

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria
y Ciencia y Tecnología de los Alimentos



Caracterización enzimática, toxigénica y molecular de hongos filamentosos aislados en jamón D.O.P. de Teruel

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Cristina Alapont Gutiérrez

Dirigida por:

Dra. M^a Carmen López Mendoza

Dr. Pedro Vicente Martínez Culebras

VALENCIA

2015



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

MARÍA CARMEN LÓPEZ MENDOZA, DOCTORA EN VETERINARIA Y PROFESORA AGREGADA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL, SALUD PÚBLICA VETERINARIA Y CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA, TOXIGÉNICA Y MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS EN JAMÓN D.O.P. DE TERUEL” de la que es autora Dña. Cristina Alapont Gutiérrez, Licenciada en Veterinaria, bajo la dirección conjunta del Prof. Dr. Pedro Vicente Martínez Culebras y la que suscribe, reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Alfara del Patriarca (Valencia) a 12 de diciembre de 2014.



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

**PEDRO VICENTE MARTÍNEZ CULEBRAS, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA DE LA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA, TOXIGÉNICA Y MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS EN JAMÓN D.O.P. DE TERUEL" de la que es autora Dña. Cristina Alapont Gutiérrez, Licenciada en Veterinaria, bajo la dirección conjunta de la Prof. Dra. M^a Carmen López Mendoza y el que suscribe, reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Alfara del Patriarca (Valencia) a 12 de diciembre de 2014.

Para mi tío Miguel

Quiero dar las gracias a todas las personas que, en mayor o menor medida, han hecho posible la realización de este trabajo.

A mis directores, Dra. M^a Carmen López Mendoza y Dr. Pedro Vicente Martínez Culebras, por sus enseñanzas, sus ánimos y su dedicación gracias a los cuales ha sido posible la realización de esta Tesis. Ha sido una suerte a nivel personal poder trabajar con vosotros todos estos años. Por todo ello, gracias.

Carmen, gracias por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo durante el cual he aprendido y disfrutado tanto, y, como no, gracias por todas tus enseñanzas en el fascinante mundo de la microbiología.

Pedro, gracias por tu apoyo y toda la ayuda que me has prestado en las técnicas moleculares, sin las cuales, sinceramente, no hubiera sido posible.

Al responsable del laboratorio del CEU, Dr. José Antonio García Bautisa, por facilitarme tanto la labor en el laboratorio y por su asesoramiento en la extracción de micotoxinas.

Al personal de laboratorio del CEU, Ana María Ferrer Dasí, Vanessa Jiménez Aguilar, Cristina Macías Maicas y Rocío Rodrigo Capella, por vuestra ayuda con el material y los reactivos. Gracias por vuestros ánimos, apoyo, amistad y por ponérmelo tan fácil.

Al Dr. José Vicente Gil Ponce por su ayuda con el HPLC.

Al profesor Dr. Vicente Rodilla Alama por su asesoramiento durante la extracción de las micotoxinas en el jamón.

A la técnico de laboratorio del IATA, Ana Izquierdo, por toda la ayuda prestada en la extracción de ADN a partir de medio líquido.

A la Dra. Ana-Rosa Ballester y Dra. Ana Crespo Sempere, por su asesoramiento en las PCR's y en la determinación de micotoxinas.

A mi hermana, gracias por tu ayuda en el procesamiento de las imágenes de electroforesis, y, por supuesto, mil gracias por tus ánimos, tu apoyo y todo tu interés volcado en los "bichitos" del jamón.

A mis padres. Gracias por sufrir y alegraros conmigo. Gracias por vuestro respaldo incondicional y todo el cariño que me habéis dado.

A Carlos, por tu respaldo, tu cariño y por estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

I. Introducción	1
I.1. Microbiología del jamón curado	2
I.2. Efectos del desarrollo fúngico en el jamón curado	6
I.2.1. Efectos beneficiosos de los hongos en el jamón curado	8
I.2.2. Efectos indeseables de los hongos en el jamón curado: micotoxinas	11
I.2.2.1. Ocratoxina A	14
I.2.2.2. Ácido ciclopiazónico	19
I.3. Detección y control de OTA y CPA en jamón curado	21
I.4. Taxonomía e identificación de los hongos del género <i>Penicillium</i>	26
I.5. Objetivos	35
II. Material y métodos	36
II.1. Procedencia de las muestras	37
II.2. Procedimiento de toma de muestras	38
II.2.1. Muestras para el aislamiento fúngico	38
II.2.2. Muestras para el análisis de micotoxinas	39
II.3. Aislamiento y recuento de hongos	39
II.4. Mantenimiento y conservación de los hongos	40
II.5. Identificación de los hongos	40
II.6. Caracterización mediante ap-PCR	42

II.6.1. Extracción de ADN	42
II.6.2. Arbitrary Primers (ap-PCR)	42
II.6.3. Dendrograma	43
II.7. Secuenciación de la región 5.8S-ITS del ADN ribosomal	44
II.7.1. Extracción de ADN	44
II.7.2. Amplificación del ADN ribosomal mediante PCR	45
II.7.3. Purificación de ADN	46
II.7.4. Secuenciación 5.8S-ITS ADN ribosomal	46
II.7.5. Análisis de secuencias y árbol filogenético	46
II.8. Cepas de referencia	47
II.9. Determinación actividad toxigénica	48
II.9.1. Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en medio de cultivo	48
II.9.2. Extracción, detección y cuantificación de CPA y OTA en muestras de jamón	53
II.10. Determinación de la actividad enzimática de los hongos aislados	55
II.10.1. Actividad lipolítica	55
II.10.2. Actividad proteolítica	56
III. Resultados y discusión	58
III.1. Recuento, aislamiento e identificación de los hongos presentes en el jamón y ambiente	59
III.1.1. Recuento de hongos	59
III.1.2. Aislamiento e identificación morfológica de los hongos	61

