente, la expresión del gen *pks-nrps* fue inhibida cuando la cepa IBT 14319 se inoculó conjuntamente con el cultivo protector mixto (Figura IV.22). Finalmente, los niveles de expresión del gen *pgafp* implicado en la producción de la proteína antifúngica por *P. chrysogenum* se incrementaron en presencia del cultivo protector mixto en el caso de la cepa IBT 14319 e inhibidos en el caso de la cepa CECT 2919.

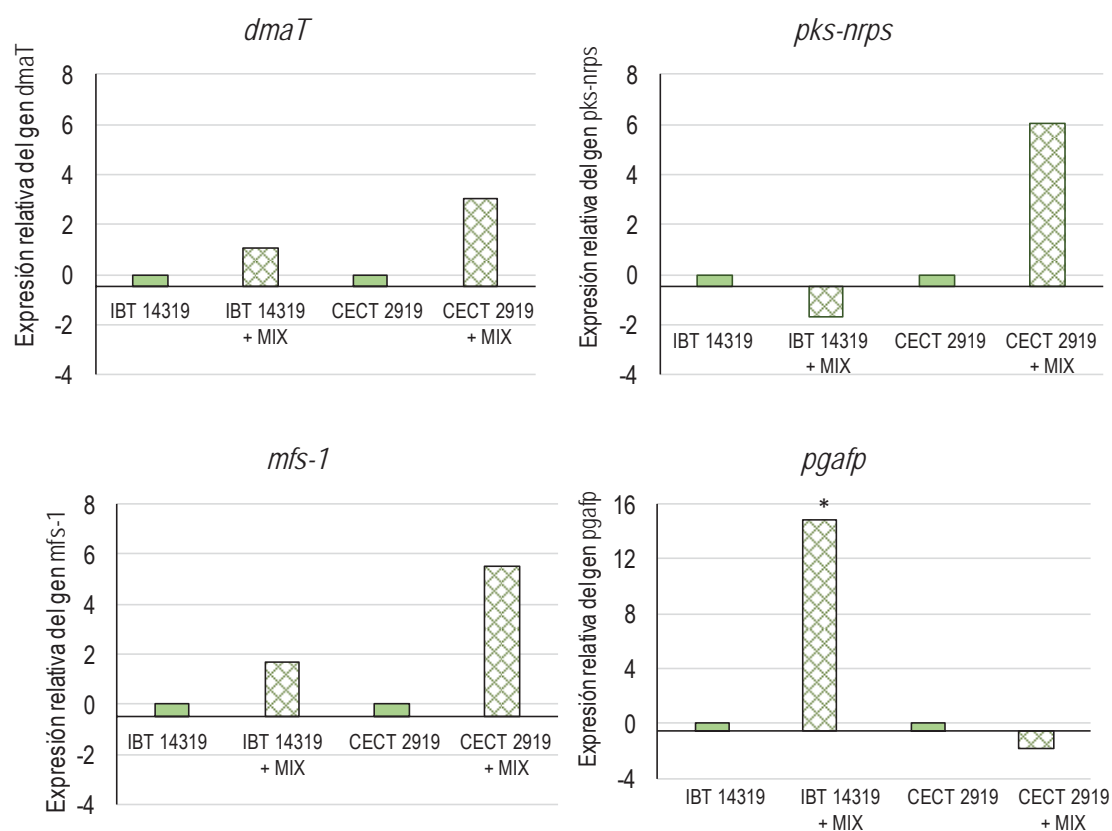


Figura IV.22. Expresión relativa de los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* implicados en la síntesis de ACP y del gen *pgafp* cuando *P. griseofulvum* se inocula individualmente o en conjunto con el cultivo protector mixto de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* (MIX) al final del periodo de incubación a 20 °C en jamón curado. Las diferencias significativas entre los valores medios de la expresión de los genes *dmaT*, *pks-nrps*, *mfs-1* y *pgafp* están indicados por un asterisco ($p \leq 0,01$).

V. DISCUSIÓN

V.1. DIFUSIÓN DE MICOTOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Los derivados cárnicos curado-madurados son alimentos ricos en nutrientes que, junto con las condiciones ambientales alcanzadas durante el proceso de maduración, favorecen el crecimiento de mohos en su superficie. Como ya se ha comentado anteriormente la mayoría de la población de mohos influye de forma positiva en las características sensoriales del producto final, pero algunos de ellos son capaces de sintetizar metabolitos secundarios tóxicos. Una mayor producción de estas toxinas por estos mohos toxigénicos no está necesariamente relacionada con el desarrollo de la colonia del moho, ya que, en ocasiones, ésta se ve estimulada aunque el tamaño de la colonia se vea limitado. Además, aunque algunas toxinas solo son detectadas en la parte contaminada con moho, otras toxinas pueden ser excretadas por el moho hacia la matriz alimentaria. Por este motivo, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es muy importante conocer hasta donde son capaces de difundir las micotoxinas en el interior de los derivados cárnicos curado-madurados, ya que, aunque es muy común entre los productores y en última instancia los consumidores, eliminar la superficie mohosa y consumir el interior de los mismos, es necesario evaluar el riesgo de la presencia de micotoxinas en estos productos.

Los mohos que crecen en la superficie del jamón o de los embutidos curado-madurados son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios tóxicos y no tóxicos, que van a ser responsables de la contaminación del alimento. Además, varias especies de moho pueden crecer al mismo tiempo en la superficie de estos derivados cárnicos curado-madurados pudiendo contaminar el alimento con diferentes micotoxinas al mismo tiempo. Por esta razón, la utilización de métodos HPLC-MS/MS capaces de detectar un amplio rango de micotoxinas y otros metabolitos secundarios fúngicos es muy útil para llevar a cabo la determinación simultánea de micotoxinas de diferente naturaleza que ocurren en la misma matriz alimentaria y su difusión hacia el interior del alimento (Juan y col., 2017a; Streit y col., 2013; Sulyok y col., 2010; Varga y col., 2013).

Hasta el momento, se han publicado algunos trabajos en los que se han desarrollado métodos de HPLC-MS/MS para la detección simultánea de un amplio rango de micotoxinas en distintas matrices alimentarias. Así, Sulyok y col. (2006) desarrollaron un método multi-analítico HPLC-MS/MS para la determinación de 39 metabolitos secundarios en maíz, que luego fue optimizado para la determinación de micotoxinas y otros metabolitos en cereales y alimentos a base de cereales (Sulyok y col., 2006), trigo y subproductos (Streit y col., 2013), maíz (Kayode y

col., 2013; Mohale y col., 2013; Shephard y col., 2013), frutas y verduras (Malachová y col., 2014; Sulyok y col., 2010) y frutos secos (Varga y col., 2013), pero hasta el momento este tipo de técnicas para la determinación de un amplio rango de metabolitos secundarios no había sido utilizada en derivados cárnicos. En esta Tesis Doctoral se ha tomado de punto de partida el método de HPLC-MS/MS para la determinación de 295 metabolitos fúngicos y bacterianos optimizado y validado por Malachová y col. (2014) de acuerdo con las directrices establecidas por la Dirección General de Salud y Consumo en el documento de la Comisión Europea (SANCO) n° 12495/2011. En dicho documento los criterios de validación se han establecido para la determinación de residuos múltiples de plaguicidas, pero es el único que ofrece unas directrices aplicables para los métodos analíticos que implican la presencia de cientos de analitos con distintas propiedades físico-químicas.

En primer lugar, se evaluó la eficiencia de extracción y el efecto de la matriz en el producto cárnico. El documento SANCO anteriormente mencionado, recomienda la utilización de un producto representativo de cada grupo de productos para la validación del método, motivo por el cual se eligió el salchichón como matriz modelo, ya que su composición es más compleja que la del jamón curado. La inoculación artificial del salchichón se realizó con una disolución de trabajo que contenía más de 100 metabolitos secundarios, pero la evaluación de los resultados obtenidos se limitó exclusivamente a los metabolitos secundarios más importantes producidos por los principales mohos que crecen en los derivados cárnicos curado-madurados (*Aspergillus* y *Penicillium*).

La extracción de los analitos fue satisfactoria ya que los 19 metabolitos secundarios evaluados mostraron una R_A entre el 80–106% con una desviación estándar por debajo del 10%. Este mismo método ha sido aplicado en puré de manzana, pimiento verde, maíz y avellana (Malachová y col., 2014), obteniendo valores de R_A inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. La aplicación de un método multianalito requiere el empleo de un disolvente de extracción único y de unas condiciones cromatográficas que sean capaces analizar de forma precisa una gran cantidad de analitos químicamente diferentes (Varga y col., 2013). El efecto matriz que se puede observar en sistemas HPLC-MS/MS se debe a que ciertos componentes de la matriz alimentaria eluyen al mismo tiempo de retención que el analito, compitiendo durante el proceso de ionización en la fuente de iones (Pizzutti y col., 2009). En algunos casos, la cantidad de iones que se forman puede aumentar, pero con mayor frecuencia disminuir (debido a la supresión de iones), lo que da como resultado el conocido efecto de matriz positivo o negativo, respectivamente. Malachová y col. (2014) consideraron que los analitos que habían obtenido unos valores de EM entre 90–110%

no se veían afectados por el efecto de la matriz. Entre los 19 analitos analizados en este estudio, 12 de ellos, estaban dentro del rango 90–110%, entre los que se encontraban AFB₁, OTA, griseofulvina, esterigmatocistina y ácido micofenólico, que son las toxinas más comúnmente encontradas en los derivados cárnicos curado-madurados, por lo que se consideró que no estaban afectados por el efecto de la matriz; el resto de los analitos analizados se vieron, en mayor o menor medida, afectados por la matriz del salchichón, sin embargo, en el estudio desarrollado por Malachová y col., (2014) casi la mitad de los analitos estaban afectados por el efecto matriz en las cuatro matrices alimentarias utilizadas. Finalmente, los valores de LOD y LOQ que se encontraron en la mayoría de los analitos estaban muy por debajo de 1 µg/kg, excepto en los casos de la roquefortina C, el ACP y la ocratoxina α, esto puede deberse a que son metabolitos que se degradan con facilidad e impiden su recuperación correcta de la matriz. Aunque aún no se han establecido límites máximos de micotoxinas en los derivados cárnicos curado-madurados, los límites se encontraban por debajo de los niveles máximos requeridos en los alimentos regulados en los Reglamentos (CE) 1881/2006, 165/2010 y en el Reglamento (UE) 105/2010. Todos estos parámetros parecen indicar que el método de extracción utilizado, así como el método de detección HPLC-MS/MS son suficientemente sensibles para la detección de un amplio rango de metabolitos secundarios producidos por los mohos que crecen en los derivados cárnicos curado-madurado.

Una vez validados los métodos de extracción y detección de metabolitos secundarios en un embutido curado-madurado se procedió a evaluar la producción de estos compuestos por cepas de mohos que crecen habitualmente en jamón curado y salchichón y la capacidad de estos de difundir hacia el interior del alimento. En general, se pudo observar que en la superficie (lámina A) donde se encontraba la colonia del moho se detectaron entre 8 y 13 metabolitos secundarios producidos por las distintas cepas utilizadas (Tabla V.1). En la mayoría de los casos estos metabolitos difundieron desde la superficie de la matriz cárnica hasta las láminas B y C durante el tiempo de incubación del experimento, llegando a contaminar los productos hasta 3 cm de profundidad; sin embargo, la concentración de los metabolitos fúngicos disminuía a medida que difundía hacia el interior del alimento. Estos resultados están de acuerdo con Reib, (1981) quién determinó que la difusión de AFs, OTA y citrinina en pan de trigo dependía de la micotoxina, ya que la citrinina solo fue detectada en la primera rebanada de pan, mientras que las AFs y OTA llegaron a contaminar hasta 5 rebanadas consecutivas. Del mismo modo, Olsen y col. (2017) estudiaron la difusión de patulina y otros metabolitos secundarios en diferentes alimentos (queso

madurado, puré de tomate, mermelada de manzana y de arándano) y la difusión de los diferentes metabolitos dependió de las texturas de los alimentos.

Tabla V.1. Principales metabolitos secundarios producidos por *P. griseofulvum* IBT 14319, *P. griseofulvum* CECT 2919, *P. nordicum* CBS 110.769 y *P. verrucosum* CECT 2906 en la lámina A en salchichón y jamón curado. Las diferentes tonalidades representan la concentración de los metabolitos, así los colores más intensos son los más concentrados y los colores más claros son los menos concentrados.

Metabolitos secundarios	SALCHICHÓN				JAMÓN CURADO			
	<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319	<i>P. griseofulvum</i> CECT2919	<i>P. nordicum</i> CBS 110.769	<i>P. verrucosum</i> CECT 2906	<i>P. griseofulvum</i> IBT 14319	<i>P. griseofulvum</i> CECT2919	<i>P. nordicum</i> CBS 110.769	<i>P. verrucosum</i> CECT 2906
7-Hidroxipestalotina								
Atlantinon A								
Brevianamida F								
Ciclo-L-Pro-L-Tir								
Ciclo-L-Pro-L-Val								
Ácido ciclopiazónico								
Declorogriseofulvina								
Dehidrogriseofulvina								
Dihidrogriseofulvina								
Griseofulvina								
Griseofenona B								
Griseofenona C								
Meleagrina								
Ocratoxina A								
Ocratoxina B								
Pestalotina								
Questiomicina A								
Roquefortina C								
Roquefortina D								
Triptofol								
Verrucosidina								

En este estudio, los metabolitos secundarios tóxicos más comunes producidos por las cepas de *Penicillium spp.* fueron el ACP, OTA, roquefortina C y verrucosidina. Además, la misma cepa toxigénica fue capaz de producir diferentes metabolitos secundarios en cada producto cárnico.

Las cepas de *P. griseofulvum* produjeron ACP en ambos productos cárnicos, aunque produjeron mayores concentraciones de ACP en salchichón que en jamón curado; sin embargo, las cantidades de esta toxina disminuían a medida que difundía hacia el interior de la matriz alimentaria. Estos resultados están en desacuerdo con el trabajo realizado por Olsen y col. (2017)

que encontraron que tanto en el queso madurado como en la crema fresca contaminados por ACP, este metabolito no llegaba a difundir más de 2 cm hacia el interior en ambos productos.

La cepa de *P. verrucosum* utilizada solo produjo OTA en salchichón, mientras que *P. nordicum* fue capaz de producir este metabolito secundario en los dos derivados cárnicos curado-madurados, en las dos cepas se ha demostrado que el metabolito fúngico no se difunde más de 2 cm en estos productos. Estos resultados concuerdan con los descritos por Rodríguez y col. (2012e), quienes evaluaron la producción de OTA por *P. nordicum* en jamón curado y confirmaron que la presencia de OTA no se limitaba a la superficie, sino que penetró 0,5 cm de profundidad, aunque, como en nuestro caso, la concentración fue menor en el interior. Por otro lado, Escher y col. (1973), demostraron que la presencia de OTA en el jamón curado parece estar restringida al área donde existe la contaminación fúngica, por lo que aparentemente no difunde hacia el interior. Sin embargo, Reib, (1981) mostró que en rebanadas de pan la OTA difundía hacia el interior, pero la mayor cantidad de la toxina fue detectada en la primera rebanada y disminuía en las siguientes rebanadas. Estas diferencias de difusión pueden atribuirse a diferencias en la textura de los alimentos tal y como han descrito Olsen y col. (2017).

En la familia de la roquefortina existen varios metabolitos: roquefortina C (Ohmomo y col., 1975), roquefortina D (Ohmomo y col., 1978), roquefortinas F, L, M y N (Ries y col., 2013), glandicolina A y B (Kozlovsky y col., 1994), meleagrina (García-Estrada y col., 2011; Ali y col., 2013) y neoxalina (Overy y col., 2005a). En nuestro estudio, la roquefortina C fue producida por las cuatro cepas de mohos evaluadas, siendo mayores las concentraciones producidas por las cepas de *P. griseofulvum* en salchichón. La difusión de la roquefortina C se ha estudiado en varios alimentos de diferente composición y textura como son el queso madurado, y el puré de tomate, en los que esta micotoxina no difundió más de 2 cm de profundidad (Olsen y col., 2017), mientras que en nuestro estudio la roquefortina C se detectó en los tres niveles de profundidad (hasta 3 cm de profundidad). Por otro lado, *P. verrucosum* también fue capaz de producir roquefortina D en los dos derivados cárnicos, mientras que *P. griseofulvum* solo produjo este metabolito secundario en salchichón. Además, *P. nordicum* produjo meleagrina y *P. verrucosum* produjo neoxalina en ambas matrices alimentarias. Estos metabolitos secundarios son producidos principalmente por especies del género *Penicillium*, como *P. chrysogenum* y *P. roqueforti* (Frisvad y col., 2004), y se han encontrado en bebidas alcohólicas (Cole y col., 1983, Möller y col., 1997) y otros alimentos (Overy y col., 2005b; Rundberget y col., 2004).

La verrucosidina es un metabolito secundario que ha sido producido solo por *P. verrucosum* en este ensayo. Las concentraciones más altas de esta micotoxina han sido detectadas en salchichón llegando a difundir hasta los 3 cm de profundidad.

Otros metabolitos secundarios producidos por las cuatro cepas de moho utilizadas en este estudio son muy interesantes para la industria farmacéutica ya que pueden utilizarse para combatir enfermedades de forma eficaz como, por ejemplo, la griseofulvina, la emodina, el triptofol o la questiomicina A. La griseofulvina y sus derivados (declorogriseofulvina, dehidrogriseofulvina, dihidrogriseofulvina, griseofenona B y griseofenona C), son producidos por las dos cepas de *P. griseofulvum* en ambos productos cárnicos; sin embargo, en el caso de las cepas de *P. nordicum* y *P. verrucosum*, éstas sólo produjeron griseofulvina en salchichón, difundiendo en todos los casos hasta los 3 cm de profundidad. La griseofulvina se ha utilizado durante muchos años en los campos de medicina y veterinaria (Finkelstein y col., 1996). Recientemente, su uso potencial en la quimioterapia contra el cáncer ha sido reconocido debido a su acción antimitótica y antiproliferativa específica de células cancerosas. Además, se ha descrito que algunos derivados de griseofulvina, como la 6-O-desmetildeclorogriseofulvina, la 6'-hidroxigriseofulvina y la declorogriseofulvina, presentan actividades mucho más débiles o carecen de actividad antifúngica (Shang y col., 2012). Sorprendentemente, *P. griseofulvum* también fue capaz de producir emodina en salchichón. Este metabolito secundario, con bioactividad diversa, ha sido aislado recientemente del medio ambiente marino de especies de *Penicillium* (Ngan y col., 2017) y se ha demostrado que la emodina regula el metabolismo de la glucosa y disminuye la lipólisis (Hwang y col., 2013; Zhang y col., 2015), además es eficaz para prevenir el desarrollo de diabetes tipo 1 (Bae y col., 2015).

Por otro lado, las cuatro cepas de mohos estudiadas fueron capaces de producir triptofol contaminando hasta los 3 cm de profundidad en ambos derivados cárnicos, mientras que el metabolito questiomicina A fue detectado en los productos cárnicos inoculados solo con *P. verrucosum* y *P. nordicum* difundiendo también hacia el interior de ambos productos cárnicos. El triptofol y la questiomicina A son compuestos de interés farmacéutico que muestran una actividad positiva en la salud del consumidor, derivada fundamentalmente de sus propiedades anticancerígenas, cardiopreventivas y antimicrobianas (Machihara y col., 2017).

La contaminación de los derivados cárnicos curado-madurados con micotoxinas es un problema de seguridad alimentaria; sin embargo, tal y como se ha demostrado en esta Tesis Doctoral, no se puede utilizar como una estrategia válida y eficiente para reducir el peligro asociado a la presencia de micotoxinas en estos productos la eliminación del micelio fúngico de la superficie

de estos derivados cárnicos ya que las micotoxinas y otros metabolitos secundarios tóxicos pueden difundir hacia el interior del producto cárnico hasta más de 3 cm de profundidad. Por ello, es necesario buscar estrategias de control, ya sea, controlando las condiciones ecológicas que favorecen la producción de micotoxinas o utilizando microorganismos autóctonos de estos productos como levaduras o mohos no toxigénicos con el fin de minimizar la contaminación.

V.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Antes de aplicar distintas estrategias para minimizar o evitar la presencia de micotoxinas en el jamón curado y en los embutidos curado-madurados es necesaria la disponibilidad de herramientas analíticas sensibles, específicas y eficaces para el análisis cualitativo y cuantitativo de micotoxinas en dichos alimentos.

Para la optimización de un método cromatográfico robusto y sensible capaz de detectar y cuantificar la concentración de un analito tóxico específico es necesario tener en cuenta la naturaleza de la molécula en sí y su estabilidad en las condiciones experimentales. Las tres micotoxinas estudiadas en esta Tesis Doctoral presentan una naturaleza química muy diferente entre ellas, mientras que las AFs son compuestos químicos constituidos por furanocumarinas, la OTA está formada por un anillo de isocumarina unido a una molécula de fenilalanina y el ACP tiene una estructura de ácido indol-tetrámico.

El ACP, a diferencia de las otras dos micotoxinas en estudio, ha demostrado ser una molécula inestable que puede degradarse a través de procesos físicos y químicos (Díaz y col., 2010), por lo que el rendimiento de los métodos analíticos que existen para su determinación en diferentes matrices es limitado. Sin embargo, Bailly y col. (2005) demostraron que esta micotoxina es estable en el jamón curado debido a que durante el proceso de secado/maduración se producen cambios proteolíticos intensos que dan como resultado un gran aumento de aminoácidos libres, alcanzando concentraciones elevadas en el producto final (Buscailhon y col., 1994; Córdoba y col., 1994; Toldrá y Aristoy 1993; Virgili y col., 1999). Entre ellos, se encuentra el triptófano, conocido precursor directo del ACP (Chang y col., 2009a, De Jesús y col., 1981; Liu y Walsh, 2009; McGrath y col., 1976), por lo que será fácil que los mohos productores de ACP produzcan esta micotoxina

en el jamón curado durante el proceso de secado/maduración. Por lo tanto, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es deseable la optimización de un buen procedimiento de extracción y una herramienta analítica eficiente para el análisis cualitativo y cuantitativo de ACP en el jamón curado, así como en embutidos curado-madurados. Recientemente se han desarrollado métodos para determinar el ACP en queso por HPLC-MS/MS o diferentes compuestos derivados del ACP por uHPLC-qTOF-MS (Ansari y Häubl, 2016; Uka y col., 2017), aunque el estudio incluido en esta Tesis Doctoral es el primero basado en el desarrollo de un método uHPLC-MS/MS para cuantificar ACP en matrices cárnicas combinadas con un procedimiento de extracción rápido, sencillo y económico basado en la metodología QuEChERS.

V.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR MS/MS Y CROMATOGRÁFICAS

En la optimización de las condiciones del detector MS/MS es fundamental la selección correcta del modo de ionización del ACP. Los mejores resultados se obtuvieron con el modo de ionización negativa. Otros autores utilizaron este mismo modo de ionización para la detección MS/MS de otras micotoxinas tales como alternariol, deoxinivalenol, patulina y zeralenona (Malachovác y col., 2014; Sulyok y col., 2006; Varga y col., 2013).