III.1.3. Identificación molecular de los hongos aislados	66
III.1.3.1. Caracterización molecular de <i>Penicillium</i> mediante ap-PCR	66
III.1.3.2. Secuenciación de la región 5.8S-ITS del ADN ribosomal	70
III.2. Análisis filogenético de las cepas de <i>Penicillium</i>	75
III.2.1. Árbol filogenético	75
III.2.2. Dendrograma	81
III.3. Detección y cuantificación de CPA y OTA <i>in vitro</i>	85
III.3.1. Detección y cuantificación de CPA <i>in vitro</i>	86
III.3.2. Detección y cuantificación de OTA <i>in vitro</i>	90
III.4. Detección y cuantificación de CPA y OTA en jamón	95
III.4.1. Detección y cuantificación de CPA en jamón	95
III.4.2. Detección y cuantificación de OTA en jamón	98
III.5. Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica de las cepas	101
III.5.1. Actividad lipolítica	101
III.5.2. Actividad proteolítica	109
IV. Conclusiones	116
V. Resumen	121
VI. Summary	123
VII. Bibliografía	125
Anexo	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la población microbiana superficial durante el proceso de elaboración del jamón ibérico.	3
Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A.	15
Figura 3. Estructura química del ácido cliclopiazónico.	19
Figura 4. Notificaciones de alertas alimentarias de miembros del RASFF en 2013 (RASFF, 2013).	24
Figura 5. A) Cultivo de <i>Penicillium</i> B) Representación de las partes del conidióforo del género <i>Penicillium</i> .	27
Figura 6. Colonia (A) y conidióforo (B y C) de <i>Penicillium</i> subgénero <i>Penicillium</i> .	29
Figura 7. Genes del ribosoma que codifican para los ARNr 18S, 5.8S y 28S, y espaciadores internos ITS1 e ITS2.	32
Figura 8. Toma de muestras en la etapa de secado de uno de los secaderos incluidos en el estudio.	38
Figura 9. Procedimiento de identificación de las colonias aisladas en el estudio.	42
Figura 10. A y B) Extracción de una muestra de <i>Aspergillus</i> mediante un sacabocados a los 7 días de incubación en el medio de cultivo CYA.	49
Figura 11. Cromatograma de un patrón comercial de CPA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico del CPA se produce a los 9,6 minutos.	50
Figura 12. Espectro completo de absorción de un patrón de CPA medido a una longitud de onda de 279 nm.	50
Figura 13. Cromatograma de un patrón comercial de OTA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico de la OTA se produce a los 4,4 minutos.	51

Figura 14. Espectro completo de absorción de la OTA (longitud de onda de 330 nm).	51
Figura 15. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.	52
Figura 16. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.	52
Figura 17. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.	54
Figura 18. Curva que representa la relación polinómica entre la absorbancia obtenida en el ensayo ELISA de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.	55
Figura 19. A) Hongos ambientales crecidos en agar PDA B) Hongos aislados en jamón crecidos en agar DRBC.	59
Figura 20. Aspecto macroscópico y microscópico de un cultivo de A) <i>Penicillium</i> ; B) <i>Aspergillus</i> ; C) <i>Cladosporium</i> .	62
Figura 21. Representación de los distintos géneros fúngicos aislados en jamón y ambiente en ambos secaderos.	64
Figura 22. Patrones de bandas obtenidos tras la amplificación de ADN genómico de las cepas mediante los cebadores específicos [(GAC) ₅], [(GACA) ₄] y [(GACAG) ₃]. Los carriles M se corresponden con el marcador de pesos moleculares (GenRuler™ 100 bp Plus Dna Ladder). Las cepas 72, 72a, y 72b dieron lugar al mismo patrón de bandas con el cebador [(GAC) ₅], las cepas 133, 133a, 133b, 133c, 133d, 133e, 133f y 133g y las cepas 132, 132a, 132b, 132d, 132e y 132f presentaron el mismo patrón con el cebador [(GACA) ₄] y las cepas 1 y 1a y las cepas 17, 17c y 18 dieron lugar al mismo patrón de bandas con el cebador [(GACAG) ₃] (Tabla 15).	68
Figura 23. Gel de agarosa con marcador de pares de bases (M; GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder) y bandas de ADN fúngico amplificado (carriles 1 – 8).	71
Figura 24. Frecuencias de aislamiento (%) de las principales especies identificadas.	74

Figura 25. Frecuencias de aislamiento (%) de las especies mayoritarias identificadas en cada etapa.	75
Figura 26. Árbol filogenético sin raíz obtenido mediante el método de “Neighbor Joining”, utilizando el modelo de Jukes-Cantor para estimar las distancias. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que aparece la agrupación determinada al realizar el análisis por remuestreo de 1000 réplicas según el modelo de “bootstrap”. En el árbol se incluyen las secuencias pertenecientes a las cepas utilizadas como referencia, así como las secuencias de las cepas de <i>Penicillium</i> identificadas a partir de las muestras de jamón y ambiente. Las cepas resaltadas en rojo resultaron productoras de OTA, resaltadas en azul productoras de CPA y resaltadas en verde resultaron productoras de OTA y CPA.	80
Figura 27. Dendrograma de las cepas de <i>Penicillium</i> obtenido por el método UPGMA. En el dendrograma se incluyen las secuencias pertenecientes a las cepas utilizadas como referencia, así como las secuencias de las cepas de <i>Penicillium</i> aisladas a partir de las muestras de jamón y ambiente. Las cepas resaltadas en rojo son productoras de OTA, resaltadas en azul productoras de CPA y resaltadas en verde son productoras de OTA y CPA.	156
Figura 28. Patrones de bandas de ap-PCR obtenidos con [GAC] ₅ , [GACA] ₄ y [GACAG] ₃ a partir de las cepas H09-54, H09-54a, H09-54b y H09-54c. Las cepas presentaron los mismos patrones para los 3 cebadores empleados: patrón GAC-7 (cebador [GAC] ₅), patrón GACA-5 (cebador [GACA] ₄) y patrón GACAG-8 (cebador [GACAG] ₃) y resultaron genéticamente idénticas en el análisis.	83
Figura 29. Patrones de bandas de ap-PCR obtenidos con [GAC] ₅ , [GACA] ₄ y [GACAG] ₃ a partir de las cepas H09-108b, H09-108 y H09-108a. Las cepas presentaron los mismos patrones para los cebadores [GACA] ₄ (patrón GACA-15) y [GACAG] ₃ (patrón GACAG-17) y resultaron genéticamente semejantes en el análisis, con un coeficiente de similitud de 0,95.	84
Figura 30. Agrupación B del dendrograma representado en la Figura 27.	84
Figura 31. Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de CPA a 9,650 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 279 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con el CPA.	86

- Figura 32.** Cepas productoras de OTA y CPA entre las cepas representantes con 25 °C de incubación. Para la producción de OTA la 1ª y 2ª extracción corresponden con el 7º y 14º día de incubación, respectivamente, y para el CPA corresponden con el 14º y 21º día de incubación, respectivamente. 89
- Figura 33.** Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de OTA a 4,392 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 330 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con la OTA. 90
- Figura 34.** Cepas de *Penicillium* con actividad lipolítica alta (> 10mm tamaño halo) frente al ácido láurico tras su incubación a 28°C durante 15 días en medio de cultivo Tween-80. 101
- Figura 35.** Cepas de *Penicillium* con actividad proteolítica alta (> 10mm tamaño halo) tras su incubación a 28°C durante 15 días en medio de cultivo PDA-Caseína. 109
- Figura 36.** SDS-PAGE de la hidrólisis de la miosina producida por diferentes cepas. **M** : Marcador Sigma M3788; **H09-2**: *P. atrovireneum*; **H09-106**: *P. carneum*; **H09-86**: *P. atramentosum*; **H09-5**: *C. cladosporioides*; **H09-9**: *A. tenuissima*; **H09-89**: *P. commune*; **CECT 2267**: *P. camemberti*; **C**: Control negativo. 113
- Figura 37.** Procedencia de las cepas con actividad lipolítica y proteolítica identificadas en el estudio. Los resultados están expresados sobre el total de cepas lipolíticas (70 cepas) y sobre el total de cepas proteolíticas (39 cepas), respectivamente. 115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies fúngicas aisladas en jamón curado.	5
Tabla 2. Producción de micotoxinas por especies de <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i> asociadas a productos cárnicos.	8
Tabla 3. Relación entre sabores y estructuras aminoacídicas.	10
Tabla 4. Influencia de los hongos y las levaduras en determinadas características del jamón.	11
Tabla 5. Principales micotoxinas descritas en productos cárnicos.	12
Tabla 6. Micotoxinas detectadas en productos cárnicos tras la inoculación de hongos toxigénicos.	13
Tabla 7. Micotoxinas detectadas en productos cárnicos durante su comercialización.	14
Tabla 8. Especies de <i>Penicillium</i> productoras de OTA (diferentes de <i>P. verrucosum</i> y <i>P. viridicatum</i>).	17
Tabla 9. Especies de <i>Penicillium</i> productoras de CPA.	20
Tabla 10. Toma de muestras de jamón y ambiente realizada en los dos secaderos estudiados (S1 y S2).	37
Tabla 11. Cepas de referencia.	47
Tabla 12. Recuentos fúngicos obtenidos en las diferentes etapas de elaboración de los secaderos 1 y 2.	60
Tabla 13. Géneros fúngicos aislados (%) en las diferentes etapas de producción del jamón.	63

Tabla 14. Tamaño de los fragmentos de amplificación por ap-PCR obtenidos con cada uno de los cebadores utilizados: [(GAC) ₅], [(GACA) ₄] y [(GACAG) ₃].	67
Tabla 15. Patrones de bandas obtenidos con cada uno de los cebadores específicos empleados en la caracterización molecular de las cepas de <i>Penicillium</i> aisladas: [(GAC) ₅], [(GACA) ₄] Y [(GACAG) ₃]. Las cepas seleccionadas para secuenciar se encuentran resaltadas en rojo. El tamaño de los fragmentos de amplificación que componen cada patrón se indica en la Tabla 14.	69
Tabla 16. Identificación molecular de las cepas mediante secuenciación de la región 5,8S-ITS.	71
Tabla 17. Agrupación de cepas con secuencia 5,8S-ITS idéntica.	76
Tabla 18. Concentración de OTA y CPA (µg/g de medio de cultivo) de las cepas productoras.	94
Tabla 19. Detección y cuantificación de OTA y CPA en muestras de jamón.	98
Tabla 20. Actividad lipolítica y proteolítica de las cepas identificadas sobre medio de cultivo Tween y PDA-Caseína.	106