En cuanto a la optimización de las condiciones cromatográficas para la detección específica de ACP en jamón curado, se modificó el método de HPLC desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación para la detección de OTA en jamón curado (Rodríguez y col., 2012e). Para la separación del analito se utilizó una columna Poroshell® 120 EC-C₁₈ como fase estacionaria, este tipo de columnas se han aplicado satisfactoriamente para el análisis de micotoxinas en alimentos mediante HPLC de fase reversa (Beltrán y col., 2011; Kamala y col., 2015; Medina y col., 2005; Medina y Magan 2012; Rodríguez y col., 2012d; Sosa y col., 2002). Además, las columnas C₁₈ son adecuadas para su utilización en uHPLC ya que mejora la resolución de los picos, obteniéndose picos más estrechos, valores de LOD más bajos y tiempos de retención más cortos (Fanali y col., 2017).

La correcta selección de la fase móvil y su velocidad de flujo es esencial para desarrollar nuevos protocolos de uHPLC-MS/MS ya que influye de forma determinante en la respuesta del detector, por ello, se evaluaron dos composiciones de fase móvil y dos velocidades de flujo diferentes. El uso de un tampón compuesto por un ácido débil en la composición de ambas fases

móviles fue debido a las conclusiones obtenidas en los estudios realizados por Díaz y col. (2010) quienes destacaron que la utilización de dicho tipo de ácidos promueve una catálisis ácida débil que ayuda a la molécula de ACP a no hidrolizarse con el ácido durante la carrera cromatográfica. La mejor resolución del pico cromatográfico se obtuvo con la fase móvil que contenía como fase acuosa acetato de amonio acidificado con ácido acético a pH 5,75 y como fase orgánica metanol a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los obtenidos por Díaz y col. (2010) quienes afirmaron que la naturaleza y el pKa del ácido en el que se disuelve el ACP debe ser al menos una unidad mayor que la del ACP (pKa = 2,97; Sobolev, 2005) para garantizar la estabilidad de la molécula. Además, el uso de un tampón menos ácido en este estudio mejoró la sensibilidad, dando un pico de mejor calidad. Esto tiene sentido ya que este tampón menos ácido puede contribuir a que el ACP se desprotona fácilmente lo que implica un aumento de la sensibilidad en el modo de ionización negativo seleccionado del detector en modo MS/MS. Otros autores encontraron mejores resultados usando ácido fórmico en la fase móvil (pKa = 3,77) pero el porcentaje utilizado en la composición de la fase móvil era menor y además se combinó con otra fase orgánica como es el acetonitrilo (Ansari y Häubl, 2016).

A continuación, se optimizó el modo de gradiente de la fase móvil debido a que la resolución de los picos obtenidos con las condiciones iniciales no fue satisfactoria. Para ello, se modificó el porcentaje de metanol utilizado en la fase móvil (50-70%) y el tiempo de elución del metanol para alcanzar el 95 % (4-11 min). Finalmente, las mejores condiciones del modo de gradiente consistieron en un incremento del eluyente B hasta el 60% y en un tiempo de gradiente para que el metanol alcanzase el 95% a los 11 min. Los resultados mostraron que cuanto mayor era el tiempo que tardaba el metanol en alcanzar el 95%, mayor era la resolución de los picos. Desde un punto de vista instrumental, es preferible usar una mayor cantidad de disolventes orgánicos durante más tiempo en la carrera cromatográfica que tampones acuosos preparados con compuestos iónicos debido a que las sales disueltas en dichos tampones pueden precipitar durante la carrera y suponer un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, lo que puede conducir a la contaminación de la fase móvil y, por consiguiente, al bloqueo del sistema o de la columna (Kaufmann, 2014). Sin embargo, en este método, se observó que se necesitaba un alto porcentaje de tampón acuoso iónico (40%) durante mayor tiempo (hasta los 11 min) para garantizar la estabilidad del ACP durante el análisis.

Otro aspecto fundamental que es necesario optimizar en el desarrollo de un método analítico para la detección de una molécula inestable químicamente como es el ACP es el diluyente utilizado para la resuspensión de la micotoxina antes de su determinación mediante el método de

uHPLC-MS/MS desarrollado en esta Tesis Doctoral. La mejor resolución de los picos cromatográficos se obtuvo cuando los patrones comerciales de ACP se resuspendieron en una disolución de ácido acético-acetato de amonio pH 5,75 / metanol 30/70 (v/v). Para mantener la estabilidad de las muestras y evitar pérdidas de ACP es aconsejable utilizar un tampón ácido débil (Díaz y col., 2010); sin embargo, se observó que una mayor proporción del disolvente orgánico en la disolución utilizada fue más ventajosa.

Los valores de LOD y LOQ obtenidos en el método desarrollado fueron 18 y 56 ppb, respectivamente. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Pizzutti y col. (2014) y Spanjer y col., (2008); aunque, Ansari y Häubl, (2016) optimizaron un método de HPLC-MS/MS para determinar ACP en queso con límites más bajos. Sin embargo, los límites alcanzados en este estudio fueron lo suficientemente buenos teniendo en cuenta que las especies de moho que producen esta micotoxina la producen en grandes cantidades. Por lo que el método de uHPLC-MS/MS desarrollado permite la detección de ACP de jamón curado de forma sensible, rápida y evitando la utilización de grandes volúmenes de disolventes orgánicos.

V.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

El éxito de la aplicación del método de uHPLC-MS/MS desarrollado depende en gran medida del adecuado aislamiento y purificación del ACP producida por los mohos que contaminan el jamón curado. Este hecho es muy importante, especialmente en muestras procedentes de alimentos, donde en el proceso de extracción de micotoxinas se pueden arrastrar componentes de las propias matrices alimentarias que pueden promover la presencia del efecto matriz en la carrera cromatográfica. Por todo ello, es importante la optimización de un protocolo eficiente, sencillo, rápido y barato que permita obtener el ACP con una buena recuperación y sin inhibidores que puedan ser analizados mediante la técnica analítica. Este propósito u objetivo puede ser contradictorio con la utilización de las columnas uHPLC ya exigen una preparación exhaustiva de la muestra para evitar problemas derivados de una alta presión y/o bloqueo de la columna (Fanali y col., 2017).

En esta Tesis Doctoral se han evaluado cuatro métodos de extracción de ACP. Dos de ellos están basados en una extracción clásica líquido-líquido utilizando cloroformo o una disolución mixta de acetonitrilo y agua, que se han utilizado previamente para extracciones de otras micotoxinas a partir de medios de cultivo o de matrices alimentarias (Medina y Magan, 2012; Pizzutti y col., 2014; Rodríguez y col., 2012e; Sosa y col., 2002). Sin embargo, en muchos casos

es necesario la utilización de columnas de inmutofinidat u otro tipo de procedimientos de limpieza para eliminar las interferencias de las matrices (Cigic y Prosen, 2009; Turner y col., 2009; 2015). Los otros dos métodos se basaron en la metodología QuEChERS, que ha sido ampliamente utilizada para la determinación de AFs, fumonisinas y otras micotoxinas que contaminan principalmente alimentos de origen vegetal (Annunziata y col., 2017, Juan y col., 2017a; Miró-Abella y col., 2017), aunque aún no se ha probado para extraer ACP contaminante de jamón curado. Ya que las recuperaciones de todos los métodos de extracción estuvieron en torno al 78–92 %, el método 4 basado en la metodología QuEChERS fue seleccionado debido a su simplicidad y su menor coste en comparación con los otros tres métodos. Además, los resultados obtenidos de recuperación (90,2% y 91,8%) al extraer ACP directamente de lonchas de jamón curado, mostraron que el método seleccionado fue adecuado y que apenas había interferencias de la matriz cárnica, no observándose variaciones en la simetría del pico y el tiempo de retención cuando se detectó el ACP de la matriz de jamón en relación con la disolución de referencia de ACP. Estos valores medios de recuperación fueron muy similares a los obtenidos por Moldes-Anaya y col., (2009) al extraer ACP de trigo, cacahuetes y arroz con un disolvente de extracción consistente en agua y metanol; sin embargo, Norred y col. (1987) obtuvieron valores de recuperación más bajos cuando se extrajo ACP a partir de carne de pollo utilizando la clásica extracción líquido-líquido.

Por lo tanto, el método de extracción de ACP optimizado puede ser de gran utilidad para el aislamiento de esta toxina de forma rápida y económica de derivados cárnica curado-madurados para ser posteriormente analizada mediante el método de HPLC-MS/MS desarrollado en esta Tesis Doctoral.

En definitiva, el método analítico diseñado en esta Tesis Doctoral combina los beneficios del uso de la metodología QuEChERS y de uHPLC-MS/MS en lugar de los métodos convencionales de extracción líquido-líquido y/u otros métodos de detección. Estos métodos de extracción y análisis permiten la detección y cuantificación altamente sensible y rápida de ACP para su análisis en jamón curado, minimizando el tratamiento de la muestra, evitando los efectos de la matriz, reduciendo el tiempo de análisis y el consumo y los costes de los disolventes utilizados.

V.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral consistió en el estudio de la influencia de las condiciones ambientales relacionadas con el proceso de elaboración y/o maduración de los embutidos curado-madurados y el jamón curado en el crecimiento, expresión de genes implicados en la biosíntesis de las micotoxinas y la producción de estos metabolitos secundarios tóxicos de mohos toxigénicos que pueden crecer en la superficie de estos productos. En los últimos años, la investigación se ha centrado principalmente en el crecimiento de mohos ocratoxigénicos, pertenecientes principalmente a las especies de *P. nordicum* y *P. verrucosum*, en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados y su contaminación con OTA, especialmente en jamón curado (Armorini y col., 2016; Ferrara y col., 2016; Markov y col., 2013; Pleadin y col., 2013; Rodríguez y col., 2012f). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que otros mohos toxigénicos como los mohos productores de ACP (Alapont y col., 2014; Bailly y col., 2005; Sosa y col., 2002) y los mohos productores de AFs (Markov y col., 2013; Pleadin y col., 2015a, 2015b; Rodríguez y col., 2012f) también pueden colonizar este tipo de productos cárnicos. Hasta el momento, se ha estudiado la influencia de los factores ambientales, como la temperatura y la a_w , o la concentración en NaCl sobre el crecimiento y la producción de OTA por mohos ocratoxigénicos en medios elaborados con jamón curado y salchichón (Battilani y col., 2010; Rodríguez y col., 2014, 2015a, 2015b). Por lo tanto, sería muy interesante conocer cómo afectan las condiciones ambientales relacionadas con el proceso de maduración del jamón curado sobre el crecimiento, la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ACP y AFs y su relación con la producción de estas toxinas producidas por cepas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. La evaluación del comportamiento de las cepas de mohos productoras de ACP y de AFs en la propia superficie del jamón curado y/o embutido curado-madurado es complicada debido a la complejidad de la obtención de condiciones estériles durante el proceso de maduración. Por este motivo, se utilizaron sistemas modelos elaborados con las matrices cárnicas de interés. Para ello, se han elaborado dos medios de cultivo, uno con carne (MBA) y otro con jamón curado (DHA) liofilizados que simulan la composición de este producto al principio y al final del proceso de maduración, donde la principal diferencia entre ambos medios es la concentración de NaCl, siendo más alta en DHA que en MBA.

Con la información obtenida en estos ensayos se podrán establecer aquellas condiciones ecológicas que favorecen el crecimiento y la posterior producción de la micotoxina por cepas

toxigénicas, lo cual permitirá tomar medidas para evitar o reducir la presencia de micotoxinas en los embutidos curado-madurados y en el jamón curado y garantizar así su seguridad.

V.3.1. MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

✓ Fase de latencia y velocidad de crecimiento

En el caso de las cepas de *P. griseofulvum* (IBT 14319 y CECT 2919), se evaluó la influencia de la tres a_w a una temperatura muy habitual en la etapa de maduración del jamón curado. Las dos cepas mostraron un buen crecimiento en los medios MBA y DHA en la a_w de 0,95 y 0,90 a 25 °C, excepto en la a_w de 0,85 donde las cepas no fueron capaces de crecer durante los 12 días que duró el experimento. Esto se debe, probablemente, a que esta condición es demasiado estresante y, por lo tanto, limita el crecimiento de moho. Además, no se encontraron diferencias significativas en las fases de latencia y en las velocidades de crecimiento cuando se compararon ambas cepas de cada especie de moho y entre ambos medios de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados por Galvalisi y col. (2012) quienes demostraron que la adición de un 2,5% de NaCl al medio de cultivo AEM no estimulaba el crecimiento de diferentes cepas de *Penicillium* en comparación con el medio no modificado a diferentes a_w (a_w 0,99 – 0,95) y temperaturas (25 – 14°C); sin embargo, Ludemann y col. (2004) describieron que la presencia del 2,5% de NaCl estimuló el crecimiento de las cepas de *P. nalgiovense*, con algunas diferencias entre cepas. Por otro lado, Rodríguez y col. (2014) demostraron que existían diferencias en el crecimiento entre cepas de *P. nordicum* en un medio elaborado con jamón curado y modificado con diferentes concentraciones de NaCl.

✓ Producción de ácido ciclopiazónico

La producción de ACP de las cepas de *P. griseofulvum* se vio afectada por la composición de los medios de cultivo elaborados con carne y con jamón curado, sintetizando más cantidad de ACP en DHA que en MBA. Esto puede deberse probablemente a que el alto contenido en aminoácidos libres, como el triptofano en el medio DHA favorece el desarrollo de los mohos productores de ACP. Varios autores han demostrado que la mayor presencia de triptófano en el medio puede aumentar la formación de ACP por mohos toxigénicos (Chang y col., 2009a; de Jesús y col., 1981; Liu y Walsh, 2009; McGrath y col., 1976).

Por otro lado, se observó que las mayores cantidades de ACP producidas por las dos cepas de *P. griseofulvum* fueron a los 6 días de incubación en la a_w de 0,95 y a una temperatura de 25°C. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sosa y col. (2002) que demostraron que varias cepas de *P. commune* produjeron mayores cantidades de ACP en agar extracto de carne a una a_w de 0,90 y a 20 °C. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Gqaleni y col., (1996), *P. commune* produce una mayor concentración de ACP a valores de a_w altos y temperaturas bajas en el medio de cultivo YES. Del mismo modo, Le Bars y col. (1979) mostraron que la producción óptima de ACP por *P. camemberti* en agar Czapek era a 25 °C.

✓ Expresión de genes implicados en la ruta biosintética del ácido ciclopiazónico

En esta Tesis Doctoral, los estudios de expresión relativa temporal de los genes implicados en la producción de ACP se realizaron solo en el medio DHA ya que este medio promovió una mayor producción de ACP de las dos cepas de *P. griseofulvum* utilizadas.

Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar, fue necesario el desarrollo de nuevos protocolos de RT-qPCR para cuantificar la expresión de genes implicados en la síntesis de esta micotoxina, por lo que, se diseñaron cebadores específicos basados en la secuencia de los genes *dmaT*, *pkS-nrps* y *mfs-1* y posteriormente, se optimizaron los nuevos métodos de RT-qPCR siguiendo las directrices proporcionadas por Rodríguez y col. (2015c).

Con respecto a los resultados obtenidos en expresión relativa temporal de la cepa CECT 2919, hubo una estimulación de la expresión de los genes *mfs-1* y *pkS-nrps* en comparación con la expresión del gen *dmaT* a 25 °C. La expresión del gen *dmaT* se mantuvo en niveles constantes a lo largo de todo el experimento, independientemente de la a_w , mientras que la expresión de los genes *mfs-1* y *pkS-nrps* se vio afectada por la a_w . En la a_w de 0,90, hubo un aumento de la expresión del gen *mfs-1*, alcanzando un nivel máximo de expresión en el noveno día de incubación; mientras que la expresión del gen *pkS-nrps* se estimuló a la máxima a_w evaluada (a_w 0,95), mostrando un máximo de expresión en el último día de incubación. Por el contrario, la cepa IBT 14319 mostró perfiles de expresión similares de los tres genes en estudio en la a_w de 0,95, mientras que se encontraron algunas diferencias en la a_w de 0,90. El gen *dmaT* se estimuló a dicha a_w , mientras que los genes *mfs-1* y *pkS-nrps* mostraron perfiles de expresión similares en las dos a_w analizados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Medina y col. (2017), que encontraron una inhibición en la expresión de los genes *dmaT*, *pkS-nrps* y *mfs-1* en *A. flavus*

influenciado por un estrés hídrico, independientemente de la temperatura, durante un período de incubación de 10 días.

Comparando los perfiles de la expresión relativa temporal de las dos cepas de *P. griseofulvum*, observamos que fueron bastante diferentes. Además, los valores de expresión génica relativa de cada gen también fueron distintos para ambas cepas de *P. griseofulvum*. Estos resultados no se pudieron comparar con resultados previos ya que este es el primer estudio que analiza la expresión relativa temporal de tres genes asociados con la biosíntesis de ACP de *P. griseofulvum* en un sistema modelo de jamón curado. Estas diferencias entre especies en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas se han descrito previamente en otras especies de mohos como *P. nordicum* (Rodríguez y col., 2014), *Fusarium verticilloides* (Lazzaro y col., 2012) y *A. flavus* (Baquião y col., 2016).

Finalmente, se puede observar una clara relación de los resultados de la expresión génica y la producción de ACP en el medio de cultivo de DHA. En la a_w de 0,95, ambas cepas produjeron menos cantidad de ACP en el último día incubación que a mitad del tiempo de incubación que puede explicarse porque hubo una represión en la expresión de los tres genes de la biosíntesis de ACP antes de finalizar el tiempo de incubación. Sin embargo, en la a_w de 0,90, las mayores cantidades de ACP producidas por las dos cepas se observaron en el día 12 de incubación. Esto tiene sentido ya que, en esta a_w , la expresión de al menos uno de los tres genes relacionados con la síntesis de ACP se estimuló durante el tiempo de incubación. Parece obvio que es necesario una estimulación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis del ACP para la producción de esta micotoxina como se ha sugerido en trabajos de investigación anteriores (Chang y col., 2009a, 2009b, Shinohara y col., 2011).

V.3.2. MOHOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

V.3.2.1. Selección de cepas aflatoxigénicas

En esta Tesis Doctoral se evaluó en primer lugar el efecto de tres a_w y una temperatura habitualmente encontradas en la etapa de maduración del jamón curado en el crecimiento y producción de AFB₁ de cuatro cepas productoras de esta micotoxina, dos de ellas pertenecientes a la especie de *A. flavus* y otras dos pertenecientes a *A. parasiticus*. Los resultados mostraron que, en general, *A. parasiticus* y *A. flavus* crecieron de forma similar y produjeron cantidades similares de AFB₁ y AFG₁ en los dos medios de cultivo. Estos resultados tienen sentido debido a

que, el contenido en sal de los productos cárnicos curado-madurados predispone la colonización de mohos ocratoxigénicos (Rodríguez y col., 2014, 2015a; Schmidt-Heydt y col., 2011a, 2012), debido a que la OTA contiene un ión cloro en su molécula asegurando la homeostasis del cloruro cuando la OTA es sintetizada. Sin embargo, las AFs y la OTA son moléculas estructuralmente muy diferentes, no viéndose afectadas por la composición del jamón curado.

Las diferencias entre cepas a diferentes a_w y 25 °C en el crecimiento y la producción de AFB₁ se muestran en la Tabla V.2. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las cuatro cepas aflatoxigénicas en el medio DHA, sin embargo, en MBA, las dos cepas de *A. flavus* mostraron diferencias significativas en las fases de latencia y la velocidad de crecimiento; observándose que la cepa *A. flavus* IBT 3696 creció tan rápido como las dos cepas de *A. parasiticus*. Con respecto al análisis estadístico de los datos de AFs obtenidos, no hubo diferencias en la producción de AFB₁ en el día 10 en los medios de DHA o en el día 8 en los medios de MBA excepto *A. flavus* CBS 573.65 (Tabla V.2).

Tabla V.2. Análisis estadístico del efecto de diferentes a_w a 25 °C en la fase de latencia (λ), la velocidad de crecimiento (μ) y producción de AFB₁ para *A. parasiticus* (CECT 2681, CECT 2688) y *A. flavus* (IBT 3696, CBS 573.65) en los medios elaborados con carne (MBA) y jamón curado (DHA) en los días 8 y 10, respectivamente.

Comparación entre cepas	a_w	MBA			DHA		
		λ	μ	AFB ₁	λ	μ	AFB ₁
CECT 2681-CECT 2688	0,95	0,077	0,127	0,050	0,275	0,275	0,050
	0,90	0,827	0,513	0,275	0,275	0,275	0,513
	0,85	0,513	0,050	0,513	0,507	0,827	0,275
IBT 3696-CBS 573.65	0,95	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,275
	0,90	0,127	0,050	0,050	0,127	0,050	0,275
	0,85	0,050	0,275	0,046	0,827	0,050	0,05
CECT 2688-IBT 3696	0,95	0,050	0,050	0,513	0,050	0,050	0,513
	0,90	0,275	0,127	0,050	0,513	0,513	0,275
	0,85	0,513	0,513	0,046	0,513	0,050	0,513
CECT 2688- CBS 573.65	0,95	0,050	0,050	0,127	0,050	0,050	0,050
	0,90	0,513	0,513	0,050	0,513	0,513	0,050
	0,85	0,127	0,127	0,050	0,513	0,050	0,050

De los resultados obtenidos de estos ensayos iniciales se deduce que las dos cepas de *A. parasiticus* se comportaron de forma similar en cuanto al crecimiento y a la producción de AFs; sin embargo, esto no fue así para el caso de las dos cepas de *A. flavus*. La cepa *A. flavus* IBT 3696 produjo concentraciones similares de AFB₁ a ambas cepas de *A. parasiticus*, mientras que la cepa *A. flavus* CBS 573.65 mostró mayor cantidad de AFB₁ que las otras tres cepas. De esta

forma, una cepa de cada especie de moho aflatoxigénica con diferentes perfiles de crecimiento y producción de AFB₁ se seleccionó para posteriores estudios. Así, *A. parasiticus* CECT 2688, fue seleccionado por tener estudios previos realizados con esta cepa y así poder comparar resultados (Lozano-Ojalvo y col., 2013) y *A. flavus* CBS 573.65 por ser el más diferente de los cuatro mohos utilizados. Estas dos cepas se usaron para examinar el impacto de los factores ambientales en el crecimiento de *A. parasiticus* y *A. flavus* en los medios de cultivo MBA y DHA.

V.3.2.2. Efecto de las condiciones ambientales en el crecimiento, expresión génica y producción de micotoxinas

Una vez seleccionadas las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de AFs, se procedió al estudio de la influencia de las condiciones ambientales relacionadas con el proceso de elaboración del jamón curado sobre el crecimiento de estas cepas, la expresión de genes implicados en la biosíntesis de estas micotoxinas y la producción de las mismas.