I. INTRODUCCIÓN

I.1. MICROBIOLOGÍA DEL JAMÓN CURADO

El jamón curado es un producto cárnico de gran valor comercial, sensorial y nutritivo que presenta una gran importancia en el sector cárnico español. Actualmente existen seis Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) de jamón curado en España, entre las que destaca la D.O.P. Jamón de Teruel ya que fue la primera que se creó en nuestro país para amparar, controlar y garantizar la producción de jamones. El proceso de elaboración del jamón D.O.P. de Teruel tiene una duración mínima de 60 semanas durante las cuales se desarrollan las siguientes fases: salazón (incorporación de sales a la masa muscular, que favorecen la deshidratación del pernil y su perfecta conservación), lavado (para eliminar la sal adherida), asentamiento o postsalado (difusión de la sal hacia el interior de las piezas cárnicas, eliminándose lenta y paulatinamente el agua), curado (en secaderos cuyas condiciones ambientales son las propias de la zona) y envejecimiento (en esta fase se producen las reacciones bioquímicas responsables del aroma y sabor característico). A lo largo de estas etapas se produce una lenta y gradual reducción del contenido acuoso que, unida a una evolución de diferentes procesos enzimáticos naturales, permite el desarrollo de las propiedades sensoriales propias del producto.

Uno de los factores implicados en los procesos enzimáticos que experimenta el producto durante su maduración es la microbiota existente en su superficie, la cual está condicionada por la presencia de NaCl en la pieza y por la reducción progresiva de la a_w (actividad de agua) tanto en la superficie como en profundidad. Estos cambios físico-químicos van a reducir los recuentos bacterianos y de levaduras mientras que los mohos van a incrementar su diversidad y recuento a lo largo del proceso de elaboración. Así, en las etapas iniciales la microbiota está constituida principalmente por micrococáceas, pertenecientes en su mayor parte al género *Staphylococcus*, y levaduras, mayoritariamente del género *Debaryomyces* (Carrascosa y Cornejo, 1991; Francisco y col., 1981; Molina y col., 1990; Núñez y

col., 1996) mientras que a partir del secado predominan los mohos, principalmente las especies de *Penicillium* y al final de la maduración además *Eurotium* y *Aspergillus* (Figura 1) (Huerta y col., 1987; Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996; Rojas y col., 1991).

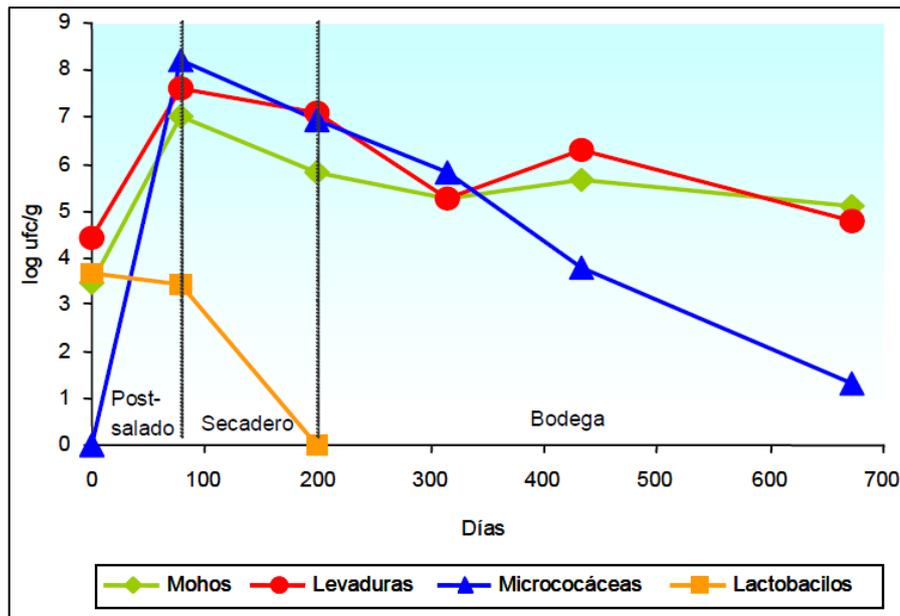


Figura 1. Evolución de la población microbiana superficial durante el proceso de elaboración del jamón ibérico (Núñez, 1995; Rodríguez, 1995).

Diversos trabajos se han ocupado de caracterizar la biota fúngica del jamón curado durante su procesado (Tabla 1). Así, Huerta y col. (1987) concluyeron que al iniciarse el periodo de secado, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium purpurogenum* dominaron sobre las otras especies. Motilva y col. (1991) estudiaron los mohos presentes hasta la semana 13 de curado y hallaron que la frecuencia en que el género *Penicillium* aparecía en jamones blancos disminuía durante el salado, aumentaba durante el reposo y volvía a disminuir a partir de las 10 semanas de curado, contrario de lo que ocurría con el género *Aspergillus*, cuya frecuencia, siempre muy baja, disminuía cuando se producía algún cambio de temperatura (de 3 a 15°C) o humedad (de 80-

85 a 10-80%). Dentro del género *Penicillium*, Huerta y col. (1987) hallaron las siguientes especies como predominantes: *Penicillium notatum*, *P. purpurogenum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium cyaneofulvum*. Rojas y col. (1991) identificaron los grupos de *Aspergillus*: *glaucus*, *fumigatus*, *niger* y *flavus* como los grupos más abundantes por este orden. Respecto a las especies de este género, Huerta y col. (1987) observaron que *Aspergillus halophilicus*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus chevalieri* y *Aspergillus niger* son las mayoritarias, representando cada una más del 10%.