✓ Fases de latencia y crecimiento

A partir de los resultados obtenidos, se observa que ambas cepas aflatoxigénicas mostraron perfiles de fase de latencia muy similares. *A. flavus* tenía fases de latencia más cortas que *A. parasiticus*; sin embargo, una vez que comenzó a crecer *A. parasiticus*, su velocidad de crecimiento fue mayor que la de *A. flavus*. Para ambas especies, el crecimiento óptimo fue a 25 °C y a_w de 0,95. Estudios previos han mostrado que el crecimiento óptimo de *A. flavus* en cacahuetes fue a una a_w de 0,94 y a 34 °C (Sanchís y Magan, 2004). Giorni y col. (2008) y Abdel-Hadi y col. (2012) demostraron que el crecimiento óptimo de *A. flavus* fue a una a_w de 0,99 y 25-30 °C en maíz y a una a_w de 0,99 y 35 °C en medio de cultivo YES, respectivamente. Recientemente, Gallo y col. (2016) mostraron que el mayor crecimiento del micelio de *A. flavus* se obtuvo a una a_w de 0,96 y 28 °C en medio de cultivo elaborado con almendra. Schmidt-Heydt y col. (2010) a diferencia de nuestros resultados, demostraron que el crecimiento óptimo de *A. parasiticus* fue a una a_w de 0,99 y 35 °C en el medio de cultivo YES, sin embargo, existen muy pocas investigaciones relacionadas con estudios de ecofisiología de *A. parasiticus* en comparación con *A. flavus*. En nuestro estudio, ambas especies mostraron límites de crecimiento similares en relación con la a_w y la temperatura, aunque el rango de valores de crecimiento de *A. flavus* fue ligeramente más estrecho que el de *A. parasiticus*. Ninguna de las dos cepas fueron capaces de crecer a 10 °C en las tres a_w evaluadas durante todo el periodo de incubación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lozano-Ojalvo y col. (2013) y Mousa y col. (2011) que confirmaron que la temperatura mínima de crecimiento de *A. parasiticus* y *A. flavus* en el medio de

cultivo YES y en arroz era 10 °C. Además, nuestro estudio muestra que el crecimiento de ambas especies de *Aspergillus* estaba limitado por una a_w y una temperatura bajas. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Mousa y col. (2011, 2013) que demostraron que *A. flavus* no fue capaz de crecer a valores inferiores de a_w de 0,82; sin embargo, Schmidt-Heydt y col. (2010) obtuvo que la temperatura mínima que permitía el crecimiento de *A. parasiticus* era a 17 °C.

✓ Producción de aflatoxinas

En el caso de la producción de AFB₁ de *A. flavus* en ambos medios de cultivo fue óptima a 25 °C independientemente de la a_w , y mínima o limitante a a_w de 0,85 y 15–20 °C, no siendo capaz de producir en ninguna de las a_w evaluadas a 10 °C. Varios estudios han demostrado que las condiciones óptimas de producción para *A. flavus* variaron entre 25–30 °C y a_w 0,96–0,99 (Abdel-Hadi y col., 2010; Astoreca y col., 2014; Giorni y col., 2011, 2007; Mousa y col., 2011) y las condiciones marginales se encontraban a valores de a_w de 0,82–0,87 y 10–30 °C (Astoreca y col., 2014; Gallo y col., 2016; Giorni y col., 2007; Mousa y col., 2013). Las diferencias encontradas en las condiciones óptimas sobre la producción de AFs en los diferentes estudios puede deberse a los diferentes medios utilizados y a la cepa de moho en estudio (Gallo y col., 2016; Klich, 2007).

Por otra parte, las condiciones óptimas de producción de AFB₁ y AFG₁ por parte de *A. parasiticus* fueron a una temperatura de 25 °C y a valores de a_w de 0,95 y 0,85, respectivamente. Además, se observó que la producción de las AFs estaba influenciada por el descenso tanto de la a_w como de la temperatura, siendo mayores las concentraciones de AFG₁ que de AFB₁ en todas las condiciones experimentales. Estos resultados son similares a los descritos por Lozano-Ojalvo y col. (2013) que demostraron que la misma cepa de *A. parasiticus* producía más AFG₁ que AFB₁ en medio de cultivo YES no modificado y modificado con triptófano a 25 y 30 °C. Además, los estudios de Schmidt-Heydt y col. (2010) sugirieron que las diferencias entre la producción de AFB₁ y AFG₁ por una cepa de *A. parasiticus* se debían a los cambios de temperatura. Dicho estudio demostró que *A. parasiticus* producía concentraciones más altas de AFG₁ a temperaturas moderadas (20–30 °C) mientras que AFB₁ se producía a temperaturas más altas (> 30 °C).

✓ Expresión de genes implicados en la ruta biosintética de las aflatoxinas

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que los parámetros ambientales relacionados con el proceso de secado/maduración afectan a la expresión relativa de los genes asociados con la ruta biosintética de las AFs de las cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus*.

Varios estudios previos han relacionado los factores abióticos con la activación o desactivación de genes implicados en la ruta biosintética de varias micotoxinas en medios elaborados con matrices alimentarias o directamente en alimentos (Abdel-Hadi y col., 2012; Jayashree y Subramanyam, 2000; Jurado y col., 2008; Kim y col., 2005; Kohut y col., 2009; Ochiai y col., 2007; Schmidt-Heydt y col., 2008).

En el caso de *A. flavus*, al comparar la expresión relativa temporal del gen *affP* con la expresión de los genes *affR* y *affS*, se observó que los genes reguladores se estimularon a 25 °C y a medida que disminuía la a_w . Estos resultados son similares a los publicados por Schmidt-Heydt y col. (2009) que encontraron un nivel basal de expresión de dichos genes a 25 °C, cuando la a_w era superior a 0,90. La expresión de ambos genes reguladores se vio especialmente afectada por la temperatura (<18 °C y $a_w \leq 0,90$). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por O'Brian y col. (2007) quienes encontraron que los valores de expresión de los genes reguladores no diferían entre las temperaturas de 28 y 37 °C. Las diferencias experimentales encontradas pueden explicarse debido a las diferencias existentes entre las temperaturas evaluadas en los dos estudios. En el caso del gen *affP*, el perfil de expresión relativa temporal fue diferente en comparación con los dos genes reguladores a 20 y 25 °C. Además, la expresión de este gen estructural estuvo influenciada por la temperatura, la a_w , y la interacción de ambos parámetros. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schmidt-Heydt y col. (2009) quienes diferenciaron dos grupos de genes teniendo en cuenta sus perfiles de expresión génica, los genes *affR* y *affS* que tenían un perfil muy similar mientras que el gen *affP* fue muy diferente a los genes reguladores. Por otro lado, a la temperatura de 15 °C, los perfiles de expresión génica de los tres genes fueron bastante similares, aunque hubo una sobreexpresión del gen *affP* cuando la a_w fue inferior a 0,90. La inducción del pico de expresión de este gen podría deberse a que el crecimiento del moho se produjo en condiciones de estrés, este hecho parece ser muy común en algunos mohos toxigénicos (Schmidt-Heydt y col., 2008).

En cuanto a *A. parasiticus*, los perfiles de expresión relativa temporal de los dos genes reguladores fueron muy similares a 25 y 20 °C y las tres a_w estudiadas, aunque, en general, la expresión del gen *affS* fue mayor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schmidt-Heydt y col. (2010) que demostraron que la expresión del gen *affR* tendía a ser más alta a temperaturas ≥ 30 °C, mientras que la expresión del gen *affS* era más alta a temperaturas ≤ 30 °C. Los niveles más altos de expresión de los genes *affR* y *affS* se encontraron a valores de a_w de 0,95 y temperatura de 15 °C en el sexto día de incubación y a una a_w de 0,95 y 25 °C en el último día de incubación. Sorprendentemente, Schmidt-Heydt y col. (2010) encontraron resultados

similares cuando se comparó la expresión de ambos genes en el mismo rango de temperaturas y a_w , aunque estos autores utilizaron un medio de cultivo diferente y calcularon la expresión absoluta de estos genes. Con respecto a la expresión del gen *afIP*, su perfil de expresión relativa temporal fue similar a los perfiles obtenidos de los genes *afIR* y *afIS* a la temperatura más baja evaluada (15 °C); sin embargo, como en el caso de *A. flavus*, los valores de expresión del gen *afIP* fueron mucho mayores. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Lozano-Ojalvo y col. (2013), quienes examinaron el efecto de diferentes temperaturas en la expresión relativa temporal del gen *afIP* de la misma cepa de *A. parasiticus* que la utilizada en este estudio. En dicho estudio también se detectaron cambios en la expresión relativa temporal del gen *afIP* durante el tiempo de incubación, aunque se utilizó un medio de cultivo básico (YES) suplementado con triptófano y nitrato de sodio, y diferentes tiempos (36-96 h) y temperaturas (25, 30 y 37 °C) de incubación. Parece que la temperatura ejerce un efecto en la transcripción de los genes del metabolismo secundario a través del control de las rutas reguladoras. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros estudios de expresión de varios genes del grupo de las AFs indicando que la temperatura es un modulador de la producción de AFs (Abdel-Hadi y col., 2012; Feng y Leonard, 1998; Passone y col., 2012; Wilkinson y col., 2007; Yazdanpanah y col., 2005; Yu, y col., 2011).

✓ Correlación entre la producción de micotoxinas y la expresión génica

Una vez analizada la producción de las AFs y la expresión relativa temporal de genes implicados en la biosíntesis de dichas micotoxinas, se procedió a determinar si había alguna correlación entre ambos parámetros con el fin de determinar si los resultados obtenidos en el estudio de expresión génica tenían un carácter predictivo. Para ello, se utilizó, por una parte, los valores de la expresión génica relativa temporal en el día 9 de incubación y, por otra, las concentraciones de AFB₁ y AFG₁ producidas por las dos cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en el día 10 de incubación en el medio DHA. Se seleccionó estos tiempos de incubación debido a que hay estudios previos que sugirieron que la expresión de los genes relacionados con la producción de AFs era óptima después de 8–10 días de crecimiento (Schmidt-Heydt y col., 2008, 2009, 2010). Varios estudios han correlacionado las condiciones ecofisiológicas con la expresión de los genes de implicados en la biosíntesis de las AFs y su producción fenotípica (Abdel-Hadi y col., 2012; Medina y col., 2015b; O'Brian, y col., 2007; Passone y col., 2012; Schmidt-Heydt y col., 2009, 2010; Yu y col., 2011); sin embargo, este es el primer estudio en el que se ha analizado la relación entre la expresión de los genes *afIR*, *afIS* y *afIP*, la producción de AFs y los factores ecofisiológicos relacionados con el proceso de maduración del jamón curado. Para investigar tales correlaciones, se aplicó el análisis de PCA en los datos y reveló una fuerte correlación entre la expresión relativa

temporal de ambos genes reguladores (*affR* y *affS*) y la producción de AFB₁ por *A. flavus* y, AFB₁ y AFG₁ por *A. parasiticus*.

V.3.3. ESTUDIOS DE ECOFISIOLOGÍA COMO ESTRATEGIA DE CONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS

Los resultados obtenidos en los estudios de esta Tesis Doctoral proporcionan información nueva y útil desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, ya que se ha demostrado que las condiciones ambientales (a_w y temperatura) relacionadas con el proceso de maduración del jamón curado afectan a la fase de latencia y velocidad de crecimiento de *P. griseofulvum*, *A. parasiticus* y *A. flavus*, a la expresión de los genes implicados en la ruta biosintética del ACP y las AFs y a la producción de estas toxinas en medios elaborados con carne y jamón curado. Se observó que en todos los mohos toxigénicos el crecimiento fue óptimo a 25 °C y a una a_w de 0,95 (Figura V.1). Además, se ha demostrado que los medios elaborados con jamón curado que contienen altos niveles de triptofano favorecen la producción de ACP, mientras que la producción de AFs no se ve afectada por el medio de cultivo utilizado (Figura V.2). Además, también se ha mostrado que la expresión relativa de los genes *dmaT*, *pks-nrps* y *mfs-1* de las cepas de *P. griseofulvum* y los genes *affR* y *affS* de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* estaban relacionadas con la producción fenotípica de ACP y AFs respectivamente, aunque se observaron diferentes perfiles transcripcionales entre las dos cepas productoras de ACP y las dos cepas productoras de AFs. Por lo tanto, el crecimiento de mohos toxigénicos durante la maduración del jamón curado podría suponer un riesgo importante asociado con la presencia de ACP y AFs, por ello, las condiciones óptimas y marginales para el crecimiento y la producción de ACP y AFs pueden usarse para ayudar en la toma de decisiones en relación con la temperatura y a_w durante la maduración de los derivados cárnicos curado-madurados para minimizar la acumulación de ACP y AFs en estos productos cárnicos. Además, la monitorización de la expresión de los genes dianas durante el procesado del jamón curado permitiría prevenir la contaminación del jamón curado con ACP y AFs. Dicha información puede contribuir a la selección de estrategias óptimas para controlar la contaminación de ACP y AFs en estos productos cárnicos. Una mejor comprensión de la importancia de los factores ecofisiológicos implicados en la contaminación del jamón con ACP y AFs será beneficiosa para el desarrollo de nuevas herramientas y/o estrategias de controles efectivas para minimizar la contaminación por ACP y AFs durante la maduración del jamón curado.

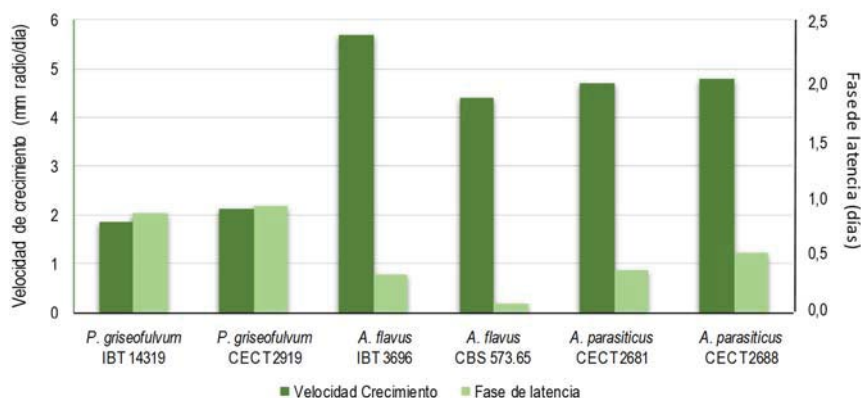


Figura V.1. Fase de latencia y velocidad de crecimiento de *P. griseofulvum* IBT 14319, *P. griseofulvum* CECT 2919, *A. flavus* IBT 3696, *A. flavus* CBS 573.65, *A. parasiticus* CECT 2681 y *A. parasiticus* CECT 2688 a a_w de 0,95 y 25 °C en el medio elaborado con jamón curado (DHA).

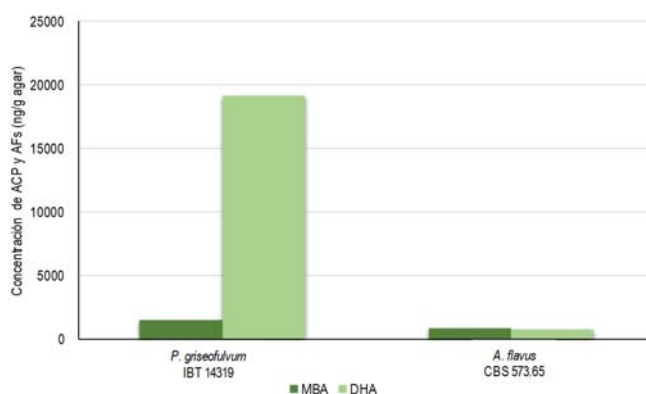


Figura V.2. Producción de micotoxinas de *P. griseofulvum* IBT 14319 (ACP) y de *A. flavus* CBS 573.65 (AFB₁) a los 6 días de incubación con a_w de 0,95 y 25 °C en los medios elaborados con carne (MBA) y jamón curado (DHA).

V.4. PREDICCIÓN DE AFLATOXINAS EN JAMÓN CURADO

En esta Tesis Doctoral se han utilizado innovadoras y prometedoras herramientas para predecir la presencia y la concentración de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados. La micología predictiva permite evaluar el crecimiento de mohos en distintos alimentos y, por lo tanto, predecir la contaminación de los mismos con micotoxinas, en relación con las condiciones ambientales alcanzadas durante el procesado o almacenamiento de los productos (Dagnas y Membré, 2013; García y col., 2009). Hasta ahora, muchos estudios se han centrado en desarrollar modelos predictivos para determinar el crecimiento de la colonia fúngica en diversas condiciones ambientales (Dantigny y col., 2005; García y col., 2011; Gougouli y Koutsoumanis, 2010; Marín y col., 2008, 2009, 2010; Mousa y col., 2013; Panagou y col., 2010; Samapundo y col., 2005; Tassou

y col., 2007), pero hay pocos estudios que han desarrollado modelos para predecir la concentración de micotoxinas (Abdel-Hadi y col., 2012; Ioannidis y col., 2015; Marín y col., 2012; Mousa y col., 2011). La dificultad de desarrollar métodos capaces de predecir la producción de las micotoxinas se debe a que una misma cepa puede producir más de una micotoxina o que una misma micotoxina puede ser producida por más de una cepa (Kapetanakou y col., 2011; Marín y col., 2006). Por lo tanto, el diseño y optimización de modelos matemáticos para la predicción de las cantidades de micotoxinas producidas por especies toxigénicas en alimentos debería ser un objetivo primordial en el área de la seguridad alimentaria.

Para alcanzar este objetivo, se pueden aplicar coeficientes de correlación muy sencillos como el coeficiente de Pearson o Spearman (Bernáldez y col., 2017b; Lozano-Ojalvo y col., 2013), que se han utilizado en esta Tesis Doctoral para relacionar la expresión relativa temporal de genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas con la propia producción fenotípica; o bien se puede hacer uso de técnicas de minería de datos. En esta Tesis Doctoral, dentro de las técnicas de minería de datos predictivas se han utilizado los análisis de regresión lineal (RLM) y no lineal (RI). Para ello, se utilizaron los datos de crecimiento y de producción de AFs de dos cepas de *A. flavus* y dos cepas de *A. parasiticus* obtenidos en el ensayo donde se estudió la influencia de las condiciones ambientales del proceso de secado/maduración del jamón curado. La diferencia principal que existe entre las dos técnicas de regresión es que la técnica RLM utiliza múltiples variables independientes (a_w , temperatura, tiempo) para calcular una variable dependiente (concentración de AFs), mientras que la técnica RI solo utiliza una de las variables independientes disponibles para determinar la variable dependiente. De esta manera, obtuvimos una ecuación cuando aplicamos la técnica RLM y tres ecuaciones, una para cada variable independiente (a_w , temperatura, tiempo) cuando se aplicó la técnica RI.

Independientemente de las diferencias que existen entre ambas técnicas, el rendimiento del método RLM en términos de coeficiente de correlación (R) fue de 0,76 y 0,75 para predecir la concentración de AFB₁ y AFG₁ respectivamente, siendo superior que cuando se aplicó la técnica RI (R entre 0,55 y 0,69). Según Colton, (1974) si el valor de R alcanza valores entre -1 y -0,75 o entre 0,75 y 1 la relación entre las variables es entre muy buena y excelente. A diferencia de otros modelos predictivos, nuestro estudio se basó en desarrollar un modelo matemático para poder predecir la concentración de AFs en función del tiempo (días), temperatura y a_w que se den durante el proceso de maduración del jamón curado. Otros estudios, donde se ha aplicado un modelo polinomial cuadrático para poder calcular la producción de OTA en un medio elaborado con zumo de uva mostraron un coeficiente de correlación más bajo (R^2 de 0,548) (Ioannidis y col., 2015).

García y col. (2013) utilizaron un modelo primario para la acumulación de AFB₁ por *A. flavus* aplicando la ecuación de Luedeking-Piret y encontraron que la formación de toxinas no presentaba una clara correlación con el crecimiento en ciertas condiciones. Medina y col. (2007) aplicaron un modelo polinómico de segundo orden sobre la acumulación de OTA en función de a_w , temperatura, tiempo y concentración de carbendazima y encontraron una correlación aceptable entre los valores observados y predichos del modelo, con la excepción de los valores bajos y altos de OTA donde la predicción fue más difícil. Yogendrarajah y col. (2016) utilizaron el modelo cardinal de Rosso y el modelo ampliado de Gibson siendo este último el mejor modelo para describir el efecto combinado de la a_w y temperatura en la velocidad de crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de pimienta; sin embargo, la alta variabilidad en la producción de micotoxinas impidió el desarrollo de un modelo matemático para la producción de micotoxinas en este alimento.

Otra diferencia entre nuestro modelo matemático y el desarrollado por otros autores es que no es necesaria una validación externa al modelo matemático, ya que durante el desarrollo del mismo se va validando de forma interna mediante la técnica de validación cruzada de 10 campos, la cual valida el desarrollo del mismo (Harrell y col., (1996).

A partir de los resultados obtenidos también desarrollamos una ecuación mediante el modelo de RLM para poder calcular el inicio de la producción de AFs en función de la a_w y la temperatura. Los valores de R obtenidos para predecir la concentración de AFB₁ y AFG₁ fueron 0,88 y 0,87 respectivamente. Esta ecuación nos va a permitir calcular el día en el que van a comenzar a producir AFs las cepas de *Aspergillus* spp. en función de la temperatura y la a_w . De esta manera conociendo el día aproximado en el que comenzarán a producir AFs a una a_w y temperatura concreta, podríamos modificar los parámetros ambientales durante el proceso de maduración para evitar la contaminación de los productos cárnicos con AFs.

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se deduce que el modelo desarrollado mediante la aplicación de la técnica RLM podría ser una buena herramienta para predecir la concentración y el momento en que se inicia la producción de AFs en jamón curado en función de la temperatura y la a_w alcanzadas durante el proceso de maduración de este producto cárnico. Este tipo de herramientas deberá utilizarse en un futuro próximo para la predicción de la contaminación de OTA y ACP en derivados cárnicos curado-madurados. El desarrollo de modelos predictivos de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados permite la aplicación de medidas preventivas más efectivas en los programas APPCC para controlar el peligro asociado con la presencia de estas micotoxinas en estos productos cárnicos.

V.5. BIOCONTROL DE MOHOS TOXIGÉNICOS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

El control biológico utilizando microorganismos es una alternativa cada vez más utilizada para vigilar de manera eficiente el crecimiento de mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas en una amplia gama de alimentos. Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral consistió en determinar el efecto de microorganismos habitualmente presentes en la población microbiana de los derivados cárnicos curado-madurados en el crecimiento, en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de las micotoxinas y la producción de estos metabolitos secundarios tóxicos de mohos toxigénicos que pueden crecer en la superficie de estos productos. Dentro de los microorganismos que pueden encontrarse de forma natural en estos productos cárnicos están las levaduras y mohos no toxigénicos.

En esta Tesis Doctoral se ha evaluado la efectividad como agentes de biocontrol frente a mohos productores de AFs, OTA y ACP de dos cepas aisladas de jamón curado por nuestro equipo de investigación, la levadura *D. hansenii* 253H y el moho *P. chrysogenum* CECT 20922 (Acosta y col., 2009; Andrade y col., 2014). Se han utilizado estos dos microorganismos ya que se encuentran en la población microbiana presente en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados durante el proceso de maduración y también están adaptados fenotípicamente a estos nichos, por lo tanto, deberían poder colonizar las superficies de estos productos cárnicos de manera efectiva y competir contra los mohos toxigénicos. Además, estos dos microorganismos han sido incluidos en la lista sobre Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) publicada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012). Hasta el momento, las levaduras han sido utilizadas como agentes de control biológico contra el crecimiento de *P. nordicum* y la producción de OTA en derivados cárnicos curado-madurados, principalmente en jamón curado (Andrade y col., 2014; Iacumin y col., 2017; Peromingo y col., en revisión; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012) y en embutidos curado-madurados (Comi y col., 2013a; Iacumin y col., 2017; Meftah y col., 2018). Por otro lado, la efectividad de la cepa *P. chrysogenum* CECT 20922 ha sido probada frente a mohos ocratoxigénicos y aflatoxigénicos en jamón curado (Bernáldez y col., 2014, Rodríguez y col., 2015a), sin embargo, nunca se ha estudiado el efecto de un inóculo mixto compuesto por ambos microorganismos. Además, es muy importante evaluar cómo afectan los factores ambientales relacionados con el proceso de maduración de los derivados cárnicos curado-madurados, incluyendo la temperatura y la a_w , a la capacidad antagonista tanto de la levadura como del moho productor de la proteína antifúngica frente a mohos toxigénicos y cuáles

son las condiciones ecológicas más favorables para que desarrollen su actividad antifúngica frente a la presencia de mohos toxigénicos.

V.5.1. EFECTO DE *D. hansenii* SOBRE *A. parasiticus* PRODUCTOR DE AFLATOXINAS EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Hasta el momento, aunque se había estudiado la influencia de la cepa de *D. hansenii* 253H sobre el crecimiento de *P. nordicum* y la producción de OTA en jamón curado (Andrade y col., 2014), no se había evaluado el efecto de esta levadura sobre el crecimiento de una especie productora de AFs como *A. parasiticus* y la producción de estas micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados. Este hecho junto a que tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* son capaces de crecer y producir AFs en las condiciones ambientales que ocurren durante el proceso de maduración del jamón curado tal y como ha quedado demostrado en esta Tesis Doctoral, justifican la realización de este estudio.

En los ensayos realizados en los medios de cultivo MSA, la producción de AFB₁ y AFG₁ de *A. parasiticus*, en las condiciones experimentales evaluadas, no se correlacionó con el crecimiento de esta especie de moho. Estos resultados concuerdan con lo observado por Xu y col. (2007) que demostraron que la producción de micotoxinas no se relaciona necesariamente con el crecimiento máximo del moho. Además, en la mayor a_w evaluada (0,99), la cepa de *D. hansenii* estimuló sorprendentemente la producción de AFs de *A. parasiticus* aunque no así su crecimiento. La inhibición del crecimiento puede considerarse un factor de estrés para el moho, lo que potencialmente da como resultado la activación del metabolismo secundario como una respuesta de estrés sub-lethal, con el consiguiente aumento de la producción de micotoxinas. De hecho, cuando Schmidt-Heydt y col. (2013) evaluaron el efecto de varios fungicidas comerciales, sobre el crecimiento de mohos toxigénicos, observaron que estos fungicidas inhibían en cierto modo el crecimiento de los mohos analizados, pero provocaban una mayor producción de micotoxinas, lo que sugiere que el proceso de adaptación del moho puede incluir una regulación positiva del metabolismo secundario como mecanismo de adaptación. Por otro lado, cuando la a_w del medio MSA fue de 0,97, la presencia de *D. hansenii* no afectó a los niveles de AFs producidas por *A. parasiticus* en comparación con las cantidades de AFs detectadas en ausencia de la levadura; sin embargo, en la menor a_w evaluada (0,92), la presencia de *D. hansenii* redujo significativamente la concentración de AFs sintetizada por *A. parasiticus*. En otros estudios de investigación anteriores también se ha determinado que el efecto inhibitorio de las levaduras antagónicas sobre la

producción de OTA en matrices cárnicas fue óptima en la a_w de 0,92 (Iacumin y col., 2017; Peromingo y col., en revisión; Simoncini y col., 2014). De estos resultados se deduce que el efecto inhibitorio de la levadura se vea afectado por la a_w .

Existen estudios que han evaluado el efecto de diferentes microorganismos como *Bacillus* o bacterias ácido lácticas, y mohos no toxigénicos como posibles agentes de control biológico frente a mohos aflatoxigénicos en diferentes matrices alimentarias (Ahlberg y col., 2017; Alaniz Zanon y col., 2016; Al-Saad y col., 2016; Fonseca Veras y col., 2016; Ghazvini y col., 2017; Kong y col., 2014; Mallikarjunaiah y col., 2017); sin embargo, este es el primer estudio que evalúa la capacidad antagonista de levaduras autóctonas de jamón curado frente a mohos aflatoxigénicos en medios elaborados con carne liofilizada. El efecto antagonista de *D. hansenii* en la disminución de la síntesis de AFs por parte de *A. parasiticus* en la menor a_w evaluada podría deberse a diversos mecanismos de acción. Entre los que se han sugerido destacan la competencia por los nutrientes y el espacio (Andrade y col., 2014; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012; Zhao y col., 2008), la adsorción, degradación o bloqueo de la ruta biosintética de micotoxinas (Gil-Serna y col., 2011a), degradación de micotoxinas, tal y como ha sido descrito para OTA y patulina (Castoria y col., 2011; Kapetanakou y col., 2012; Péteri y col., 2007) o, como se ha demostrado anteriormente, en el caso de algunas cepas de levadura, principalmente pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, la descontaminación de alimentos debido a su capacidad de unirse a la superficie de las AFs (Campagnollo y col., 2015; Hamad y col., 2017; Sahebghalam y col., 2013).

Así, se evaluó si uno de los mecanismos de acción de esta levadura en la inhibición de la producción de AFs por parte de *A. parasiticus* consistió en la interrupción o inhibición de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de estas micotoxinas o, si, por el contrario, su efecto se debía a otro mecanismo de acción. El estudio de este mecanismo de acción se justifica en el hecho de que en otros experimentos de esta Tesis Doctoral se ha quedado en evidencia la existencia de una fuerte correlación entre la expresión de los genes *afR* y *afS* y la producción de AFB₁ y AFG₁ por *A. parasiticus* en un medio de cultivo elaborado con jamón curado y en las condiciones ambientales relacionadas con el proceso de maduración de este producto cárnico. En estudios previos, *Bacillus megaterium* inhibió el crecimiento y la síntesis de AFs de *A. flavus* alterando la transcripción génica, especialmente provocó una elevada reducción de la expresión del gen *afS* (Kong y col., 2014), y en el estudio llevado a cabo por Al-Saad y col. (2016) se demostró que algunas bacterias inhibieron de forma significativa la expresión relativa de los genes *afD* y *afR* de *A. flavus* en medios elaborados con maíz. Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado el efecto de las levaduras como agentes de control biológico sobre la expresión de los genes

implicados en la biosíntesis de AFs. Para evaluar si existía alguna relación entre la expresión relativa temporal de los genes *afR* y *afS* a lo largo del tiempo y la presencia de *D. hansenii*, las muestras se tomaron a la mitad (día 6) y al final (día 12) del periodo de incubación. La levadura provocó una estimulación de la expresión de los dos genes reguladores en los medios con a_w de 0,99 y 0,97 en ambos días de incubación. En el caso de la a_w más baja (0,92) y a mitad del periodo de incubación, la expresión de ambos genes reguladores fue significativamente mayor cuando *A. parasiticus* se inoculó en presencia de *D. hansenii* que en su ausencia, siendo además la expresión del gen *afS* significativamente mayor a la expresión del gen *afR*. A esa misma a_w y al final del tiempo de incubación se observó una inhibición significativa de la expresión de los genes reguladores implicados en la ruta biosintética coincidiendo con una disminución en la producción de AFs de *A. parasiticus* en presencia de *D. hansenii*. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Peromingo y col., (en revisión) donde se observó que las levaduras inhibían la producción de OTA y la expresión del gen de *otanpsPN* en *P. verrucosum* a una a_w de 0,92 en un medio similar al utilizado en este estudio. Estos resultados demuestran que uno de los mecanismos de acción de esta levadura frente a *A. parasiticus* productor de AFs consiste en el bloqueo o inhibición de la expresión de genes relacionados con la producción de AFs, pudiendo proponerse como agentes de biocontrol frente a mohos aflatoxigénicos en derivados cárnicos curado-madurado.

Debido a los resultados obtenidos en este experimento inicial en medios de cultivo, el efecto de *D. hansenii* frente a *A. parasiticus* se evaluó en jamón curado y en salchichón, con el fin de investigar su posible aplicación en los propios derivados cárnicos curado-madurados. De los resultados obtenidos la concentración de AFs de *A. parasiticus* en ambas matrices cárnicas fue significativamente diferente, obteniéndose mayores cantidades en salchichón que en jamón curado. Esto se debe a que la naturaleza y cantidad de micotoxinas producidas está influenciada por la composición del sustrato, contenido de humedad, temperatura, crecimiento de la colonia del moho, presencia de otros mohos, competencia de otros microorganismos, factores de estrés, y otros factores asociados (Magan y Medina, 2016; Medina y col., 2017). La capacidad inhibitoria de esta cepa de *D. hansenii* fue confirmada en la producción de AFs en ambas matrices cárnicas siendo capaz de reducir un 63% y un 59% de AFB₁ y AFG₁ respectivamente en salchichón y un 37% y un 87% de AFB₁ y AFG₁ respectivamente en jamón curado. Andrade y col. (2014) también confirmaron el efecto antagonista de *D. hansenii* 253H frente a *P. nordicum* en jamón curado reduciendo la producción de OTA un 38% y un 20 % cuando la cepa toxigénica se inoculó junto con la levadura a una a_w de 0,84 después de 15 y 30 días de incubación.

En definitiva, este estudio sugiere que la cepa de *D. hansenii* 253H autóctona podría ser un buen candidato para el control del crecimiento de mohos aflatoxigénicos como *A. parasiticus* en derivados cárnicos curado-madurados; sin embargo, su capacidad antagonista está limitada a que el producto alcance valores de a_w próximos a 0,92 tal y como ocurre en la etapa de secado del jamón curado (Rodríguez y col., 2001). Por otro lado, la estimulación de la producción de AFs en valores de a_w elevadas sugiere que los parámetros ecológicos deben controlarse para evitar condiciones de estrés que promuevan la síntesis de estas toxinas. Aunque el efecto de la cepa de *D. hansenii* en estudio no fue suficiente para controlar completamente el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de AFs, su aplicación, junto con las buenas prácticas de elaboración de estos productos cárnicos pueden considerarse una buena medida preventiva para controlar el peligro asociado con la presencia de AFs en los derivados cárnicos curado-madurados.

V.5.2. EFECTO DE *D. hansenii* SOBRE *P. verrucosum* PRODUCTOR DE OCRATOXINA A EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Tras evaluar la actividad antagonista de la cepa de *D. hansenii* 253H frente a una cepa de *A. parasiticus* productora de AFs, se procedió a estudiar su efectividad frente a una cepa de *P. verrucosum* productora de OTA en un medio elaborado con salchichón (SBA) y en el propio embutido curado. Hasta el momento se había analizado el efecto de esta cepa de levadura frente a *P. nordicum* y *P. verrucosum* en jamón curado (Andrade y col., 2014; Peromingo y col., en revisión), con resultados bastante prometedores. En este ensayo a diferencia de los anteriormente publicados, el modo de inoculación fue diferente asemejándose al publicado por Al-Saad y col. (2016). Las temperaturas utilizadas en este ensayo son las habituales del procesado de elaboración de este embutido (10 y 15 °C) (Bernáldez y col., 2013).

En general, las cantidades de OTA producidas por *P. verrucosum* en los medios SBA y en las tres a_w evaluadas estuvieron entre 0,8 y 2,4 µg/kg, siendo similares a los valores producidos por cepas productoras de OTA en los derivados cárnicos curado-madurados (Iacumin y col., 2009, 2017; Pleadin y col., 2015c; Rodríguez y col., 2012e). Los niveles de OTA producidos por *P. verrucosum* no variaron mucho en presencia y ausencia de la levadura. Estos resultados contrastan con el estudio realizado por Iacumin y col. (2017) quienes demostraron que el uso de diferentes concentraciones de levadura *in vitro* se correlacionaba con el mayor o menor grado de inhibición del crecimiento del moho.

Analizando los resultados obtenidos más detenidamente, se observó que incluso en algunas condiciones la producción de OTA se estimuló cuando *P. verrucosum* se inoculó conjuntamente con *D. hansenii* en proporción 50:50 a una temperatura de 15 °C y a valores de a_w de 0,94 y 0,90. Estos resultados son similares a los obtenidos por Meftah y col. (2018) que demostraron que la producción de OTA de dos cepas ocratoxigénicas se incrementaba cuando se inocularon conjuntamente con otros agentes de biocontrol, además este efecto se vio estimulado cuando la concentración de sal y la temperatura eran elevadas. Esta estimulación de la producción de OTA fue inesperada, ya que las levaduras han sido propuestas como agentes de biocontrol para otras especies de moho productoras de OTA en diferentes matrices cárnicas (Andrade y col., 2014; Gerez y col., 2014; Gil-Serna y col., 2011a; Iacumin y col., 2017; Nuñez y col., 2015; Pereira y col., 2016; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012). Por otro lado, se encontró una reducción significativa de la producción de OTA por parte de *P. verrucosum* en presencia de la levadura en la condición de a_w más alta (0,97) y a 15 °C en todas las combinaciones de moho y levadura. El hecho que la levadura pueda actuar mejor a valores de a_w de 0,97 que a aquellos de 0,94 y a 0,90 puede deberse a que estos últimos medios de SBA contenían 11% y 22% de sal, respectivamente. La presencia de sal en el sustrato favorece el crecimiento de las cepas productoras de OTA frente al microorganismo antagónico ya que como se ha demostrado anteriormente las especies de mohos ocratoxigénicas son capaces de crecer en ambientes salinos y/o en alimentos con moderadas y altas concentraciones de sal donde otros mohos/microorganismos no son capaces de crecer (Comi y col., 2004; Iacumin y col., 2009; Lund y Frisvad, 2003; Peintner y col., 2000; Rodríguez y col., 2012e, 2014; Schmidt-Heydt y col., 2011;). Por ello, las diferencias que hay entre las tres a_w y las dos temperaturas podrían deberse al hecho de que la síntesis de OTA está influenciada por factores abióticos, como por la composición nutricional del medio de cultivo (Koteswara Rao y col., 2013) o por la a_w (Medina y col., 2014; Rodríguez y col., 2014). Además, la población de levaduras en los derivados cárnicos curado-madurados también va a variar dependiendo de la temperatura y las condiciones de humedad relativa durante el procesado de los mismos (Simoncini y col., 2014), provocando cambios en los microorganismos potencialmente útiles para el sabor (Cano-García y col., 2013; Purriños y col., 2013a) y en la competencia contra mohos no deseados (Asefa y col., 2009; Simoncini y col., 2014).

Las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos en este experimento con respecto a los resultados obtenidos en el experimento realizado con *A. parasiticus* y *D. hansenii* en el medio MSA en esta Tesis Doctoral, puede deberse, en primer lugar, a la forma de inoculación de la levadura, ya que, en este caso, se preparó un inóculo mixto en el que se encontraban el

microorganismo antagónico y *P. verrucosum* productor de OTA en diferentes concentraciones, mientras que en ensayo anterior la levadura se inoculó en primer lugar disolviéndose en el medio de cultivo y una vez sólido, se inocularon las esporas del moho productor de AFs en el centro de la placa. Además, otro motivo que puede haber provocado las diferencias entre los resultados encontrados, es el medio de cultivo, ya que los nutrientes y las concentraciones de sal son diferentes en ambos medios (Tablas III.5 y III.7), viéndose favorecido el crecimiento de *P. verrucosum* en el medio SBA. Por último, también puede deberse a las condiciones experimentales utilizadas, ya que en este experimento las temperaturas fueron más bajas que en el ensayo anterior. Parece que la utilización de temperatura elevada, favorece el desarrollo de *D. hansenii* respecto al moho toxigénico y, de esta manera, su actividad es mayor para competir con los mohos toxigénicos de una manera más eficaz (Asefa y col., 2009; Simoncini y col., 2014).

Aunque los resultados obtenidos en el medio de cultivo SBA no fueron muy prometedores, se evaluó la actividad de la cepa de *D. hansenii* 253H frente a *P. verrucosum* en salchichón. Para ello se inoculó la levadura junto con *P. verrucosum* en una proporción 50:50, y, a diferencia con el experimento realizado en el medio SBA, la temperatura de incubación utilizada fue de 20 °C. En la matriz cárnica, hubo una reducción del 66% de la producción de OTA cuando *P. verrucosum* se inoculó junto con *D. hansenii* después de 21 días. Núñez y col. (2015) confirmaron el efecto de *D. hansenii* 253H y otras levaduras frente a *P. verrucosum* en salchichón reduciendo significativamente la concentración de OTA en este producto cárnico, aunque, en este caso, se utilizó una HR del 84% y la concentración de esporas de *P. verrucosum* fue inferior al de las levaduras.

La obtención de información sobre el modo de acción de las levaduras sería muy útil para seleccionar aquellas cepas más efectivas frente a mohos toxigénicos (Liu y col., 2010; Sharma y col., 2009; Taczman-Brückner y col., 2005). Se ha sugerido que la competencia por nutrientes y espacio es el principal mecanismo de acción de levaduras aisladas de alimentos (Bleve y col., 2006; Cecchini y col., 2006; Kapetanakou y col., 2012; Zhao y col., 2008) y derivados cárnicos (Andrade y col., 2014; Iacumin y col., 2017; Virgili y col., 2012). El modo de inoculación conjunta del microorganismo antagónico y del moho toxigénico en este ensayo de la Tesis Doctoral permite determinar si ese fue el mecanismo de acción utilizado por la levadura (Al-Saad y col., 2016), y dado los resultados obtenidos se dedujo que éste no fue el modo de acción de la levadura para ejercer su actividad antagonista frente a *P. verrucosum* ya que no se observó una reducción del crecimiento de *P. verrucosum* cuando se inoculó en presencia y ausencia de la levadura. Por otro lado, varias levaduras mostraron una actividad antifúngica vinculada a compuestos volátiles

(Fialho y col., 2009; Masoud y col., 2005b; Núñez y col., 2015; Taczman-Brückner y col., 2005) o a proteínas *killer* (Coelho y col., 2009; Hernández y col., 2008; Santos y Marquina, 2004) y otras levaduras mostraron que tienen la capacidad de adsorber moléculas derivadas de las micotoxinas a través de la pared celular (Caridi, 2007). El bloqueo/inhibición de la expresión de genes relacionados con la producción de OTA de *P. verrucosum* provocado por *D. hansenii* podría ser también uno de los mecanismos implicados en la reducción de la OTA cuando se inoculan conjuntamente. Gil-Serna y col. (2011a) han demostrado que *D. hansenii* tiene la capacidad de reducir la expresión de los genes *pks* y *p450 - B03* relacionados con la producción de OTA de *A. westerdijkiae* cuando se inoculó conjuntamente con la levadura. Del mismo modo, Peromingo y col. (en revisión) mostraron que la cepa *D. hansenii* 253H inhibió la expresión del gen *otanpsPN* de una cepa de *P. verrucosum* en medios de cultivos elaborados con carne. Un efecto similar fue encontrado por Cubaiu y col. (2012), quienes demostraron que *Saccharomyces cerevisiae* inhibía la expresión del gen biosintético *pks* y, por tanto, la producción de OTA en *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus*. La represión de los genes implicados en la ruta biosintética de la OTA en *P. verrucosum* se ha asociado anteriormente con la imposición de condiciones de estrés (Schmidt-Heydt y col., 2007) en las que podría incluirse la presencia de *D. hansenii*. Rodríguez y col. (2014) confirmaron la naturaleza predictiva de los datos de expresión del gen *otapksPN* y *otanpsPN* con respecto a la producción de OTA. Por este motivo, se evaluó si el efecto antagonista de *D. hansenii* frente a *P. verrucosum* en salchichón se debía a que ejercía algún efecto en los genes implicados en la producción de OTA. Se detectaron niveles transcripcionales reducidos en presencia de *D. hansenii* a los 14 días de incubación, que se asociaron con una disminución de la producción de de OTA por la cepa ocratoxigénica a los 21 días de incubación, por lo que estos resultados sugieren que la menor cantidad de OTA producida por *P. verrucosum* está mediada a nivel transcripcional cuando se inocula conjuntamente con *D. hansenii*. Además, Núñez y col. (2015) demostraron que *D. hansenii* 253H también produce unos compuestos volátiles tales como 2-metil-1butanol capaces de reducir significativamente el crecimiento de *P. verrucosum*. Sin embargo, en este experimento se observa que la represión de la expresión del gen *otapksPN* y *otanpsPN* de *P. verrucosum* producida por *D. hansenii* no fue suficiente para suprimir completamente la producción de OTA.

De los resultados de este trabajo se deduce que *D. hansenii* puede ser utilizada como agente de biocontrol en los derivados cárnicos curado-madurados para reducir el peligro asociado con la presencia de OTA. Este estudio demostró que las cepas de *D. hansenii* aisladas de productos cárnicos pueden reducir la producción de OTA de *P. verrucosum* en las condiciones

ambientales que generalmente se encuentran durante la maduración de estos productos cárnicos. Tal reducción parece deberse a mecanismos sinérgicos, incluido el efecto a nivel transcripcional, por lo tanto, el uso de cultivos iniciadores de *D. hansenii* con actividad antifúngica, combinado con una aplicación apropiada de las acciones higiénicas y el control de la temperatura y la humedad relativa durante el proceso de maduración, ayudarían a minimizar los riesgos debido al desarrollo de OTA en los productos cárnicos curado madurados.

V.5.3. EFECTO DE *D. hansenii* Y *P. chrysogenum* SOBRE *P. griseofulvum* PRODUCTOR DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Finalmente se decidió evaluar en esta Tesis Doctoral la influencia de un cultivo protector mixto compuesto por dos microorganismos aislados del jamón curado (*D. hansenii* 253H y *P. chrysogenum* CECT 20922) frente a dos cepas de *P. griseofulvum* productoras de ACP en piezas de jamón curado después de 21 días de incubación a 20 °C. La actividad inhibidora de *D. hansenii* que fue capaz de reducir significativamente la concentración tanto de AFs como de OTA producidas por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* en jamón curado y salchichón ya ha quedado demostrada en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral y en otros estudios anteriores (Andrade y col., 2014; Núñez y col., 2015; Peromingo y col., revisión). En el caso de la cepa de *P. chrysogenum* CECT 20922, productora de la proteína antifúngica PgAFP, también se había demostrado un efecto importante sobre el crecimiento de mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas en alimentos madurados (Bernáldez y col., 2014; Delgado y col., 2015; Rodríguez y col., 2015a).

El hecho de que las cepas de *P. griseofulvum* no fueran capaces de crecer en los medios MBA y DHA con una a_w de 0,85, hizo que la preparación y esterilización de las piezas de jamón fue ligeramente diferente a las de los otros experimentos, y que después del proceso de esterilización, las piezas de jamón alcanzaran valores de a_w de 0,846. Por este motivo, las lonchas se rehidrataron hasta un valor de a_w de 0,879, y así asegurarnos el crecimiento de los microorganismos. De los resultados obtenidos se puede observar que después del periodo de incubación, el cultivo protector mixto redujo la concentración de ACP de ambas cepas de *P. griseofulvum* un 79% con respecto a los controles (en ausencia del cultivo protector mixto). Debido a que no existen estudios previos relacionados con la utilización de un cultivo mixto compuesto por los mismos microorganismos no se pudieron comparar los resultados descritos en esta Tesis Doctoral.