Aunque con menor frecuencia, también se han aislado otras especies fúngicas de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aurobasidium*, *Syncephalastrum* y *Curvularia* en jamón ibérico (Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996) y *Mucor* y *Fusarium* en jamones elaborados en Croacia (Comi y col., 2004). La variedad de la población fúngica parece estar relacionada con la localización geográfica de las instalaciones de procesado y con el tipo elaboración (Comi y col., 2004; Leistner y Ayres, 1968; Peintner y col., 2000). Así, un estudio sobre la microbiota típica del jamón *speck* (jamón originario de la región del Tirolo) concluyó que la diversidad de la población fúngica descendía cuanto más industrializado era el proceso de elaboración (Peintner y col. 2000). Asimismo, Comi y col. (2004) identificaron especies fúngicas similares en las diferentes fases de procesado de un tipo de jamón producido en Croacia, lo que podría indicar que la población fúngica superficial proviene del aire y de las cámaras de maduración más que de la carne cruda.

Tabla 1. Especies fúngicas aisladas en jamón curado

Especie	Referencias bibliográficas
Aspergillus	
<i>A. amstelodami</i>	Huerta y col., 1987
<i>A. chevalieri</i>	Huerta y col., 1987
<i>A. flavus</i>	Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987; Rojas y col., 1991; Sutic y col., 1972; Wang y col., 2006
<i>A. fumigatus</i>	Asefa y col., 2009; Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Rojas y col., 1991; Wang y col., 2006
<i>A. halophilicus</i>	Huerta y col., 1987
<i>A. niger</i>	Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Rojas y col., 1991; Wang y col., 2006
<i>A. ochraceus</i>	Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987; Rojas y col., 1991; Sutic y col., 1972; Wang y col., 2006
<i>A. parasiticus</i>	Comi y col., 2004
<i>A.versicolor</i>	Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Rojas y col., 1991; Sutic y col., 1972; Wang y col., 2006
Eurotium	
<i>E. amstelodami</i>	Asefa y col., 2009; Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Spotti y col., 1989; Sutic y col., 1972
<i>E. herbariorum</i>	Asefa y col., 2009; Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Rojas y col., 1991
<i>E. repens</i>	Comi y col., 2004; Leistner y Ayres, 1967; Monte y col., 1986; Nuñez y col., 1996; Spotti y col., 1989; Spotti y col., 2001b; Sutic y col., 1972
<i>E. rubrum</i>	Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b; Sutic y col., 1972
Penicillium	
<i>P. atramentosum</i>	Asefa y col., 2009
<i>P. brevicompactum</i>	Asefa y col., 2009; Leistner y Ayres, 1967; Monte y col., 1986; Nuñez y col., 1996; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b
<i>P. camemberti</i>	Spotti y col., 2001b
<i>P. canescens</i>	Peintner y col., 2000
<i>P. cavernicola</i>	Asefa y col., 2009
<i>P. chrysogenum</i>	Asefa y col., 2009; Battilani y col., 2007; Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 1989 y 2001b
<i>P. citrinum</i>	Battilani y col., 2007; Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Spotti y col., 1989; Tabuc y col., 2004
<i>P. commune</i>	Asefa y col., 2009; Comi y col., 2004; Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b
<i>P. crustosum</i>	Asefa y col., 2009; Tabuc y col., 2004
<i>P. cyaneofulvum</i>	Huerta y col., 1987
<i>P. cyclopium</i>	Comi y col., 2004; Dragoni y col., 1980; Leistner y Ayres, 1967; Monte y col., 1986; Spotti y col., 1989; Tabuc y col., 2004
<i>P. digitatum</i>	Huerta y col., 1987
<i>P. echinulatum</i>	Asefa y col., 2009; Nuñez y col., 1996
<i>P. expansum</i>	Asefa y col., 2009; Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967; Monte y col., 1986; Nuñez y col., 1996; Spotti y col., 2001b; Tabuc y col., 2004
<i>P. glabrum</i>	Comi y col., 2004; Dragoni y col., 1980; Leistner y Ayres, 1967; Peintner y col., 2000
<i>P. gladioli</i>	Spotti y col., 2001b
<i>P. glandicola</i>	Huerta y col., 1987; Tabuc y col., 2004
<i>P. griseofulvum</i>	Spotti y col., 2001b
<i>P. jensenii</i>	Nuñez y col., 1996; Spotti y col., 1989
<i>P. lanosum</i>	Tabuc y col., 2004
<i>P. nalgiovense</i>	Asefa y col., 2009; Battilani y col., 2007; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b; Tabuc y col., 2004
<i>P. nordicum</i>	Battilani y col., 2007
<i>P. notatum</i>	Huerta y col., 1987
<i>P. oxalicum</i>	Nuñez y col., 1996
<i>P. palitans</i>	Asefa y col., 2009; Tabuc y col., 2004
<i>P. purpurogenum</i>	Huerta y col., 1987; Leistner y Ayres, 1967
<i>P. restrictum</i>	Nuñez y col., 1996
<i>P. roqueforti</i>	Battilani y col., 2007; Leistner y Ayres, 1967

Especie	Referencias bibliográficas
<i>P. rugulosum</i>	Leistner y Ayres, 1967; Nuñez y col., 1996
<i>P. simplicissimum</i>	Monte y col., 1986
<i>P. solitum</i>	Asefa y col., 2009; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b; Tabuc y col., 2004
<i>P. verrucosum</i>	Comi y col., 2004; Peintner y col., 2000; Spotti y col., 1989; Spotti y col., 2001a
<i>P. viridicatum</i>	Leistner y Ayres, 1967; Monte y col., 1986; Nuñez y col., 1996; Spotti y col., 2001b; Tabuc y col., 2004
<i>P. waksmanii</i>	Peintner y col., 2000; Spotti y col., 2001b