A partir de los resultados obtenidos en los tres estudios realizados de biocontrol, en este último estudio donde se utilizaron ambas cepas de microorganismos antagonistas fue donde hubo una mayor reducción de la producción de la micotoxina. Teniendo en cuenta que en esta Tesis doctoral se ha demostrado que la cepa de *D. hansenii* utilizada es capaz, entre otros mecanismos de acción, de bloquear la ruta biosintética de las micotoxinas en los derivados cárnicos, se evaluó si en este ensayo la levadura y/o el moho ejercían alguna influencia en la expresión de los genes *dmr1*, *pks-nrps* y *mfs-1* implicados en la biosíntesis de ACP de las cepas de *P. griseofulvum* siendo éste el modo de acción del cultivo protector mixto. Además, se examinó también la expresión del gen *pgafp* que codifica para la proteína antifúngica PgAFP de *P. chrysogenum*, para determinar si la inhibición de la producción de ACP por parte de las cepas de *P. griseofulvum* es debido a la acción antifúngica de la proteína PgAFP.

De los resultados obtenidos, se observan dos comportamientos muy diferentes del cultivo protector dependiendo de la cepa de *P. griseofulvum* utilizada. En el caso de la cepa IBT 14319, se observó una estimulación de la expresión del gen *pgafp* y una represión de la expresión de uno de los genes implicados en la ruta biosintética del ACP. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Bernáldez y col. (2014) y Rodríguez y col., (2015a) quienes demostraron que *P. chrysogenum*, mediante la acción de la proteína antifúngica PgAFP, pudo evitar la contaminación de jamón curado con AFs producida por *A. flavus* y la acumulación de OTA producida por cepas de *Penicillium*, respectivamente. Esto parece indicar que el modo de acción del cultivo protector mixto se debe especialmente al efecto antagónico de la proteína PgAFP frente a la cepa toxigénica de *P. griseofulvum*. Esto no quiere decir, que la levadura no sea capaz de actuar frente al moho toxigénico, ya que Delgado y col. (2015) evaluaron el efecto de la proteína PgAFP sobre el crecimiento de mohos toxigénicos, levaduras y bacterias y comprobaron que la proteína solo afectaba al desarrollo de los mohos toxigénicos. Además, también se observó una inhibición en la expresión del gen *pks-nrps* que, tal y como ocurre en los ensayos anteriores de biocontrol frente a otros mohos toxigénicos, es posible que la cepa de *D. hansenii* utilizada sea capaz de utilizar este mecanismo de acción frente a mohos productores de ACP.

Por otro lado, el modo de acción del cultivo protector mixto frente a la cepa CECT 2919 fue diferente. En este caso no se observó ni estimulación en la expresión del gen *pgafp* ni tampoco hubo represión en la expresión de los genes relacionados con el ACP; sin embargo, este cultivo protector fue capaz de reducir significativamente la concentración de ACP en el jamón curado en la misma medida que en la otra cepa de *P. griseofulvum* estudiada. Con los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral no podemos sacar una conclusión sobre el mecanismo de acción

de este cultivo protector mixto. Si bien, se pueden intentar obtener algunas hipótesis. Delgado y col. (2015) demostraron que la cepa de *P. griseofulvum* CECT 2919 mostraba cierta resistencia frente a la proteína PgAFP en caldo YES, quizás por este motivo, al ser el jamón curado una matriz más compleja que dificulta el desarrollo de los microorganismos es posible que el moho toxigénico haya sido capaz de frenar el efecto de la proteína antifúngica. Con respecto al efecto de la levadura, no necesariamente va a actuar siempre de la misma manera, ya que se ha demostrado que la cepa *D. hansenii* 253H es capaz de inhibir la producción de OTA, por la competencia por los nutrientes y el espacio (Andrade y col., 2014), por la producción de compuestos volátiles (Núñez y col., 2015) o por la inhibición de la expresión de genes relacionados con la síntesis de esta micotoxina (Peromingo y col., en revisión).

En definitiva, el cultivo protector mixto utilizado en este estudio sugiere que puede utilizarse para controlar la producción de ACP en derivados cárnicos curado-madurados durante el proceso de maduración de estos productos. Sin embargo, el crecimiento de estos microorganismos antagonistas y su actividad antifúngica va a depender de la cepa toxigenica a la que se enfrenten en los derivados cárnicos curado-madurados y, además, también pueden verse afectados por otras características del alimento como la a_w , la temperatura o la composición química (Delgado y col., 2015; Simoncini et al., 2014). Por ello, son necesarios más estudios para poder entender los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol y evaluar su efecto sobre otras cepas toxigénicas encontradas habitualmente en los derivados cárnicos curado-madurados y así poder aplicarlos de manera más eficaz en las industrias cárnicas. Este tipo de herramientas deberá utilizarse en un futuro próximo para controlar la contaminación de OTA y AFs en derivados cárnicos curado-madurados.

VI. CONCLUSIONES

VI.1. CONCLUSIONES

1. Las micotoxinas y metabolitos secundarios tóxicos producidos por cepas del género *Penicillium* en derivados cárnicos curado-madurados difunden al interior de estos alimentos, por lo que es necesario establecer medidas preventivas para controlar este peligro durante la maduración de estos productos.
2. La combinación de un protocolo de extracción de ácido ciclopiazónico basado en la metodología QuEChERS y de un método de uHPLC-MS/MS permiten la detección y cuantificación rápida, económica y sensible de la micotoxina en jamón curado.
3. Las condiciones ambientales relacionadas con la maduración de los derivados cárnicos curado-madurados y el sustrato cárnico afectan significativamente al crecimiento, la expresión génica y la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico de los mohos toxigénicos.
4. Las técnicas de minería de datos aplicadas permiten determinar la concentración de aflatoxinas y el momento en que se inicia su síntesis en jamón curado.
5. *D. hansenii* controla la producción de aflatoxinas y ocratoxina A de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados.
6. Tanto *D. hansenii* como *P. chrysogenum*, productor de la proteína antifúngica PgAFP, reducen la concentración de ácido ciclopiazónico en jamón curado.
7. La combinación de los factores ambientales y los microorganismos autóctonos como agentes de biocontrol, pueden utilizarse como estrategias que controlen el desarrollo de los mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.

VI.2. CONCLUSIONS

1. Mycotoxins and other secondary metabolites produced by strains from *Penicillium* genus in dry-cured meat products diffuse into the inner core of these foods, so that it is necessary to establish preventive actions to control risk associated with mycotoxins during the ripening of these products.
2. The combination of a QuEChERS-based extraction method and analysis by uHPLC-MS/MS allows highly sensitive, fast, reliable and cheap detection and quantification of cyclopiazonic acid in dry-cured ham.
3. Environmental conditions related to the ripening process of dry-cured meat products and matrix itself significantly affect growth, gene expression and production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by toxigenic moulds.
4. The applied data mining techniques allow determining concentration of aflatoxins and the time when aflatoxins begin to occur in dry-cured ham.
5. *D. hansenii* controls production of aflatoxins and ochratoxin A by toxigenic moulds in dry-cured meat products.
6. *D. hansenii* and *P. chrysogenum* 'producer of the antifungal protein PgAFP' lower cyclopiazonic acid concentration in dry-cured ham.
7. The combination of environmental factors and autochthonous microorganisms as biocontrol agents can be used as strategies to encounter colonization of toxigenic moulds and mycotoxin production in dry-cured meat products.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hadi, A., Caley, D.P., Carter, D.R., Magan, N. (2011). Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting *afD* (*nor-1*) gene. *Toxins* 3, 647–659.
- Abdel-Hadi, A., Carter, D., Magan, N. (2010). Temporal monitoring of the *nor-1* (*afD*) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B₁ production during storage of peanuts under different water activity levels. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1914–1922.
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface*, 9, 757–767.
- Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Martín, A., Núñez, F., Asensio, M.A. (2009) Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 39–46.
- Ahlberg, S., Joutsjoki, V., Laurikkala, S., Varmanen, P., Korhonen, H., (2017). *Aspergillus flavus* growth inhibition by *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented Kenyan milk and maize products. *Archives of Microbiology*, 199, 457–464.
- Ahmad, M.M., Ahmad, M., Ali, A., Hamid, R., Javed, S., Abdin, M.Z. (2014). Detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from aflatoxin-contaminated peanuts and their differentiation using PCR-RFLP. *Annals of Microbiology*, 64, 1597–1605.
- Alakomi, H.-L., Maukonen, J., Honkapaa, K., Storgards, E., Quirin, K.W., Yang, B., Saarela, M. (2017). Effect of plant antimicrobial agents containing marinades on storage stability and microbiological quality of broiler chicken cuts packed with modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 80, 1689–1696.
- Alaniz Zanon, M.S., Barros, G.G., Chulze, S.N. (2016). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 63–68.
- Alapont, C., López-Mendoza, M.C., Gil, J.V., Martínez-Culebras, P.V. (2014). Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. *Food*

- Additives & Contaminants Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 31, 93–104.
- Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A., Vreeken, R.J., Driessen, A.J. (2013). A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. PLoS One 8, 65328.
- Alía, A., Andrade, M.J., Rodríguez, A., Reyes–Prieto, M., Bernáldez, V., Córdoba J.J. (2016). Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry–cured ham. Meat Science, 122, 16–24.
- Al–Saad, L.A., Al–Badran, A.I., Al–Jumayli, S.A., Magan, N., & Rodríguez, A. (2016). Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, *afD* and *afR* expression, and phenotypic aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes. International Journal of Food Microbiology, 217, 123–129.
- Amézqueta, S., Schorr–Galindo, S., Murillo–Arbizu, M., González–Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, J.P. (2012). OTA–producing fungi in foodstuffs: A review. Food Control 26, 259–268.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid–phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International, 86, 412–431.
- Andersen, B., Frisvad, J. C. (2004a). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7507–7513.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C. (2004b). Consistent production of patulin, chaetoglobosins and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 2421–2428.
- Andrade, M.J., Rodriguez, M., Casado, E.M., Bermudez, E., Cordoba, J.J. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichon”. Meat Science, 85, 256–264.

- Andrade, M.J., Rodríguez, M., Casado, E.M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J. (2009). Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiology*, 26, 578–586.
- Andrade, M.J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Jespersen, L. (2014). Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 70–77.
- Andrés, A.I., Ventanas, S., Ventanas, J., Cava, R. (2005). Physicochemical changes throughout the ripening of dry-cured hams with different salt content and processing conditions. *European Food Research and Technology*, 221, 30–35.
- Annunziata, L., Stramenga, A., Visciano, P., Schirone, M., De Coli, L., Colagrande, M.N., Campana, G., Scortichini, G. (2017). Simultaneous determination of aflatoxins, T-2 and HT-2 toxins, and fumonisins in cereal-derived products by QuEChERS extraction coupled with LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 5143–5155.
- Ansari, P., Häubl, G. (2016). Determination of cyclopiazonic acid in white mould cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using a novel internal standard. *Food Chemistry*, 221, 978–982.
- Araguas, C., González-Peñas E., López de Cerain, A., Bello, J. (2003). Acerca de la posible contaminación por Ocratoxina A en alimentos I: Cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la comunidad foral de Navarra. *Alimentaria*, 343, 23–9.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A., Roncada, P. (2016). Ochratoxin A in artisan salami produced in Veneto (Italy). *Food Additives & Contaminants: Part B, Surveillance*, 9, 9–14.
- Asefa, D.T., Moretro, T., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Kure, C.F., Sidhu, M.S. (2009). Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 135–140.
- Asensio, M.A., Núñez, F., Bermúdez, E., Martín, A., Alonso, M., Acosta, R., Sosa, M.J., Córdoba, J.J. (2004). Interés Del Control de los mohos en el jamón curado. *Avances en la ciencia y Tecnología y comercialización del jamón*, Editorial Con jamón.
- Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE). (2016). El sector cárnico español. *Jornada ANICE 2016*. Madrid, España.

- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Marín, S., Ramos, A. (2014). Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology*, 38, 276–283.
- Bae, U.J., Song, M.Y., Jang, H.Y., Lim, J.M., Lee, S.Y., Ryu, J.H., Park, B.H. (2015). Emodin isolated from *Rheum palmatum* prevents cytokine-induced β -cell damage and the development of type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, 16, 9–19.
- Bailly, J. D., Tabuc, C., Quérin, A., & Guerre, P. (2005). Production and stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured ham. *Journal of Food Protection*, 68, 1516–1520.
- Banach, J., Stratakou, I., Fels-Klerx, H., Besten, H. (2016). European alerting and monitoring data as inputs for the risk assessment of microbiological and chemical hazards in spices and herbs. *Food Control*. 69, 237–249.
- Banani, H., Marcet-Houben, M., Ballester, A.R., Abbruscato, P., González-Candelas, L., Gabaldón, T., Spadaro, D. (2016). Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics*, 17–19.
- Baquião, A.C., Lopes, E.L., Corrêa, B. (2016). Molecular and mycotoxigenic biodiversity of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts. *Food Research International*, 89, 266–271.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Battilani, P., Formenti, S., Toscani, T., Virgili, R. (2010). Influence of abiotic parameters on ochratoxin A production by a *Penicillium nordicum* strain in dry-cured meat model systems. *Food Control* 21, 1739–1744.
- Battilani, P., Pietri, V.A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection*, 70, 975–980.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.A., Yusà, V. (2011). UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M₁ and ochratoxin A in baby food and milk. *Food chemistry*, 126, 737–744.

- Bennett, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Alía, A., Rodríguez, A. (2017a). Selection of reference genes to quantify relative expression of ochratoxin A-related genes by *Penicillium nordicum* in dry-cured ham. *Food Microbiology*, 68, 104–111.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Magan, N., Peromingo, B., Rodríguez, A. (2017b). The influence of ecophysiological factors on growth, *afR* gene expression and aflatoxin B₁ production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *LWT – Food Science and Technology*, 83, 283–291.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A., (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Control*, 32, 69–76.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Martín, A., Lozano, D., Córdoba, J.J. (2014). Development of a multiplex qPCR method for simultaneous quantification in dry-cured ham of an antifungal-peptide *Penicillium chrysogenum* strain used as protective culture and aflatoxin-producing moulds. *Food Control*, 36, 257–265.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2007). Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 33–37.
- Bertuzzi, T., Gualla, A., Morlacchini, M., Pietri, A. (2013). Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control*, 34, 79–83.
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Pietri, A. (2015). *Aspergillus* and *Penicillium* toxins in chestnuts and derived produced in Italy. *Food Control*, 50, 876–880.
- Bhatnagar, D., Cary, J.W., Ehrlich, K., Yu, J., Cleveland, T.E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162, 155–166.
- Bhatnagar, D., Yu, J., Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*, 81,167–206.

- Bintvihok, A., Treebonmuang, S., Srisakwattana, K., Nuanchun, W., Patthanachai, K., Usawang, S. (2016). A rapid and sensitive detection of aflatoxin-producing fungus using an optimized polymerase chain reaction (PCR). *Toxicological Research*, 32, 81–87.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 204–209.
- Bogs, C., Battilani, P., Geisen, R. (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 39–47.
- Borge, L. (1985). Estimación y contrastes de hipótesis en el modelo lineal general con restricciones de desigualdad. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. Valladolid, España.
- Breuer, U., Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–437.
- Brunelle, B.W., Nicholson, T.L. (2007). Microarray-based approach for genome-wide survey of nucleotide polymorphisms. *Methods in Molecular Biology* 396, 267–79.
- Burdock, G.A., Flamm, W.G. (2000). Review article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology*, 19, 195–218.
- Buscailhon, S., Monin, G., Cornet, M., Bousset, J. (1994). Time-related changes in nitrogen fractions and free amino acids of lean tissue of French dry-cured ham. *Meat Science*, 37, 449–456.
- Cabañes, F.J., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. (2007). Especies productoras de micotoxinas. En: *Micotoxinas en Alimentos*. Ed. Soriano del Castillo, J.M. Díaz de Santos. Madrid, España. 29–61.
- Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N., (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1215–1221.

- Cakmakci, S., Gurses, M., Hayaloglu, A.A., Cetin, B., Sekerci, P., Dagdemir, E. (2015). Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Foreword, 32, 245–249.
- Campagnollo, F.B., Franco, L.T., Rottinghaus, G.E., Kobashigawad, E., Ledoux, D.R., Daković, A., Oliveira, C.A.F. (2015). In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Research International*, 77, 643–648.
- Cano-García, L., Flores, M., Belloch, C. (2013). Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food Research International*, 52, 42–49.
- Caridi, A. (2007). New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 167–172.
- Carrizosa, E., Benito, M.J., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Villalobos, M.C., Martín, A., Córdoba, M.D.G. (2017). Bacterial communities of fresh goat meat packaged in modified atmosphere. *Food Microbiology* 65, 57–63.
- Casquete, R., Benito, M.J., Córdoba, M.G., Ruíz-Moyano, S., Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100, 6987–6996.
- Casquete, R., Benito, M.J., Córdoba, M.G., Ruíz-Moyano, S., Galván, A.I., Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 179–185.
- Castellá, G., Alborch, L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. (2015). Real time quantitative expression study of a polyketide synthase gene related to ochratoxin a biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Food Control*, 53, 147–150.
- Castoria R., Mannina L., Durán-Patrón, R., Maffei, F., Sobolev, A.P., De Felice, D.V., Pinedo-Rivilla, C., Ritieni, A., Ferracane, R., Wright, S.A.I. (2011). Conversion of the mycotoxin

- patulin to the less toxic desoxyapatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11571–11578.
- Cecchini, F., Morassut, M., García Moruno, E., Di Stefano, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and redmust. *Food Microbiology*, 23, 411–417.
- Chang, P.K. (2003). The *Aspergillus parasiticus* protein *afJ* interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator *afR*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268, 711–719.
- Chang, P.K., Ehrlich, Fujii K.C. (2009a). Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Toxins*, 1, 74–99.
- Chang, P.K., Horn, B.W., Dorner, J.W. (2009b). Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 176–182.
- Chang, P.-K., Scharfenstein, L.L., Li, R.W., Arroyo-Manzanares, N., De Saeger, S., Diana Di Mavungu, J. (2017). *Aspergillus flavus aswA*, a gene homolog of *Aspergillus nidulans oefC*, regulates sclerotial development and biosynthesis of sclerotium-associated secondary metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 104, 29–37.
- Chen, X., Li, X., Pang, K., Fan, X., Ma, Y., Hu, J. (2018). Dissipation behavior and residue distribution of fluazaindolizine and its seven metabolites in tomato ecosystem based on SAX SPE procedure using HPLC–QqQ–MS/MS technique. *Journal of Hazardous Materials* 342, 698–704.
- Chhotaray, A., Dhua, U., Behera, L., Mukherjee, A.K. (2015). Detection of seedborne *Aspergillus flavus* from rice cultivars using molecular markers. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48, 297–305,
- Chulze, S.N., Ramírez, M.L., Torres, A.M. (2011). Micotoxinas y el ser humano. En: *Micotoxinas y Micotoxicosis*. Ed. Ramos, A.J. Madrid, España. 349–371.
- Cigic, I.K., Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 62–115.

- Coelho, A.R., Tachi, M., Pagnocca, F.C., Nobrega, G.M.A., Hoffmann, F.L., Harada, K.-I., Hirooka, E.Y. (2009). Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26, 73–81.
- Cole, R.J., Dorner, J.W., Cox, R.H., Raymond, L.W. (1983). Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* Thom isolated from contaminated beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 655–657.
- Colton, T. (1974) *Statistics in Medicine*. Ed. Little Brown Co. Nueva York, Nueva York, EE.UU.
- Comi, G., Chiesa, L., Panseri, S., Orlic, S., Iacumin, L. (2013a). Evaluation of different methods to prevent *Penicillium nordicum* growth on and ochratoxin A production in country-style sausages. *World Mycotoxin Journal*, 6, 411–418.
- Comi, G., Iacumin, L. (2013b). Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry-cured ham. *Food Research International*, 54, 1113–1119.
- Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., Iacumin, L., (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-seasoning and seasoning level. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 29–34.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H., Taniwaki, M.H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 141–144.
- Córdoba, J.J., Antequera, T., García, C., Ventanas, J., López-Bote, C., Asensio, M.A. (1994). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2296–2301.
- Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D., (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 93–109.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A.D.W., Budroni, M., Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins (Basel)*, 4, 1468–1481.

- Cunha, S., Fernandes, J. (2010). Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC–MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of Separation Science*, 33, 600–609.
- Da Cruz Cabral, L., Terminiello, L., Fernández–Pinto, V., Fog Nielsen, K., Patriarca, A. (2016). Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 155–160.
- Da Silva, S.A., Sampaio, G.R., da Silva Torres, A.F. (2017). Optimization and validation of a method using UHPLC–fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814.
- Dagnas, S.P., Membré, J–M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, 76, 538–551.
- Dall’Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Noseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., Marchelli, R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry*, 120, 978–983.
- Dall’Asta, C., De Dea L., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., Marchelini, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106, 729–734.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 187–196.
- De Jesús, A. E., Steyn, P.S., Vleggaar, R., Kirby, G.W., Varley, M.J., Ferreira, N.P. (1981). Biosynthesis of α -cyclopiazonic acid. Steric course of proton removal during the cyclisation of β -cyclopiazonic acid in *Penicillium griseofulvum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. 1*, 3292–3294.
- De Waal, E.J. (2002). Letter to the Editor—Safety assessment of cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology*, 21, 425–427.
- Delgado, J., Acosta, R., Rodríguez–Martín, A., Bermúdez, E., Núñez, F., Asensio, M.A. (2015). Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 23–29.

- Delgado, J., Owens, R.A., Doyle, S., Núñez, F., Asensio, M.A. (2017). Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. *Food Microbiology*, 66, 1–10.
- Delgado, J., Peromingo, B., Núñez, F., Asensio, M.A. (2016). Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion in Food Science*, 11, 40–45.
- Di Cagno, R., Cháves López, C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W., Gobbetti, M. (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science* 79, 224–235.
- Díaz, G.J., Thompson, W., Martos, P.A. (2010). Stability of cyclopiazonic acid in solution. *World Mycotoxin Journal*, 3, 25–33.
- Dietterich, T. (1998). Approximate statistical tests for comparing supervised classification learning algorithms. *Neural computation*, 10, 1895–1923.
- Documento SANCO/12495/2011 (2011). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. <http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/fv/SANCO12495-2011.pdf> (acceso el día 12.11.2013).
- Dordević, J., Pavlicevic, N., Boskovic, M., Janijc, J., Glisic, M., Starcevic, M., Baltic, M.Z. (2017). Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on microbiological properties of cold-smoked trout. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85, 012084.
- Dorne, J.L.C.M., Bordajandi, L.R., Amzal, B., Ferrari, P., Verger, P. (2009). Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 695–707.
- Druvefors, U. A., Schnürer, J. (2005). Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research*, 5, 373–378.
- Du, W., Obrian, G.R., Payne, G.A. (2007). Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants* 24, 1043–1050.