I.2. EFECTOS DEL DESARROLLO FÚNGICO EN EL JAMÓN CURADO

Las condiciones ecológicas de las cámaras de maduración y la reducción progresiva de la a_w del producto favorecen el desarrollo de una abundante población fúngica en la superficie del jamón curado. Debido al prolongado tiempo necesario para el procesado del jamón, la biota fúngica puede actuar durante un largo periodo en el producto, por lo que juega un papel importante en su maduración, ya que puede influir tanto en las características sensoriales como en la salubridad del producto. Así, estos microorganismos pueden contribuir en los procesos madurativos que tienen lugar durante el procesado, ya que tienen un papel decisivo en la génesis de compuestos volátiles que contribuyen al aroma característico del jamón madurado, concretamente los productos originados de la lipólisis y proteólisis que se producen durante la maduración (Alonso, 2004; Martín y col., 2003). Del mismo modo, los hongos crean un microclima en la superficie que mejora la textura y calidad sensorial del producto al favorecer que la pérdida de agua durante su procesado sea gradual, permitiendo que el producto pueda sufrir largos periodos de maduración para alcanzar el aroma característico (Lücke, 1986; Lücke y Hechelmann, 1987). En este sentido, diversos trabajos que caracterizaron cepas fúngicas aisladas en jamón concluyeron que la mayoría de ellas poseen una actividad catalasa moderada, destruyen peróxidos y reducen las reacciones oxidativas y la formación de compuestos como biliverdina, bilirrubina, urobilina y estercolina por lo que, en consecuencia, disminuyen el enranciamiento y estabilizan el color del producto (Burgos, 1981; Geisen, 1992; Ludemann y col., 2004; Núñez, 1995). Asimismo, algunos hongos liberan

metabolitos con efecto antimicrobiano que pueden limitar el crecimiento de otros microorganismos patógenos y/o alterantes del producto (Bello-Gutiérrez, 2008). En este sentido, Núñez y col. (1996) pusieron de manifiesto que el 76% de los mohos aislados de jamón ibérico son capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Además, según estudios realizados por Huerta y col. (1987) y Mislivec y col. (1988), algunas especies de hongos no toxigénicos son capaces de inhibir la producción de micotoxinas e incluso de destruir las micotoxinas producidas por otras especies en productos alimenticios.

Por otro lado, ciertos hongos pueden alterar el producto organolépticamente y/o producir metabolitos secundarios tóxicos, conocidos con el nombre de micotoxinas. El deterioro de las características sensoriales se debe a la producción de exoenzimas durante el crecimiento fúngico. Una vez en el alimento, estas enzimas pueden continuar su actividad independientemente de que se produzca la eliminación del micelio, causando desde olores o coloraciones desagradables hasta la completa desintegración de la estructura del mismo. No obstante, el aspecto más preocupante es su capacidad para producir micotoxinas. El potencial toxigénico de los mohos aislados en productos cárnicos se ha establecido basándose en distintas observaciones (Tabla 2). En este sentido, se comprobó que el 80% de 1481 aislamientos de cepas del género *Penicillium* eran potencialmente toxigénicos (Eckardt y col., 1979). Asimismo, en el estudio realizado por Núñez y col. (1996) se concluyó que más del 75% de los mohos aislados en jamón ibérico mostraban toxicidad o mutagenicidad en ensayos biológicos. Algunas de estas cepas mostraron capacidad de producción de micotoxinas en medios de cultivo constituidos únicamente por extracto de carne y cloruro sódico (Díaz, 1999; Núñez y col., 2000; Rodríguez de Ledesma y col., 1996; Sosa y col., 2002).

Tabla 2. Producción de micotoxinas por especies de *Penicillium* y *Aspergillus* asociadas a productos cárnicos.

Especie	Micotoxinas producidas ¹
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina B1, Ácido ciclopiazónico, Ácido 3-nitropropiónico
<i>A. niger</i>	Ocratoxina A, Fumonisina B2
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A, Ácido penicílico, Xantomegnina, Vioxantina
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Verrucosidina, Ácido penicílico, Ácido terréstrico, Glicopéptidos nefrotóxicos
<i>P. brevicompactum</i>	Ácido micofenólico, Botriodiploidina
<i>P. chrysogenum</i>	Ácido secalónico, Toxina PR, Roquefortina C, Ácido ciclopiazónico
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>P. crustosum</i>	Ácido terréstrico, Penitrem, Roquefortina C
<i>P. cyclopium</i>	Ácido penicílico, Xantomegnina, Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina, Citrinina, Chaetoglobosinas, Communesinas, Roquefortina C
<i>P. glabrum</i>	Citromicetina
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina, Griseofulvina, Roquefortina C, Ácido ciclopiazónico
<i>P. nalgiovense</i>	Ocratoxina A
<i>P. nordicum</i>	Ocratoxina A, Ácido virídico
<i>P. oxalicum</i>	Ácidos secalónicos, Roquefortina C
<i>P. palitans</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>P. roqueforti</i>	Ácido micofenólico ² , Toxina PR, Roquefortina C
<i>P. rugulosum</i>	Rugulosina
<i>P. solitum</i>	-
<i>P. variabile</i>	Rugulosina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, citrinina
<i>P. viridicatum</i>	Ácido penicílico, Ácido virídico, Ácido ciclopiazónico, Ocratoxina A

¹Basado en Escher y col. (1973), Frisvad y col. (2004), Frisvad y Thrane (2002), Galtier y Le Bars (1973), Pitt (1979).

²El ácido micofenólico no está catalogado como micotoxina pero es un componente inmunodepresor.

I.2.1. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS HONGOS EN EL JAMÓN CURADO

La población fúngica que coloniza la superficie del jamón curado presenta diversas actividades metabólicas que pueden mejorar las características sensoriales del producto durante su maduración, un proceso que requiere la presencia de hongos, particularmente los autóctonos, que determinan las características específicas del producto asociadas a cada zona de producción (Toledano y col., 2011). La calidad sensorial del jamón está condicionada por

numerosos factores, entre los que se encuentran: pH, contenido en humedad, a_w , potencial redox, contenido de NaCl, lipólisis y proteólisis (Buscailhon y Monin, 1994a y 1994b). Varios estudios han puesto de manifiesto la capacidad proteolítica y lipolítica de algunas cepas fúngicas aisladas de la superficie del jamón durante su maduración, influyendo también en el sabor, flavor y aroma del mismo (Bruna y col., 2003; Díaz y col., 1997; Ludemann y col., 2004; Martín y col., 2001a y 2001b; Scolari y col., 2003; Sunesen y Stahnke, 2003; Visessanguan y col., 2004; Zapelena y col., 1999). Generalmente la proteólisis en los productos cárnicos se ha asociado a la actividad de los enzimas presentes en el tejido muscular (Sárraga y col., 1993; Toldrá y col., 1996). Sin embargo, diversos trabajos han puesto de manifiesto que algunas cepas de hongos aisladas en jamón curado presentan una actividad proteolítica intensa tras su inoculación en carne de cerdo estéril y productos cárnicos madurados, produciendo un gran incremento de aminoácidos libres transcurrido el periodo de incubación (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2003, 2004a, 2004b). Algunos hongos en los que se ha comprobado la presencia de actividad proteolítica son *Penicillium chrysogenum* y *Debaryomyces hansenii*, (Martín y col., 2004a). También, Córdoba y col. (1994) y Rodríguez y col. (1994) demostraron dicha actividad por parte de *P. chrysogenum* al detectar un mayor incremento tanto de aminoácidos libres como de ciertas aminos procedentes de la mencionada hidrólisis proteica, en las zonas superficiales de la pieza de jamón curado. Del mismo modo, Toledano y col. (2011) demostraron in vitro que ciertas cepas de *P. chrysogenum* desarrollan una elevada actividad proteolítica frente a la miosina porcina. Núñez (1995) puso de manifiesto la existencia de diversas cepas de *P. chrysogenum* que presentaban actividad aminopeptidasa, especialmente frente a sustratos con metionina, por lo que quedó demostrado que la población fúngica del jamón podría favorecer los cambios característicos en los compuestos nitrogenados. Sin duda estos compuestos nitrogenados desempeñan un papel importante en las propiedades sápidas del jamón, contribuyendo al sabor amargo si predominan aminoácidos hidrofóbicos o al sabor umami si predominan los ácidos aspártico y glutámico (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre sabores y estructuras aminoacídicas.

Ácido:	ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, histidina.
Amargo:	anserina, carnosina, creatina, creatinina, hipoxantina.
Dulce:	alanina, glicina, hidroxiprolina, prolina, serina, treonina.
Salado:	aspartato, glutamato.

Fuente: Bello-Gutiérrez (2008)

Los cambios lipídicos que experimenta el producto durante el procesado, como la lipólisis y oxidación de ácidos grasos libres, tienen también un gran impacto en la calidad sensorial del producto final ya que, como resultado, se liberan numerosos productos que desempeñan un papel importante en la formación del sabor y aroma característico del jamón, tales como aldehídos, alcoholes, cetonas y otros compuestos (Buscailhon y col., 1994a; Flores y col., 1997; Marusic y col., 2011; Ordoñez y col., 1999). En este sentido, Selgas y col. (1999) y Toledo y col. (1996) probaron que las lipasas producidas por la microbiota desarrollada en superficie de embutidos curados y otros productos cárnicos incrementaron los niveles de ácidos grasos libres en el producto. Del mismo modo, numerosos trabajos han descrito la actividad lipolítica de diversas especies de *Penicillium* aisladas en productos cárnicos (Alonso, 2004; Núñez y col., 1995; Seitz, 1990; Trigueros y col., 1995). Las lipasas fúngicas son activas a una temperatura entre 15 y 25°C y una a_w de 0,95 a 0,85 (Magan y col., 1993), por lo que podrían actuar en las condiciones que encuentran en el jamón a partir de la etapa de post-salado. En este sentido, Toledo y col. (1996) observaron que los hongos pueden provocar un incremento en la concentración de ácidos grasos libres en productos cárnicos madurados. También Núñez (1995) y Alonso (2004) observaron actividad lipolítica en cepas del género *Penicillium* aisladas en embutidos y en jamón, respectivamente. Del mismo modo, los hongos también participan en los procesos oxidativos de los ácidos grasos contribuyendo de forma positiva a las características organolépticas, más concretamente al flavor, siempre que se produzcan en proporciones moderadas, pero que pueden tener una incidencia negativa cuando alcanzan los niveles de enranciamiento. (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de los hongos y las levaduras en determinadas características del jamón.