- Durán, R.M., Cary, J.W., Calvo, A.M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *verA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1158–1168.
- EFSA European Food Safety Authority, (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9, 97.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), (2012). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA Journal*, 10, 3020.
- Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Montalbano, B.G. (1999a). Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein *afR*. *BBA – Gene Structure and Expression*, 1444, 412–417.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W. (1999b). Binding of the C6–zinc cluster protein, *afR*, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene* 230, 249–257.
- Elhariry, H., Bahobial, A.A., Gherbawy, Y. (2011). Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 941–946.
- Ellis, D.F. (2001). Meat smoking technology. Meat fermentation technology. In *Meat Science and Applications*, edited by Y.H. Hui, W.K. Nip, R.W. Rogers, and O.A. Young. New York: Marcel Dekker.
- Escher, F.E., Koehler, P.E., Acyres, J.C. (1973). Production of ochratoxin A and B on country cured ham. *Applied of Microbiology*, 26, 27–30.
- Fadda, S., López, C., Vignolo, G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, 86, 66–79.
- Fanali, C., D'Orazio, G., Fanali, S., & Gentili, A. (2017). Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 87, 82–97.

- Fanelli, F., Schmidt–Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A., Mulè, G. (2012). Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM₁ gene expression by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 148–153.
- Fayyad, U., Piatetsky–Shapiro, G., Smyth, P. (1996). From data mining to knowledge discovery in databases. *AI Magazine*, 17, 37–54.
- Feng, G.H., Leonard, T.J. (1998). Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2275–2277.
- Fernández, M., Keller, N.P., Adams, T.H. (1998). Sequence–specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 28, 1355–1365.
- Fernández–Bodega, M.A., Mauriz, E., Gómez, A., Martín, J.F. (2009). Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue–veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 18–25.
- Fernández–Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O., Vaamonde, G. (2001). Natural cooccurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additives & Contaminants*, 18, 1017–1020.
- Ferrara, M., Magistà, D., Lippolis, V., Cervellieri, S., Susca, A., Perrone, G. (2016). Effect of *Penicillium nordicum* contamination rates on ochratoxin A accumulation in dry–cured salami. *Food Control*, 67, 235–239.
- Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F., Pascholati, S.F. (2009). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 925–932.
- Filténborg, O., Frisvad, J., Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 85–102.
- Finkelstein, E., Amichai, B., Grunwald, M.H. (1996). Griseofulvin and its uses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 6, 189.

- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., Franzetti, L. (1999). Production of cyclopiazonic acid by molds isolated from taleggio cheese. *Journal of Food Protection*, 62, 1198–1202.
- Fisvad, J.C., Thrane, U. (1987). Standardized high–performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and uv–vis spectra (diodearray detection). *Journal of Chromatography*, 404, 195–214.
- Foltinová, D., Tancinová, D., Císarová, M. (2017). Influence of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11, 322–331.
- Fonseca Veras, F., Folmer Correa, A.P., Welke, J.E., Brandelli, A. (2016). Inhibition of mycotoxin–producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 23–32.
- Fontaine, K., Passerò, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J.L., Mounier, J., Coton, E. (2015). Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M₁ mycotoxins in blue–veined cheeses. *Food Control*, 47, 634–640.
- Freire, F., Kozakiewics, Z., Paterson, R. (2000). Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149, 13–19.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., Pitt, J.I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 3–31.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 201–241.
- Gallo, A., Ferrara, M., Perrone, G. (2017). Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. *Current Opinion in Food Science*, 17, 49–56.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162–169.
- Gallo, A., Stea, G., Battilani, P., Logrieco, A.F., Perrone, G. (2012). Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 198–206.

- Galvalisi, U., Lupo, S., Piccini, J., Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 36–42.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology*, 26, 757–769.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 28, 406–417.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. (2013). Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 182–189.
- García-Estrada, C., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Fernández-Bodega, M.A., Durek, P., von Döhren, H., Martín, J.F. (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. *Chemistry & Biology*, 18, 1499–1512.
- García-Rico, R.O. Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J.F., Vaca, I., Figueroa, L., Levicán, G., Chávez, R., (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biology*, 121, 754–762.
- Garmendia, G., Umpierrez-Failache, M., Ward, T.J., Vero, S. (2018). Development of a PCR-RFLP method based on the transcription elongation factor 1- α gene to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the *Fusarium graminearum* species complex. *Food Microbiology*, 70, 28–32.
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Färber, P. (2004). Development of a Real Time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 501–507.
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz A. (2006). A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Research*, 22, 134–141.

- Geisen, R., Stoll, D., Schmidt–Heydt, M. (2013). Differences in the regulation of ochratoxin a by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. *Toxins*, 5, 1282–1298.
- Georgianna, D.R., Payne, G. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 113–125.
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., Audenaert, K. (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*. 69, 65–73.
- Gerez, C.L., Dallagnol, A., Ponsone, L., Chulze, S., Valdez, G.F. (2014). Ochratoxin A production by *Aspergillus Niger*: Effect of water activity and a biopreserver formulated with *Lactobacillus plantarum* CRL 778. *Food Control*, 45, 115–119.
- Ghazvini, R.D., Kouhsari, E., Zibafar, E., Hashemi, S.J., Amini, A., Niknejad, F. (2017). Antifungal activity and aflatoxin degradation of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus fermentum* against Toxigenic *Aspergillus parasiticus*. *The Open Microbiology Journal*, 10, 197–201.
- Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A., Ziino, G., Panebianco, A. (2014). Characterisation of yeasts isolated from 'Nduja of spilinga. *Italian Journal of Food Safety*, 3, 78–80.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, I.J., Eyles, M.J., Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 419–431.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D. (1997). Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 353–358.
- Gil–Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González–Jaén, M.T., Vázquez, C. (2011a). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology* 151, 113–118.
- Gil–Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González–Jaén, M.T., Patiño, B. (2011b). Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*.

- Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22, 343–345.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N. (2008). Effect of aw and CO₂ level of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 109–113.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Battilani, P. (2011). Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*, 4, 425–432.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* selection *Flavi* isolated in northern Italy from maize. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330–338.
- Gómez-Ramos, M.M., Rajski, L., Heinzen, H., Fernández-Alba, A.R. (2015). Liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry with simultaneous full scan and tandem MS/MS for highly selective pesticide residue analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 6317–6326.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. (2009). Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 57–66.
- Gori, K., Sorensen, L.M., Petersen, M.A., Jespersen, L., Arneborg, N. (2012). *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese–surface model. *Microbiology Open*, 1, 161–168.
- Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 254–262.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. (1996). Coproduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. *Food Additives & Contaminants*, 13, 677–685.

- Hamad, G.M., Zahran, E., Hafez, E.E., (2017). The efficacy of bacterial and yeasts strains and their combination to bind aflatoxin B₁ and B₂ in artificially contaminated infants food. *Journal of Food Safety*, 12365.
- Harris, J.P., Mantle, P.G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58, 709–716.
- Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. (2001). *The elements of statistical learning: data mining. Inference and Prediction*. Ed. Springer–Verlag, New York, New York, U.S.A.
- Hayashi, Y., Yoshizawa, T. (2005). Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. *Food Chemistry*, 93, 215–221.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M.G., Benito, M.J., Aranda, E., Pérez–Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178–188.
- Hernández–Hierro, J.M., García–Villanova, R.J., Torrero, P.R., Fonseca, I.M.T. (2009). Aflatoxins and Ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 361–365.
- Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Montero, O., Fernández–Bodega, M.Á., García–Estrada, C., Fernández–Aguado, M., Martín, J.F. (2014). Molecular characterization of the PR–toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics and Biology*, 62, 11–24.
- Holzappel, C.W. (1968). The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 24, 2101–2119.
- Hong, E.J., Kim, N.K., Lee, D., Kim, W.G., Lee, I. (2015). Overexpression of the *laeA* gene leads to increased production of cyclopiazonic acid in *Aspergillus fumisynnematus*. *Fungal Biology*, 119, 973–983.
- Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., Ren, Y. (2010). Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in peanuts and their derivative products by ultra–high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662, 62–68.

- Huff, W.E., Hamilton, P.B. (1979). Mycotoxins: their biosynthesis in fungi. Ochratoxins metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42, 815–820.
- Hwang, J.K., Noh, E.M., Moon, S.J., Kim, J.M., Kwon, K.B., Park, B.H., You, Y.O., Hwang, B.M., Kim, H.J., Kim, B.S., Lee, S.J., Kim, J.S., Lee, Y.R. (2013). Emodin suppresses inflammatory responses and joint destruction in collagen-induced arthritic mice. *Rheumatology*, 52, 1583–1591.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, 26, 65–70.
- Iacumin, L., Manzano, M., Andyanto, D., Comi, G. (2017). Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. *Food Microbiology*, 62, 88–195.
- IARC (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC monograph on the evolution of carcinogenic risks to humans, 56.
- IARC (2002). Aflatoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. IARC. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia, 82, 171–285.
- Ioannidis, A.G., Kogkaki, E.A., Natskoulis, P.I., Nychas, G.J.E. and Panagou, E.Z. (2015). Modelling the influence of temperature, water activity and sodium metabisulphite on the growth and OTA production of *Aspergillus carbonatus* isolated from Greek wine grapes. *Food Microbiology*, 49, 12–22.
- Iqbal, S.Z., Rabbani, T., Asi, M.R., Jinap, S. (2014b). Assessment of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals. *Food Chemistry*, 157, 257–262.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Jinap S., Rashid, U. (2014a). Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. *Food Control*, 35, 223–226.
- Jayashree, T., Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 981–985.

- Juan, C., Berrada, H., Mañes, J., Oueslati, S. (2017a). Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 148–156.
- Juan, C., Mañes, J., Font, G., Juan-García, A. (2017b). Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 344–351.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M.T. (2008). Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2032–2036.
- Jureen, R., Koh, T.H., Wang, G., Chai, L.Y., Tan, A., Chai, T., Wong, Y., Wang, Y., Tambyah, R., Beuerman, R., Tan, D. (2008). Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore. *BMC Infectious Diseases*, 8, 92.
- Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., DeMeulenaer, B. (2015). Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agroecological zones of Tanzania. *Food Control* 54, 208–215.
- Kapetanakou, A.E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N. (2011). Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology*, 28, 727–735.
- Kapetanakou, A.E., Kollias, J.N., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 91–99.
- Karolewicz, A., Geisen, R. (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 588–595.
- Kato, N., Tokuoka, M., Shinohara, Y., Kawatani, M., Uramoto, M., Seshime, Y., Fujii, I., Kitamoto, K., Takahashi, T., Takahashi, S., Koyama, Y., Osada, H. (2011). Genetic safeguard against

- mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *ChemBioChem*, 12, 1376–1382.
- Kaufmann, A. (2014). Combining UHPLC and high-resolution MS: A viable approach for the analysis of complex samples. *TrAC–Trends in Analytical Chemistry*, 63, 113–128.
- Kayode, O.F., Sulyok, M., Fapohunda, S.O., Ezekiel, C.N., Krska, R., Oguntona, C.R.B. (2013). Mycotoxins and fungal metabolites in groundnut and maize-based snacks from Nigeria. *Food Additives and Contaminants: Part B, Surveillance*, 6, 294–300.
- Keller, L.A.M., González Pereyra, M.L., Keller, K.M., Alonso, V.A., Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Barbosa, T.S., Nunes, L.M.T., Cavaglieri, L.R., & Rosa, C.A.R. (2013). Fungal and mycotoxin contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 42–47.
- Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., Groopman, J.D. (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120, 28–48.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (2005). Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system: targeting genes affecting aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 807–815.
- Kim, N.Y., Lee, J.H., Lee, I., Ji, G.E. (2014). An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Protection*, 77, 1010–1016.
- Klich, M.A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48, 71–80.
- Koch, A.L. (1975). The kinetics of mycelial growth. *Journal of General Microbiology*, 89, 209–216.
- Kohut, G., Ádám, A.L., Fazekas, B., Hornok, L. (2009). N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 65–69.
- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A. (2005). Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 22, 449–456.

- Kong, Q., Chi, C., Yu, J.J., Shan, S.H., Li, Q.Y., Li, Q.T., Guan, B., Nierman, W.C., Bennett, J.W. (2014). The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5161–5172.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1595–1612.
- Kopp–Holtwiesche, B., Rehm, H.J. (1990). Antimicrobial action of roquefortine. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10, 41–44.
- Koteswara Rao, V., Ramana, M.V., Girisham, S., Reddy, S.M. (2013). Culture media and factors influencing ochratoxin A production by two species of *Penicillium* isolated from poultry feeds. *National Academy Science Letters*, 36, 101–110.
- Kotsonis, F.N., Burdock, G.A., Flamm, W.G. (2001). Food toxicology. En: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6^o edition. Ed: McGraw–Hill. New York, Estados Unidos. 1049–1088.
- Kozlovsky, A.G., Vinokurova, N.G., Reshetilova, T.A., Sakharovsky, V.G., Baskunov, B.P., Seleznev, S.G. (1994). New metabolites of *Penicillium glandicola* var. *glandicola*: *glandicoline A* and *glandicoline B*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 30, 334–337.
- Krska, R., Schuhmacher, R., Weingärtner, J., Grasserbauer, M. (1997). Modern sample preparation techniques for the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Cereal Research Communications*, 25, 327–329.
- Kuiper–Goodman, T. (1991). Risk assessment of Ochratoxin A residues in food. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Lyon: IARC Sci Publications, 115–307.
- Kulik, T., Treder, K., Załuski, D. (2015). Quantification of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium verrucosum* in Conventional and Organic Grains by qPCR. *Journal of Phytopathology*, 163, 522–528.
- Kuzina, V., Ramírez–Medina, H., Visser, H., Van Ooyen, A.J.J., Cerdá–Olmedo, E., van den Berg, J.A. (2008). Genes involved in carotene synthesis and mating in *Blakeslea trispora*. *Current Genetics*, 54, 143–152.

- Lacina, O., Zachariasova, M., Urbanova, J., Vaclavikova, M., Cajka, T., Hajslova, J. (2012). Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1262, 8–18.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 315–322.
- Lappa, I.K., Kizis, D., Panagou, E.Z. (2017). Monitoring the temporal expression of genes involved in ochratoxin a production of *Aspergillus carbonarius* under the influence of temperature and water activity. *Toxins*, 9, 296.
- Larsen, T.O., Gareis, M., Frisvad, J.C. (2002). Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common *Penicillia* on cheese agar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6148–6152.
- Lazzaro, I., Susca, A., Mula, G., Ritieni, A., Ferracane, R., Marruecos, A., Battilani, P. (2012). Effects of temperature and water activity on *FUM2* and *FUM21* gene expression and fumonisin B production in *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 685–695.
- Le Bars, J. (1979). Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 1052–1055.
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R. (2007). Microorganisms in traditional fermented meats. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, edited by F. Toldrá. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Leggieri, M., Pont, N., Battilani, P., Magan, N. (2011). Detection and discrimination between ochratoxin producer and non–producer strains of *Penicillium nordicum* on a ham–based medium using and electronic nose. *Mycotoxin Research*. 27, 29–35.
- Lehotay, S.J., de Kok, A., Hiemstra, M., van Bodegraven, P. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using

- gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88, 595–614.
- Leistner, L., Eckardt, C. (1979). Vorkommen toxinogener penicilien bei fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch*, 59, 1892–1896.
- Levin, R.E. (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 1–6.
- Liu, H.M., Guo, J.H., Luo, L., Liu, P., Wang, B.Q., Cheng, Y.J., Deng, B.X., Long, C.A. (2010). Improvement of *Hanseniaspora uvarum* biocontrol activity against gray mold by the addition of ammonium molybdate and the possible mechanisms involved. *Crop Protection*, 29, 277–282.
- Liu, S. Q., Tsao, M. (2009). Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control*, 20, 852–855.
- Liu, X., Guan, X., Xing, F., Lv, C., Dai, X., Liu, Y. (2017). Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control*, 82, 325–332.
- Liu, X., Walsh, C.T. (2009). Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies. *Biochemistry*, 48, 11032–11044.
- López de Cerain A, Soriano JM. Ocratoxina A. (2007). En: Soriano del Castillo J., editor. *Micotoxinas en Alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz Santos, 201–22.
- López de Goicochea, A. (2010). Tesis Doctoral. Especies fúngicas micotoxigénicas en productos cárnicos embutidos secos. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina.
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., García-López, M.L., Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 68,69–74.
- Lorenzini, M., Zapparoli, G. (2014). Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 1–5.

- Lozano–Ojalvo, D., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M. (2013). Influence of temperature and substrate conditions on the omt–1 gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 263–269.
- Lozano–Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes–Prieto, M., Córdoba, J.J. (2015). Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry cured fermented sausages. *Meat Science*, 100, 283–290.
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M.L., Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 13–8.
- Lund, F., Frisvad, J.C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1117–1123.
- Machihara, K., Tanaka, H., Hayashi, Y., Murakami, I., Namba, T. (2017). Questiomycin A stimulates sorafenib–induced cell death via suppression of glucose–regulated protein 78. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492, 33–40.
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162, 245–253.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post–harvest control strategies: minimising mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., Baxter, E.S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 685–690.
- Magan, N., Medina, Á. (2016). Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. *World Mycotoxin Journal*, 9, 673–684.
- Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., Krska, R. (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of chromatography A*, 1362, 145–156.

- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Toman, J., Bazin, I., Roubal, T. (2014). Transfer of ochratoxin a into tea and coffee beverages. *Toxins*, 6, 3438–3453.
- Mallikarjunaiaha, N.H., Jayapalaa, N., Puttaswamyb, H., Siddapura Ramachandrappa, N. (2017). Characterization of non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agent for the management of aflatoxin contamination in groundnut. *Microbial Pathogenesis*, 102, 21–28.
- Mann, D.A., Beuchat, L.R. (2008). Combinations of antimycotics to inhibit the growth of molds capable of producing 1,3-pentadiene. *Food Microbiology*, 25, 144–153.
- Marchesini, B., Bruttin, A., Romailier, N., Moreton, R. S., Stuchi, C., Sozzi, T. (1992). Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal Applied Bacteriology*, 73, 203–209.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A.J., Ghorbel, A., Sanchis, V. (2006). Kinetics of Ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Journal of Food Science*, 71, 196–200.
- Marín, S., Colom, C., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2009). Document Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 491–496.
- Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139–149.
- Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329–341.
- Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2012). Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*, 32, 378–388.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2011). Factores fisiológicos que condicionan el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. En: *Micotoxinas y micotoxicosis*. Ed. Ramos, A.J. AMV Ediciones, Madrid, España, 73–93.

- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, 34, 312–317.
- Marks, B.P. (2007). Status of microbial modelling in food process models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 137–143.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermudez, M.E., Córdoba, M.G., Aranda E. y Córdoba J.J. (2002). Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Science*, 62, 129–137.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. y Asensio, M.A., (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham, *International Journal of Food Microbiology* 110, 8–18.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J. y Asensio, M.A. (2004). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 94 55–66.
- Martínez, M.M, Vargas del Río, L.M, Gómez, V.M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 89–109.
- Masoud, W., Jakobsen, M. (2005b). The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *International Dairy Journal*, 15, 69–77.
- Masoud, W., Kaltoft, C.H. (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 229–234.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M. (2005a). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22, 1133–1142.
- Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K.A., Giorni, P., Pietri, A., Cotty, P.J. (2013). Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 1–7.

- McGrath, R.M., Steyn, P.S., Ferreira, N.P., Neethling, D.C. (1976). Biosynthesis of cyclopiazonic acids in *Penicillium cyclopium*: The Isolation of dimethylallylpyrophosphate: Cycloacetoacetyltryptophanyl dimethylallyltransferase. *Bioorganic Chemistry*, 4, 11–23.
- Medina, Á., Gilbert, M.K., Mack, B.M., O'Brien, G., Rodríguez, A., Bhatnagar, D., Payne, G., Magan, N. (2017). Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B₁ production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 36–44.
- Medina, Á., Jiménez, M., Gimeno–Adelantado, J. V., Valle–Algarra, F. M., Mateo, R. (2005). Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A*, 1083, 7–13.
- Medina, Á., Magan, N. (2012). Comparison of three different C 18 HPLC columns with different particle sizes for the optimization of aflatoxins analysis. *Journal of Chromatography B*, 889–890, 138–143.
- Medina, Á., Mateo, R., Valle–Algarra, F.M., Mateo, E.M., Misericordia, J. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 230–235.
- Medina, Á., Rodríguez, A., Sultan, Y., Magan, N. (2015b). Climate change factors and *A. flavus*: Effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal*, 8, 171–179.
- Medina, A., Schmidt–Heydt, M., Rodríguez, A., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2014). Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. *Current Genetics*, 61, 325–334.
- Medina, Á., Schmidt–Heydt, M., Rodríguez, A., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2015a). Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. *Current Genetics*, 61, 325–334.
- Medina–Córdova, N., López–Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa–Córdova, A.I., Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against

- phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*, 97, 70–79.
- Meftah, S., Abid, S., Dias, T., Rodrigues, P. (2018). Effect of dry-sausage starter culture and endogenous yeasts on *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium nordicum* growth and OTA production. *LWT – Food Science and Technology*, 87, 250–258.
- Mendonça, R.C.S., Gouvea, D.M., Hungaro, H.M., Sodr , A.F., Querol, A. (2013). Dynamics of the yeast flora in artisanal country style and industrial dry cured sausage (yeast in fermented sausage). *Food Control*, 29, 143–148.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentaci3n y Medio Ambiente (MAPAMA) (2016). Datos de la producci3n y mercados ganaderos. Centro de Publicaciones del MAPAMA, Madrid, España.
- Ministero della Sanit  (1999). Circolare 09.06.1999. *Gazzetta Ufficiale Repubblica italiana* 135, 11.06.1999.
- Mioso, R., Toledo Marante, F.J., Herrera Bravo de Laguna, I. (2015). *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 781–791.
- Mirhendi, H., Zarei, F., Motamedi, M., Nouripour-Sisakht, S. (2016). *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. *Journal de Mycologie Medicale*, 26, 9–16.
- Mir3-Abella, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Borrull, F., Ras, R., Fontanals, N. (2017). Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 229, 366–372.
- Mitchell, N.J., Chen, C., Palumbo, J.D., Bianchini, A., Cappozzo, J., Stratton, J., Ryu, D., Wu, F. (2017). A risk assessment of dietary Ochratoxin A in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 100, 265–273.
- Mitchell, T.M. (1999). Machine learning and data mining. *Communications ACM*, 42, 30–36.

- Mohale, S., Medina, A., Rodríguez, A., Sulyok, M., Magan, N. (2013). Mycotoxigenic fungi and mycotoxins associated with stored maize from different regions of Lesotho. *Mycotoxin Research*, 29, 209–219.
- Mol, H.G.J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T.C., Stolker, A.A.M., Mulder, P.P.J. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices, *Analytical Chemistry*, 80, 9450–9459.
- Moldes–Anaya, A. S., Asp, T. N., Eriksen, G. S., Skaar, I., Rundberget, T. (2009). Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3812–3818.
- Möller, T., Akerstrand, K., Massoud, T. (1997). Toxin–producing species of *Penicillium* and the development of mycotoxins in must and homemade wine. *Journal of Natural Toxins*, 5, 86–89.
- Moss, M.O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: *Mycotoxins and animal foods*. Eds. Smith J.E. y Henderson, R.S. CRC Press Inc., Boca Raton. Pp. 37–56.
- Moss, M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 137–142.
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S. (2011). Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1262–1274.
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S. (2013). Modeling growth rate and assessing aflatoxins production by *Aspergillus flavus* as a function of water activity and temperature on polished and brown rice. *Journal of Food Science*, 78, 56–63.
- Nasri, T., Hedayati, M.T., Abastabar, M., Pasqualotto, A.C., Armaki, M.T., Hoseinnejad, A., Nabili, M. (2015). PCR–RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. *Journal of Microbiological Methods*. 117, 144–147.
- Ngan, N.T.T., Quang, T.H., Kim, K.W., Kim, H.J., Sohn, J.H., Kang, D.G., Lee, H.S., Kim, Y.C., Oh, H. (2017). Anti-inflammatory effects of secondary metabolites isolated from the marine–

- derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5629. Archives of Pharmacal Research, 40, 328–337.
- Nielsen, K.F., Dalsgaard, P.W., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. (2005). Andrastins A–D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2908–2913.
- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C., Miller, J.D. (2006). Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 3756–3763.
- Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N., Justensen, A.F. (2012). TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. International Journal of Food Microbiology, 157, 384–392.
- Norred, W. P., Cole, R. J., Dorner, J. W., Lansden, J. A. (1987). Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. Journal–Association of Official Analytical Chemists, 70, 121 –123.
- Núñez, F., Díaz, M. C., Rodríguez, M., Aranda, E., Martín, A., Asensio, M.A. (2000). Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. Journal of Food Protection, 63, 231–236.
- Núñez, F., Lara, M.S., Peromingo, B., Delgado, J., Sanchez-Montero, L., Andrade, M.J. (2015). Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. Food Microbiology, 46, 114–120.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J., Asensio, M.A. (1996a). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. International Journal of Food Microbiology, 32, 185–197.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Berntidez, M.E. and Asensio, M.A. (1996b). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. International Journal of Food Microbiology, 29, 271–280.

- 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, 2829–2836.
- O'Brian, G.R., Fakhoury, M., Payne, G.A. (2003). Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*, 39, 118–127.
- O'Brian, G.R., Georgianna, D.R., Wilkinson, J.R., Yu, J., Abbas, H.K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Nierman, W., Payne, G.A. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia* 99, 232–239.
- O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W. (2006). Molecular characterization of ochratoxin A biosynthesis and producing fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 58, 227–243.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson, A.D.W., (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 213–221.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., Kimura, M. (2007). Involvement of the osmo sensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36, 639–644.
- Ohmomo, S., Oguma, K., Ohashi, T., Abe, M. (1978). Isolation of a new indole alkaloid, roquefortine D, from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 2387–2389.
- Ohmomo, S., Sato, T., Utagawa, T., Abe, M. (1975). Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 1333–1334.
- Oktay Basegmez, H.I., Heperkan, D. (2015). Aflatoxin, cyclopiazonic acid and β -nitropropionic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from dried figs grown in Turkey. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 7, 477–485.
- Oliveira, C.A., Rosmaninho, J., Rosim, R. (2006). Aflatoxin M₁ and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Additives & Contaminants*, 23, 196–201.

- Olsen, M., Gidlund, A., Sulyok, S. (2017). Experimental mould growth and mycotoxin diffusion in different food items. *World Mycotoxin Journal*, 10, 153–161.
- Ordóñez, J.A., de la Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Fermentaciones. Capítulo 51 de la Enciclopedia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Coordinador Martín, S. Editorial Martín & Macías. Cáceres, España.
- Overy, D.P., Frisvad, J.C., Steinmeier, U., Thrane, U. (2005b). Clarification of the agents causing blue mold storage rot up on various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 217–221.
- Overy, D.P., Nielsen, K.F., Smedsgaard, J. (2005a). Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2373–2390.
- Overy, D.P., Seifert, K.A., Savard, M.E., y Frisvad, J.C. (2003). Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 69–77.
- Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I., Nychas, G.–J.E. (2010). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Food Microbiology*, 27, 618–627.
- Pantelides, I.S., Aristeidou, E., Lazari, M., Tsolakidou, M.D., Tsaltas, D., Christofidou, M., Kafouris, D., Christou, E., Ioannou, N. (2017). Biodiversity and ochratoxin A profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards. *Food Microbiology*, 67, 106–115.
- Papagianni, M., Ambrosiadis, I., Filiou, G. (2007). Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Science*, 76, 653–657.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention – a review. *Food Additives & Contaminants*, 23, 398–410.
- Park, H.R., Ryoo, I.J., Choo, S.J., Hwang, J.H., Kim, J.Y., Cha, M.R., Shin–Ya, K., Yoo, I.D. (2007). Glucose–deprived HT–29 human colon carcinoma cells are sensitive to verrucosidin as a GRP78 down–regulator. *Toxicology*, 229, 253–261.

- Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., Etcheverry, M. (2010). Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 276–281.
- Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., Etcheverry, M. (2012). Influence of sub-lethal antioxidant doses, water potential and temperature on growth, sclerotia, aflatoxins and aflD (=nor-1) expression by *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 167, 470–477.
- Peintner, U., Geiger, J., P. Coder, R. (2000). The mycobiota of Speck, a traditional Tyrolean smoked and cured ham. *Journal of Food Protection*, 63, 1399–1403.
- Pereira, M., Beux, M., Pagnoncelli, B., Soccol, V.T., Rodrigues, C., Soccol, C.R. (2016). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 62,96–101.
- Peromingo, B., Núñez, F., Rodríguez, A., Alía, A., Andrade, M.J. (Revisión). Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin-A production in a meat models. *International Journal of Food Microbiology*.
- Perrone, G., De Girolamo, A., Sarigiannis, Y., Haidukowski, M.E., Visconti, A. (2013). Occurrence of ochratoxin A, fumonisin B₂ and black *Aspergilli* in raisins from Western Greece regions in relation to environmental and geographical factors. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 1339–1347.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53–66.
- Persi, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S. (2014). Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA treated pigs. *Meat Science*, 96, 203–210.
- Pestka, J. (1995). Fungal toxins in raw and fermented meats. *Chapter Fermented Meats*, 194–216.
- Péteri, Z., Téren, J., Vágvölgyi, C., Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24, 205–210.

- Petzinger, E., Ziegler, K., (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, 91–98.
- Pfaffl, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real–Time PCR. En: A–Z of Quantitative PCR. Bustin, S.A. International University Line. California, EE.UU. 87–120.
- Pietri, A., Rastelli, S., Mulazzi, A., Bertuzzi T. (2012). Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts and chestnut flour produced in Italy. *Food Control*, 25, 601–606.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A. (2008). Two novel aflatoxin–producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 725–735.
- Pitt, I., Hocking, A.D. (2009). *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Bustin, S.A. (Ed.), A–z of Quantitative PCR. International University Line, California, pp. 87–120.
- Pizzutti, I., de Kok, A., Scholten, J., Righi, L.W., Cardoso, C.D., Rohers, G.N., da Silva, R.C. (2014). Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 129, 352–363.
- Pizzutti, I.R., De Kok, A., Hiemstra, M., Wickert, C., Prestes, O.D. (2009). Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography A* 1216, 4539–4552.
- Pleadin, J., Kovacevic, D., Perkovic, I. (2015a). Impact of casing damaging on aflatoxin B₁ concentration during the ripening of dry–fermented meat sausages. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 36, 655–666.
- Pleadin, J., Kovačević, D., Perši, N. (2015c). Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry–cured meat product “Slavonski Kulen” during a six–month production process. *Food Control* 57, 377–384.
- Pleadin, J., Persi, N., Kovacevic, D., Vahcic, N., Scortichini, G., Milone, S. (2013). Ochratoxin A in traditional dry–cured meat products produced from subchronic exposed pigs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 1827–1836.

- Pleadin, J., Staver, M.M., Vahcic, N., Kovacevi, N., Milone, S., Saftic, L., Scortichini, G. (2015b). Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control*, 52, 71–77.
- Pleadin, J., Zadavec, M., Brnic, D., Perkovic, I., Skrivanko, M., Kovacevic, D. (2017). Moulds and mycotoxins detected in the regional speciality fermented sausage 'slavonski kulen' during a 1-year production period. *Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34, 282–290.
- Polonsky, J., Merrien, M.A., Scott, P.M. (1977). Roquefortine and isofumigaclavine A, alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *Annales De La Nutrition Et De L'Alimentation*, 31, 963–968.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28, 848–861.
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2014). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. *Food Control*, 39, 192–197.
- Purriños, L., Carballo, J., Lorenzo, J.M. (2013a). The Influence of *Debaryomyces hansenii*, *Candida deformans* and *Candida zeylanoides* on the aroma formation of dry-cured "lacón". *Meat Science* 93, 344–350.
- Purriños, L., García Fontán, M.C., Carballo, J., Lorenzo, J.M. (2013b). Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured "lacón" Effect of salt level. *Food Microbiology* 34, 12–18.
- Rand, T.G., Giles, S., Flemming, J., Miller, J.D., Puniani, E. (2005). Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *P. chrysogenum* Thom. *Toxicological Sciences*, 87, 213–222.
- Razavi-Rohani, S.M., Griffiths, M.W. (1999). Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. *Journal of Food Safety*, 19, 109–120.
- Real decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. BOE nº. 147 de 18 de junio de 2014.

- Reglamento (CE) 1881/2006. (2006). Reglamento (CE) número 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes con los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 364, 5–24.
- Reglamento (CE) N° 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010, que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 50, 8–12.
- Reglamento (UE) 105/2010. (2010). Reglamento (CE) número 105/2010 de la Comisión de 5 de febrero de 2010 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a la ocratoxina A. Diario oficial de la Unión Europea, 35, 7–8.
- Reinholds, I., Pugajeva, I., Bartkevics, V. (2016). A reliable screening of mycotoxins and pesticide residues in paprika using ultra–high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry. *Food Control*, 60, 683–689.
- Reiß, J. (1981). Studies on the Ability of Mycotoxins to Diffuse in Bread. *European Journal Microbiology and Biotechnology*, 12, 239–241.
- Ren, Y., Zhang, Y., Han, S., Han, Z., Wu, Y. (2011). Simultaneous determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ contaminants in maize by ultra high–performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 692, 138–145.
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., Garon, D. (2009). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 148, 309–320.
- Ries, M.I., Ali, H., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A., Driessen, A.J., Vreeken, R.J. (2013). Novel key metabolites reveal further branching of the Roquefortine/meleagrins biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 37289–37295.
- Riley, R.T., Pestka, J. (2005). Mycotoxins: metabolism, mechanism and biochemical Markers. En: *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido, 289–291.

- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 187–193.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. (2013). Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 197–209.
- Rodríguez, A., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Núñez, F., Córdoba, J.J. (2015a). Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. *LWT – Food Science and Technology*, 60, 923–928.
- Rodríguez, A., Capela, D., Medina, Á., Córdoba, J.J., Magan, N. (2015b). Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage based matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 194, 71–77.
- Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Werning, M.L., Andrade, M.J., Rodríguez, M. (2012c). Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verrucosidin producing molds in dry-ripened foods. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 85–91.
- Rodríguez, A., Medina, Á., Córdoba J.J., Magan, N. (2014). The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 113–119.
- Rodríguez, A., Medina, Á., Córdoba, J.J., Magan, N. (2016). Development of a HOG-based real-time PCR method to detect stress response changes in mycotoxigenic moulds. *Food Microbiology*, 57, 109–115.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. (2012a). Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 10–18.

- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J. (2015c). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: Basu, C. (Ed.), PCR Primer Design (Series: Methods in Molecular Biology). Humana Press, New York, 31–56.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justensen, A.F., Córdoba, J.J. (2012f). A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control*, 25, 666–672.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F., Córdoba, J. (2011). Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 226–235.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J. (2012g). Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiology*, 31, 89–99.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., Córdoba, J. J. (2012e). Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science*, 92, 728–734.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J. J. (2012b). 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, 118–126.
- Rodríguez, A., Werning, M.L., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J. (2012d). Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiology*, 32, 397–405.
- Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F. (2001). Población microbiana del jamón ibérico y su contribución en la maduración. *Tecnología del jamón ibérico*, 343–366.
- Rodríguez-Martín, A., Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A. (2010). Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*, 31, 541–547.
- Roncalés, P. (1994). Tecnología, cambios bioquímicos y calidad sensorial de los embutidos curados. En: Tendencias en el curado de productos carnicos. Eds. J. Flores, S. Bermell y F. Toldrá. pp 87–109. Expocarne. España.

- Ross, P.F., Rice, L.G., Casper, H.H., Crenshaw, J.D., Richard, J.L. (1991). Novel occurrence of cyclopiazonic acid in sunflower seeds. *Veterinary and Human Toxicology*, 33, 284–285.
- Rubinstein, H.R., Theumer, M.G. (2011). Principales Micotoxinas. En: Ramos, A.J. (Ed) *Micotoxinas y Micotoxicosis*. AMV EDICIONES. Madrid, España. pp. 45–72.
- Rundberget, T., Skaar, I., Flaoyen, A. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 181–188.
- Rychlik, M., Schieberle, P. (2001). Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *European Food Research and Technology*, 212, 274–278.
- Sahebghalam, H., Mohamadi Sani, A., Mehraban, M., (2013). Assessing the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to bind aflatoxin B₁ from contaminated medium. *Nutrition & Food Science*, 43, 392–397.
- Sakowska, A., Guzek, D., Sun, D.–W., Wierzbicka, A. (2017). Effects of 0.5% carbon monoxide in modified atmosphere packagings on selected quality attributes of *M. Longissimus dorsi* beef steaks. *Journal of Food Process Engineering*, 40, 12517.
- Saleemi, M.K., Khan, M.Z., Khan, A., Hameed, M.R., Khatoon, A., Abadin, Z.U., Hassan, Z.U. (2017). Study of fungi and their toxigenic potential isolated from wheat and wheat bran. *Toxin Reviews*, 36, 80–88.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M. (2005). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 35–52.
- Samelis, J., Sofos, J. (2003). Yeasts in meat and meat products. In *Yeasts in Foods*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Sanchís, V. Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. In N. Megan y M. Olsen, eds. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Abington Hall, Abington, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, pp. 174–189.

- Sangmanee, P., Hongpattarakere, T. (2014). Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 40, 224–233.
- Santos, A., Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150, 2527–2534.
- Santos, L., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2009). Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1802–1807.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil–Serna, J., González–Jaén, M.T., Patiño, B. (2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 121–125.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani–Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H., Pelegrini Fungaro, M.H. (2006). PCR method for the detection of potential ochratoxin–producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157, 350–354.
- Scaramuzza, N., Diaferia, C., Berni, E., (2015). Monitoring the mycobiota of three plants manufacturing Culatello (a typical Italian meat product). *International Journal of Food Microbiology*, 203, 78–85.
- Schmidt–Heydt, M., Abdel–Hadi, A., Magan, N., Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 231–237.
- Schmidt–Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R., Magan, N. (2007). Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*. 119, 277–283.
- Schmidt–Heydt, M., Graf, E., Batzler, J., Geisen, R. (2011a). The application of transcriptomics to understand the ecological reason of ochratoxin A biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloride rich dry cured foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S39–S48.

- Schmidt–Heydt, M., Graf, E., Stoll, D., Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A *Penicillium* as on mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology*, 29, 233–241.
- Schmidt–Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 142–149.
- Schmidt–Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2011b). Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *Journal of the Royal Society Interface*, 8 (54), 117–126.
- Schmidt–Heydt, M., Rüfer, C.E., Abdel–Hadi, A., Magan, N., Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B₁ or G₁ by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio *afS* to *afR* expression. *Mycotoxin Research*, 26, 241–246.
- Schmidt–Heydt, M., Stoll, D., Geisen, R. (2013). Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 407–412.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real–time PCR data by the comparative C–T method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108.
- Shang, A., Li, X.M., Li, C.S., Wang, B.G. (2012). Diverse Secondary Metabolites Produced by Marine–Derived *Fungus nigrospora* sp. MA75 on Various Culture Media. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 1338–1348.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control* 50, 205–221.
- Shephard, G. S., Burger, H.M., Gambacorta, L., Krska, R., Powers, S. P., Rheeder, J.P. (2013). Mycological analysis and multimycotoxins in maize from rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8232–8240.
- Shimshoni, J.A., Cuneah, O., Sulyok, M., Krska, N., Galon, B., Sharir, B., Shlosberg, A. (2013). Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 30, 1614–1625.

- Shinohara, Y., Tokuoka, M., Koyama, Y. (2011). Functional analysis of the cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB 40. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 2249–2252.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., Quintavalla, S., (2007). Dynamics and characterization of yeasts during seasoning of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, 24, 577–584.
- Simoncini, N., Virgili, R., Spadola, G., Battilani, P. (2014). Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. *Food Control*. 46, 160–167.
- Sobolev, V. S. (2005). Determination of ionization constant (pKa) and octanol-water partition coefficient (Log P) of cyclopiazonic acid. *Journal of AOAC International*, 88, 1367–70.
- Sonjak, S., Licen, M., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology*, 28, 373–376.
- Sorensen, L.M., Jacobsen, T., Nielsen, P.V., Frisvad, J.C., Koch, A.G., (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 58–64.
- Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M.A., Núñez, F. (2002). Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *Journal of Food Protection* 65, 988–992.
- Spanjer, C. M., Rensen, P., & Scholten, J. (2008). LC-MS/MS multimethod for mycotoxins after single extraction and validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflake, raisin and fig. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25, 472–489.
- Spotti, E., Berni, E. (2007). Starter cultures: Molds. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, edited by F. Toldrá. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Streit, E., Schwab, C., Sulyok, M., Naehrer, K., Krska, R., Schatzmayr, G. (2013). Multi-Mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*, 5, 504-523.
- Suanthie, Y., Cousin, M.A., Woloshuk, C.P. (2009). Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*, 45, 139–145.

- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2649–2659.
- Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. (2010). Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry*, 119, 408–416.
- Sweeney, M.J., Pamies, P., Dobson, A.D.W. (2000). The use of reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 97–103.
- Taczman–Brückner, A., Mohacsi–Farkas, C., Balla, C., Kiskó, G. (2005). Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria Hungarica*, 34, 153–160.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P., Magan, N., 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2267–2276.
- Toldrá F., Aristoy, M.C. (1993). Availability of essential amino acids in dry-cured ham. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 215–219.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat. *Meat Science*, 49, 101–110.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-Cured Meat Products*. Food and Nutrition Press, INC. Trumbul, Connecticut, USA.
- Toldrá, F. (2009). *Safety of meat and processed meat*. Ed. F. Toldrá. Springer. Griffinn, GA, USA.
- Toldrá, F. y Aristoy, M.C. (2010). Dry-cured ham. In: *Handbook of meat processing*. Ed. F. Toldrá. Pp. 351–362. Willey–Blackwell. Ames, Iowa, USA.
- Tolosa, J., Graziani, G., Gaspari, A., Chianese, D., Ferrer, E., Mañes, J., Ritieni, A. (2017). Multi-mycotoxin analysis in durum wheat pasta by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Toxins*, 9, 59.

- Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'Asta, C., Simoncini, N., Virgili, R. (2007). Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC–FLD quantitative method. *Journal of Chromatography*, 855, 242–248.
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo–Vezse, M., Poma, A., Coker, R., Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.
- Udomkun, P., Wiredu, A., Nagle, M., Bandyopadhyay, R., Müller, J., Vanlauwe, B. (2017). Mycotoxins in Sud–Saharan Africa: Present situation, socio–economic impact, awareness, and outlook. *Food Control*. 72, 110–122.
- Uka, V., Moore, G. G., Arroyo–Manzanares, N., Nebija, D., De Saeger, S., Di Mavungu, J. D. (2017). Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. *Toxins*, 9, 1–21.
- Urano, T., Trucksess, M.W., Matusik, J., Dorner, J.W. (1992). Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *Journal of AOAC International*, 75, 319–322.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V. F., Comerio, R., Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88,79–84.
- Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. (2013). Development and validation of a (semi-) quantitative UHPLC–MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5087–5104.
- Vipotnik, Z., Rodríguez, A., Rodrigues, P. (2017). *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 244–251.
- Virgili, R., Parolari, G., Sores Bordini, C., Schivazappa, C., Cornet, M., Monin, G. (1999). Free amino acids and dipeptides in dry-cured ham. *Journal of Muscle Foods*, 10, 119–130.

- Virgili, R., Simoncini, N., Toscani, T., Camardo Leggieri, M., Formenti, S., Battilani, P. (2012). Biocontrol of *Penicillium nordicum* growth and ochratoxin A production by native yeasts of dry cured ham. *Toxins*, 4, 68–82.
- Visagie, C.M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K.A., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78, 1–61.
- Wagener, R.E., Davis, N.D., Diener, U.L. (1980). Penitrem A and Roquefortine production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 882–887.
- Wang, X., Ma, P., Jiang, D., Peng, Q., Yang, H. (2006). The natural microflora of Xuanwei ham and the no-mouldy ham production. *Journal of Food Engineering*, 77, 103–111.
- Wang, Z., Qin, B. (2016). Development and validation of an UHPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of four flavonoid glycosides and phellopterin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of oral administration of *Poncirus trifoliata* extract. *Analytical Methods*, 8, 8443.
- Wannemacher, R.W., Bunner, D.L., Neufeld, H.A. (1991). Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. J.E. Smith, R.S. Henderson (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 499–552.
- Whiting, R.C. (1995). Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 6, 467–494.
- Wilkinson, J.R., Yu, J., Bland, J.M., Nierman, W.C., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (2007). Amino acid supplementation reveals differential regulation of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* NRRL 3357 and *Aspergillus parasiticus* SRRC 143. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1308–1319.
- Witten, I.H. Frank, E. (2005). *Data mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java implementations*. Ed. Morgan Kaufmann. San Francisco, California, U.S.A.
- Wu, X., Kumar, V., Ross Quinlan, J., Ghosh, J., Ghosh, J., Yang, Q., Motoda, H., McLachlan, G.J., Ng, A., Liu, B., Yu, P.S., Zhou, Z.–H., Steinbach, M., Hand, D.J. and Steinberg, D. (2008). Top 10 algorithms in data mining. *Knowledge Information Systems*, 14, 1–37.

- Xu, B.J., Jia, X.Q., Gu, L.J., Sung, C.K. (2006). Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 17, 271–285.
- Xu, X.M., Monger, W., Ritieni, A., Nicholson, P. (2007). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of *Fusarium* species. *Plant Pathology*, 56, 943–956.
- Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., Cheraghali, A.M. (2005). Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1135–1139.
- Yogendrarajah, P., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Mavromichali, E., De Saeger, S., De Meulenaer, B., Devlieghere, F. (2016). Mycotoxin production and predictive modelling kinetics on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates in whole black peppercorns (*Piper nigrum* L). *International Journal of Food Microbiology*, 228, 44–57.
- Yu, J. (2012). Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 4, 1024–1057.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennet, J.W. (2004). Clustered pathways genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1253–1262.
- Yu, J., Fedorova, N.D., Montalbano, B.G., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., Nierman, W.C. (2011). Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS Microbiology Letters*, 322, 145–149.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15, 129–144.
- Zambonin, C.G., Monaci, L., Aresta, A. (2001). Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 75, 249–254.

- Zhang, X., Zhang, R., Lv, P., Yang, J., Deng, Y., Xu, J., Zhu, R., Zhang, D., Yang, Y. (2015). Emodin up-regulates glucose metabolism, decreases lipolysis, and attenuates inflammation in vitro. *Journal of Diabetes*, 7, 360–368.
- Zhao, T., Liu, G., Li, S., Li, J., Jiang, J., Zhang, H., Kang, L., Chen, X., Xu, X. (2015). Differentially expressed gene transcripts related to the cf-19-mediated resistance response to *Cladosporium fulvum* infection in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 8–15.
- Zhao, Y., Tu, K., Shao, X.F., Jing, W., Su, Z.P. (2008). Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 113–120.
- Zhou, J., Xu, J.-J., Cai, Z.-X., Huang, B.-F., Jin, M.-C., Ren, Y.-P. (2017). Simultaneous determination of five *Alternaria* toxins in cereals using QuEChERS-based methodology. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1068–1069, 15–23.
- Zhou, M., Miao, M.-M., Du, G., Nian, X., Shang, S.-Z., Zhao, W., Liu, Z.-H., Yang, G.-Y., Che, C.-T., Hu, Q.-F., Gao, X.-M. (2014). Aspergillines A–E, highly oxygenated hexacyclic indole-tetrahydrofuran-tetramic acid derivatives from *Aspergillus versicolor*. *Organic Letters*, 16, 5016–5019.
- Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J. (2007b). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 124–127.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2007a). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1–18.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modelling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875–1881.

VIII. RESUMEN

VIII.1. RESUMEN

Las condiciones ecológicas alcanzadas durante el proceso de secado/maduración de los derivados cárnicos curado-madurados favorecen el crecimiento de una población de mohos en su superficie. La mayoría de ellos, afectan de forma positiva a las características sensoriales del producto final; sin embargo, algunos son capaces de producir micotoxinas y otros metabolitos secundarios tóxicos. Dentro de las micotoxinas que se pueden encontrar en estos productos, las que más frecuentemente se han aislado son aflatoxinas (AFs), ácido ciclopiazónico (ACP) y ocratoxina A (OTA). Las micotoxinas son compuestos que, al ser introducidos en el organismo en pequeñas cantidades, pueden ocasionar patologías relacionadas con diferentes efectos nefrotóxicos, inmunotóxicos, hepatotóxicos, genotóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, pudiendo afectar gravemente la salud del consumidor. Algunas de estas micotoxinas, además de ser estables y difíciles de eliminar, son capaces de difundir al interior del alimento, agravando el problema de seguridad alimentaria relacionado con la presencia de micotoxinas en los derivados cárnicos curado-madurados, por lo que resulta especialmente preocupante el crecimiento incontrolado de mohos en la superficie de estos productos cárnicos. Entre las estrategias que pueden utilizarse para minimizar la presencia de mohos toxigénicos, aquellas relacionadas con el estudio de la influencia de las condiciones del procesado de los derivados cárnicos curado-madurados sobre el crecimiento de los mohos toxigénicos y la producción de micotoxinas, así como aquellas que implican la utilización de microorganismos autóctonos naturalmente adaptados a estos nichos, parecen las más interesantes y prometedoras.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral consistieron en: a) evaluar la capacidad de difusión de micotoxinas en los derivados cárnicos curado-madurados; b) optimizar un protocolo de extracción y análisis de ACP para la detección y cuantificación de esta toxina a partir de derivados cárnicos curado-madurados; c) evaluar la influencia de los factores ambientales (temperatura y a_w) alcanzados durante el proceso de maduración de los productos cárnicos y de microorganismos autóctonos en el crecimiento de mohos toxigénicos, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas y su producción en modelos elaborados a partir de derivados cárnicos curado-madurados y, d) desarrollar modelos matemáticos para predecir la concentración de AFs y el inicio de su producción en condiciones similares a las alcanzadas durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos curado-madurados.

En el estudio de la capacidad de difusión de las micotoxinas y otros metabolitos secundarios tóxicos, se validó en primer lugar un método de HPLC-MS/MS para la detección y

cuantificación de estos compuestos en derivados cárnicos curado-madurados. Se confirmó que en la mayoría de los casos los metabolitos secundarios eran capaces de difundir hasta 3 cm de profundidad tanto en jamón curado como en salchichón.

Previamente al estudio de la influencia de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados, se optimizaron en el caso de ACP por su naturaleza inestable, métodos de extracción y de detección de la toxina a partir de estas matrices cárnicas, debido a que los métodos existentes no tenían una buena recuperación ni sensibilidad. Para tal fin, se evaluaron cuatro protocolos de extracción, siendo el más rápido, económico y eficiente el método 4 basado en la metodología QuEChER obteniéndose recuperaciones de extracción superiores al 90%. En el caso de la optimización del método analítico, se evaluó la composición y gradiente de la fase móvil, la velocidad de flujo y el solvente utilizado para la resuspensión de la micotoxina antes de su determinación mediante el método de uHPLC-MS/MS. La mejor resolución del pico cromatográfico se obtuvo con la fase móvil que contenía como fase acuosa acetato de amonio acidificado con ácido acético a pH 5,75 y como fase orgánica metanol a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Las mejores condiciones del modo de gradiente consistieron en un incremento del metanol hasta el 60% hasta alcanzar el 95% a los 11 min. Por último, en el caso de la resuspensión de las muestras, éstas se disolvieron en una solución de ácido acético-acetato de amonio pH 5,75/metanol 30/70 (v/v). Los métodos de extracción y análisis optimizados en la Tesis Doctoral permiten la detección y cuantificación sensible y rápida de ACP para su análisis en jamón curado, minimizando el tratamiento de la muestra, evitando los efectos de la matriz, reduciendo el tiempo de análisis y el consumo y los costes de los disolventes utilizados.

Una de las estrategias utilizadas en esta Tesis Doctoral para minimizar el desarrollo de mohos toxigénicos en la superficie de los derivados cárnicos curado-madurados consistió en evaluar el efecto de diferentes a_w (0,95, 0,90 y 0,85) y diferentes temperaturas (25, 20, 15 y 10 °C) que se alcanzan durante el proceso de maduración de estos productos cárnicos, sobre el crecimiento, la expresión relativa de los genes implicados en las rutas biosintéticas de las AFs y el ACP y la producción de estas toxinas en medios elaborados con carne y jamón curado. En general, las condiciones óptimas de crecimiento y producción de AFs y ACP de las cepas toxigénicas fueron a a_w 0,95 y 25 °C y las condiciones marginales fueron a a_w 0,85 y 15 °C y a_w 0,90 y 25 °C respectivamente; además la expresión relativa de los genes *dmaT*, *pkS-nrps* y *mfs-1* de las cepas de *P. griseofulvum* y los genes *afIR* y *afIS* de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* estaban relacionadas con la producción fenotípica de ACP y AFs, respectivamente. Por lo tanto,

el crecimiento de mohos toxigénicos durante la maduración de los derivados cárnicos curado-madurados podría suponer un riesgo importante asociado con la presencia de ACP y AFs, por ello, las condiciones óptimas y marginales para el crecimiento y la producción de ACP y AFs pueden usarse para ayudar en la toma de decisiones en relación con la temperatura y a_w durante la maduración de los derivados cárnicos curado-madurados para minimizar la acumulación de ACP y AFs en estos productos.

Posteriormente al estudio de la influencia de los parámetros ambientales sobre el crecimiento de mohos toxigénicos y la producción de las toxinas, en el caso de las AFs, se utilizaron los datos obtenidos para diseñar modelos matemáticos de predicción de la concentración de AFs y el momento en que se inicia su síntesis. Para ello, se aplicaron dos técnicas predictivas de minería de datos, lineal (MRL) y no lineal (RI), siendo mejor el rendimiento en el caso del modelo lineal con coeficientes de correlación superiores a 0,76 y 0,88, dependiendo del objetivo de la ecuación de predicción. Este tipo de herramienta puede ser de una gran utilidad para predecir la contaminación de AFs en derivados cárnicos curado-madurados.

Finalmente, se evaluó otra estrategia para controlar la contaminación ocasionada por la presencia de mohos toxigénicos en jamón curado y salchichón consistente en la utilización de microorganismos autóctonos como *D. hansenii* 253H y *P. chrysogenum* CECT 20922 productor de la proteína antifúngica PgAFP. En primer lugar, se evaluó el efecto de la levadura frente a mohos productores de OTA y AFs, en medios elaborados con salchichón y carne y, en la propia matriz cárnica. En los dos casos, la levadura ejerció una inhibición significativa tanto en la expresión de genes asociados con la biosíntesis de las micotoxinas como en la producción de las propias toxinas. A continuación, se analizó el efecto de un cultivo protector mixto compuesto por ambos microorganismos frente al desarrollo de dos cepas productoras de ACP, comprobando que redujo significativamente la concentración de ACP de ambas cepas cuando se inocularon conjuntamente con el cultivo protector. Los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol fueron muy variados dependiendo del microorganismo utilizado o de la cepa de moho toxigénica empleada. En algunos casos inhibieron la expresión de genes implicados en la ruta biosintética y en otros se observó una alta actividad del gen que codifica la proteína antifúngica PgAFP.

El importante riesgo de contaminación de los derivados cárnicos curado-madurados con micotoxinas y otros metabolitos secundarios debido al desarrollo de los mohos toxigénicos en la superficie de estos productos durante el proceso de maduración, conlleva la búsqueda de estrategias para controlar el crecimiento de mohos indeseables en estos productos. El control de

los factores ambientales, así como la utilización de microorganismos autóctonos como agentes de biocontrol pueden utilizarse como estrategias que limiten el desarrollo de los mohos toxigénicos y, sobre todo, la producción de micotoxinas. Además, la utilización de modelos matemáticos que permitan predecir la producción de micotoxinas son esenciales para mejorar la calidad microbiológica y la inocuidad de los alimentos.

VIII.2. SUMMARY

The ecological conditions reached during the ripening process of the dry-cured meat products favor the growth of a population of moulds on their surface. Most of them contribute positively to the sensory characteristics of the final product; however, some of them are able to produce mycotoxins and other toxic secondary metabolites. Among the mycotoxins that can be found in these products, the ones that have been most frequently isolated are aflatoxins (AFs), cyclopiazonic acid (CPA) and ochratoxin A (OTA). Mycotoxins are compounds that, when they are introduced into the body in small quantities, can cause pathologies related to different nephrotoxic, immunotoxic, hepatotoxic, genotoxic, carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects, which can seriously affect consumer health. Some of these mycotoxins, in addition to its stability and difficulty of being removed, are capable of diffusing through food, posing a problem of food safety related to the presence of mycotoxins in dry-cured meat products. For this reason, the uncontrolled growth of moulds on the surface of these meat products is concerning. Among the strategies that can be used to minimise the presence of toxigenic moulds, those consisting in the study of the influence of the conditions related to the processing of dry-cured meat products on the growth of toxigenic moulds and the production of mycotoxins as well as those that involve the use of autochthonous microorganisms naturally adapted to these niches, seem to be the most interesting and promising.

The objectives of this Doctoral Thesis consisted of: a) evaluating the diffusion capacity of mycotoxins in dry-cured meat products; b) optimising a simple and efficient extraction protocol and a sensitive method of uHPLC-MS/MS for the detection and quantification of CPA from dry-cured meat products; c) evaluating the influence of environmental factors (temperature and a_w) reached during the ripening process of dry-cured meat products and autochthonous microorganisms on the growth of toxigenic moulds, the expression of genes associated with mycotoxin biosynthesis and their phenotypic mycotoxin production in model systems based on dry-cured meat products and, d) developing mathematical models to predict the concentration of AFs and the time when AFs begin to occur in conditions related to the ripening process of the dry-cured meat products.

In the study of the diffusion capacity of mycotoxins and other toxic secondary metabolites in dry-cured meat products, a HPLC-MS/MS method for the detection and quantification of mycotoxins and other secondary metabolites in these products was first validated. Next, the diffusion capacity of metabolites produced by *Penicillium* spp. in these meat products was studied. It was confirmed that in the most of the cases the secondary metabolites were able to diffuse up to 3 cm deep in both dry-cured ham and dry-cured fermented sausage.

Before analyzing the effect of environmental factors on toxigenic mould colonization in dry-cured meat products, due to the unstable nature of the CPA, new methods of extraction and detection of this toxin were optimized from these meat products. For this purpose, four extraction protocols were evaluated, being selecting the method 4 based on the QuEChERS methodology due to less-time consuming, economical and efficiency reasons. The extraction recoveries were higher than 90%. In the case of the optimisation of the analytical method, the composition and gradient of the mobile phase, the flow rates and the solvent used for the resuspension of the mycotoxin before its determination by the uHPLC-MS/MS method, were evaluated. The best resolution of the chromatographic peak was obtained with the mobile phase consisting in ammonium acetate acidified with acetic acid at pH 5.75 and methanol at a flow rate of 0.2 ml/min. The best conditions of the gradient mode consisted of an increase of methanol up to 60% and the gradient time for this solvent to raise to 95% was 11 min. Finally, in the case of the resuspension of the samples, they were dissolved in a solution of acetic acid-ammonium acetate pH 5.75/methanol 30/70 (v/v). The methods of extraction and analysis optimised in the Doctoral Thesis allow the highly sensitive and quick detection and quantification of CPA in dry-cured ham, minimising the treatment of the sample, avoiding the effects of the matrix, reducing the time of analysis and the consumption and costs of the solvents used.

One of the strategies used in this Doctoral Thesis to minimise the development of toxigenic moulds on the surface of dry-cured meat products was to evaluate the effect of different a_w (0.95, 0.90 and 0.85) and temperatures (25, 20, 15 and 10 °C) reached during the ripening process of these meat products on growth, the relative expression of the genes involved in the biosynthetic pathways of AFs and CPA and the production of these toxins in meat- and dry-cured ham-based media. In general, the optimum growth and production conditions of AFs and CPA of the toxigenic strains were at 0.95 a_w and 25 °C and the marginal conditions were at 0.85 a_w and 15 °C and 0.90 a_w and 25 °C respectively. In addition, the relative expression of the *dmaT*, *pks-nrps* and *mfs-1* genes of the strains of *P. griseofulvum* and the *afR* and *afS* genes of the strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* were related to the phenotypic production of CPA and AFs, respectively. Therefore, the growth of toxigenic moulds during the ripening process of the dry-cured meat products could suppose an important risk associated with the presence of CPA and AFs. For this reason, the optimal and marginal conditions for the growth and synthesis of CPA and AFs can be used to help in making decisions regarding to temperature and a_w during the ripening process of dry-cured meat products to control the accumulation of CPA and AFs in these meat products. This information can be used to select optimal strategies for avoid mycotoxin-related contamination.

After studying the influence of environmental parameters on the growth of toxigenic moulds and the production of AFs, mathematical models were designed to predict the concentration of AFs and the time when AFs begin to occur with the data obtained in the previous experiment. For this, two predictive techniques of data mining, linear (MRL) and nonlinear (RI) were applied to, with better performance in the case of the linear model with correlation coefficients higher than 0.76 and 0.88, depending on the target of the prediction equation. This type of tool is very useful for predicting the contamination of AFs in these meat products. This type of mathematical models should be used in further researchers for the prediction of OTA and CPA contamination in dry-cured meat products.

Finally, the use of autochthonous microorganisms, such as *D. hansenii* and *P. chrysogenum*, producer of the antifungal protein PgAFP, was evaluated to control the presence of toxigenic moulds in dry-cured ham and dry-cured fermented sausage. Firstly, the effect of yeast was evaluated against OTA- and AFs-producing moulds, in sausage- and meat-based media, and in dry-cured meat product itself. In both cases, the yeast produced a significant inhibition in the expression of genes associated with the biosynthesis of the mycotoxins as well as in the production of the toxins themselves. Next, the effect of a mixed protective culture composed of both microorganisms against the development of two CPA-producing strains was analysed. This protective culture significantly reduced the CPA concentration of both strains when they were inoculated together with this culture. The mechanisms of action of the biocontrol agents varied depending on the microorganism or the toxigenic mould strain used. In some cases, they inhibited expression of genes involved in the mycotoxin biosynthetic pathway, and in others, a high activity of the gene encoding the PgAFP antifungal protein was observed.

The important risk of contamination of dry-cured meat products with mycotoxins and other secondary metabolites due to colonisation of toxigenic moulds on the surface of these meat products during the ripening process entails the search for strategies to control the growth of undesirable moulds in these products. The control of environmental factors as well as the use of autochthonous microorganisms as biocontrol agents can be used as strategies that minimise the growth of toxigenic moulds and mycotoxin production. In addition, the use of mathematical models to predict the production of mycotoxins is essential for improving the microbiological quality and food safety of dry-cured meat products.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

ARTICULOS INTERNACIONALES

1. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J., Rodríguez, M.
TÍTULO: Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems.
REF. REVISTA/LIBRO: Meat Science 122, 76-83. (2016).
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

2. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, M. Delgado, J., Andrade, M.J., Rodríguez, A.
TÍTULO: Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham.
REF. REVISTA/LIBRO: Food Microbiology, 67, 31-40. (2017).
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

3. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Córdoba, J.J., Rodríguez, M.
TÍTULO: Relationship between cyclopiazonic acid production and gene expression in *Penicillium griseofulvum* under dry-cured ham processing environmental conditions.
REF. REVISTA/LIBRO: International Journal of Food Microbiology. En revision
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

4. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, M., Núñez, F., Silva, A., Rodríguez, A.
TÍTULO: Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and uHPLC-MS/MS.
REF. REVISTA/LIBRO: Food Chemistry. En revisión
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

5. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A. Caballero, D., Rodríguez, M.
TÍTULO: Data mining to predict the production of aflatoxins in dry cured ham.
REF. REVISTA/LIBRO: LWT-Food Science and Technology. En preparación
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

6. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, M., Sulyok, M., Lemmens, M., Rodríguez, A.
TÍTULO: Mycotoxin diffusion in dry cured meat products.
REF. REVISTA/LIBRO: Food Control. En preparación
Área JCR o Índice de impacto: Food Science & Technology Tercio en el que está incluido: 1º

ARTICULOS NACIONALES

1. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Álvarez, M., Padilla, P., Rodríguez, M.

TÍTULO: Influencia de las condiciones ecológicas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus* en sistemas modelos cárnicos.

REF. REVISTA/LIBRO: Eurocarne, 256, 87-94. Mayo, 2017.

ANEXO 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

CONGRESOS INTERNACIONALES

1. AUTORES: Rodríguez, A., Peromingo, B., Delgado, J., Bernáldez, V., Magan, N., Andrade, M.J.

TÍTULO: Impact of *Debaryomyces hansenii* on ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* on dry-cured sausage-based media.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: International Commission on Food Mycology

LUGAR CELEBRACIÓN: Freising, Alemania FECHA: 13-15/06/2016

2. AUTORES: Andrade, M.J., Peromingo, B., Rodríguez, M., Mogedano, M.C., Rodríguez, A.

Título: Influence of cured meat product constituents on *Penicillium verrucosum* growth and ochratoxin A production.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: International Commission on Food Mycology

LUGAR CELEBRACIÓN: Freising, Alemania FECHA: 13-15/06/2016

3. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Bernáldez, V., Núñez, F., Rodríguez, M.

TÍTULO: Influence of ecophysiological factors on growth and aflatoxins production by *Aspergillus* sp. on dry-cured ham-based matrices.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral.

CONGRESO: 25 International ICFMH Conference – FoodMicro 2016

LUGAR CELEBRACIÓN: Dublín, Irlanda FECHA: 19-22/07/2016

4. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Núñez, F., Álvarez, M., Padilla, P., Rodríguez, M.

TÍTULO: Control biológico de mohos productores de ácido ciclopiazónico en jamón curado.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: IX World Congress of Dry-cured Ham

LUGAR CELEBRACIÓN: Toledo, España FECHA: 7-9/06/2017

5. AUTORES: Peromingo, B., Delgado, J., Núñez, F., Padilla, P., Sánchez-Montero, L., Rodríguez, M.

TÍTULO: Development and optimization of a uHPLC-MS/MS method for detection and quantification of cyclopiazonic acid in dry-cured ham.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 7th Congress of European Microbiologists (FEMS)

LUGAR CELEBRACIÓN: Valencia, España FECHA: 9-13/07/2017

6. AUTORES: Peromingo, B., Caballero, D., Alía, A., Bernáldez, V., Bermúdez, E., Rodríguez, A.

TÍTULO: Modeling aflatoxin contamination in dry-cured ham by applying data mining.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 7th Congress of European Microbiologists (FEMS)

LUGAR CELEBRACIÓN: Valencia Fecha: 09-13/07/2017

CONGRESOS NACIONALES

1. AUTORES: Peromingo, B., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., Bermúdez, E., Rodríguez, M., Andrade, M.J.

TÍTULO: Evaluación de *Debaryomyces hansenii* como cultivo protector para reducir la presencia de ocratoxina A en productos cárnicos madurados.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos de la S.E.M.

LUGAR CELEBRACIÓN: Zaragoza FECHA: 24/09/2014

2. AUTORES: Peromingo, B., Núñez, F., Rodríguez, M., Asensio, M.A., Andrade, M.J.

TÍTULO: Efecto de *Debaryomyces hansenii* sobre el crecimiento de *Penicillium verrucosum* y la producción de ocratoxina A en matrices cárnicas.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: VIII Congreso CYTA-CESIA

LUGAR CELEBRACIÓN: Badajoz FECHA: 08/04/2015

3. Autores: Peromingo, B., Sánchez-Montero, L., Bermúdez, E., Alía, A., Andrade, M.J.

TÍTULO: Evaluación de *Debaryomyces hansenii* como cultivo protector para reducir la presencia de ocratoxina A en derivados cárnicos curado-madurados

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: I Workshop de la Red de Excelencia MICOFOOD

LUGAR CELEBRACIÓN: Valencia FECHA: 29-30/06/2015

4. AUTORES: Peromingo, B., Rodríguez, A., Delgado, J., Bermúdez, E., Da Cruz Cabral, L., Rodríguez, M.

TÍTULO: Efecto de la temperatura y la actividad del agua en el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en sistemas modelo cárnicos

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: II Workshop de la Red de Excelencia MICOFOOD

Publicación: Libro de abstracts del congreso

LUGAR CELEBRACIÓN: Cáceres FECHA: 05-06/09/2016

5. AUTORES: Peromingo, B., Núñez, F., Delgado, J., Bernáldez, V., Sánchez-Montero, L., Rodríguez, M.

TÍTULO: Influencia de la temperatura y actividad de agua sobre el crecimiento, expresión génica y producción de aflatoxinas en jamón curado.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral y póster.

CONGRESO: XX Congreso Nacional de Microbiología de los alimentos

LUGAR CELEBRACIÓN: León FECHA: 14-16/09/2016

6. AUTORES: Peromingo, B., Delgado, J., Núñez, F., Andradre, M.J.

TÍTULO: Utilización de *Debaryomyces hansenii* como agente de biocontrol para reducir las micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral y póster.

CONGRESO: Jornadas G9

LUGAR CELEBRACIÓN: Cáceres FECHA: 01/12/2016