Características	Efecto	Levaduras	Mohos
Color	Disminución del Eh en el interior	++	-
	Destrucción de peróxidos	+	+
Aroma	Proteólisis	+	++
	Lipólisis	++	++
	Retarda el enranciamiento	+	++
Conservación	Competencia con microbiota natural	-	+++
Superficie	Apariencia	+	+++
	Protección frente a la luz y el oxígeno	-	+++
	Regulación de la maduración	+	+++
Calidad sanitaria	Prevención de la presencia de micotoxinas	-	+++

Fuente: Lücke y Hechelmann (1987)

Simbología: (-) Ausencia de efecto; (+) Intensidad leve; (++) Intensidad moderada; (+++) Intensidad elevada.

Por ello, los procesos de larga duración proporcionan jamones con elevada intensidad aromática, como consecuencia de la gran cantidad de compuestos volátiles formados, tanto en la oxidación de los ácidos grasos libres (sobre todo en la etapa de salado, reposo y primeros días de maduración) como en la degradación de los aminoácidos (en etapas más avanzadas de la maduración) (Ayres y col., 1980; Buscailhon y col., 1993, 1994a y 1994b; Countron-Gambotti y col., 1999; Flores y col., 1997; Toldrá y col., 1996).

I.2.2. EFECTOS INDESEABLES DE LOS HONGOS EN EL JAMÓN CURADO: MICOTOXINAS

Entre los efectos perjudiciales atribuibles al desarrollo de mohos en la superficie de las piezas destaca la producción de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea origina una respuesta tóxica en el hombre y los animales (Frisvad y Thrane, 1996). Diversas investigaciones han estudiado los efectos tóxicos causados por micotoxinas descritas en productos cárnicos (Tabla 5).

Tabla 5. Principales micotoxinas descritas en productos cárnicos.

Micotoxina	Efectos tóxicos ¹	IDA
Ácido ciclopiazónico	Hepatotóxico, toxicidad muscular y esplénica	10 µg/kg p.v. (Burdock y Flamm., 2000)
Ácido micofenólico ²	Inmunodepresión	
Ácido penicílico	Citotóxico	
Ácido terréstrico	Cardiotóxico	
Ácido virídico	Toxicidad aguda	
Aflatoxina B1	Carcinogénico (grupo 1), Citotóxico	Mínimo posible (FAO/WHO, 1999)
Chaetoglobosina	Citotóxico	
Chantomegnina	Hepatotoxicidad, Nefrotoxicidad	
Citrinina	Citotóxico, Nefrotóxico	
Communesina	Citotóxico	
Esterigmatocistina	Carcinogénico (grupo 2)	
Fumonisina B2	Carcinogénico (grupo 2), Cito-, Hepatotóxico	2 µg/kg p.v. (FAO/WHO., 2002)
Ocratoxina A	Carcinogénico (grupo 2), Teratogénico, Hepato-, Nefrotóxico	14 ng/kg p.v. ³ (FAO/WHO; 2007)
Patulina	Citotóxico	0,4 µg/kg p.v. (FAO/WHO, 1995)
Roquefortina C	Neurotóxico	
Toxina PR	Inhibición de ARN polimerasa	
Verrucosidina	Convulsiones	

¹Efectos toxicológicos basados en Hussein y Brasel (2001), Bennet y Klich (2003), Frisvad y col. (2004) y evaluaciones del riesgo carcinogénico en humanos realizadas por la International Agency for Research on Cancer (IARC), (1976, 1993, 2002).

²El ácido micofenólico no está catalogado como micotoxina.

³Calculado a partir de la ingesta semanal tolerable provisional (0,1 µg/kg p.v.), y por lo tanto, el límite es de ingesta semanal acumulada.

Debido a su diversidad química, las micotoxinas pueden disolverse en las fases lipídicas o acuosas de los alimentos y difundir al interior de ellos (Pitt, 2000) y, en consecuencia, pueden ser encontradas en todo tipo de alimentos, entre los que destacan los productos cárnicos madurados. En este sentido, desde la década de los 70, se ha demostrado la capacidad toxigénica de hongos aislados en productos cárnicos madurados, como el jamón curado, salchichón y el salami (Bullerman y col., 1969; Ciegler y col., 1973; Incze y col., 1976; Leistner y Eckardt, 1979; Mintzlfaf y col., 1972; Strzelecki y Badura, 1972; Strzelec y col., 1969; Sutic y col., 1972; Wu y col., 1974), revisados posteriormente por Leistner y Eckardt (1981) y Leistner (1984). Del mismo modo, Frisvad y col. (2004) concluyeron que la producción de

micotoxinas en productos cárnicos es específica de determinadas especies, especialmente pertenecientes al género *Penicillium*. También se ha demostrado la capacidad de producir micotoxinas por diversas especies del género *Aspergillus*, siendo sin embargo la toxicidad de *Eurotium* spp. más incierta (Frisvad y Thrane, 2002; Slack y col., 2009). En este sentido, la detección de micotoxinas en productos cárnicos tras la inoculación de hongos toxigénicos ha confirmado que el desarrollo de éstos en dichos productos puede ser un riesgo potencial para la salud del consumidor (Leistner y Eckardt, 1981) (Tabla 6). Así, varias investigaciones han detectado la presencia de micotoxinas, principalmente ocratoxina A y ácido ciclopiazónico, en productos cárnicos durante su comercialización (Tabla 7).

Tabla 6. Micotoxinas detectadas en productos cárnicos tras la inoculación de hongos toxigénicos.

Micotoxina	Especies	Producto	Referencias
Ácido ciclopiazónico	<i>P. viridicatum</i>	Jamón curado	Bailly y col., 2005
Aflatoxinas ¹	<i>A. parasiticus</i>	Salchichas fermentadas	Kivanc y col., 1992
	<i>A. parasiticus</i>	Jamón curado	Rojas y col., 1991
	<i>A. flavus</i>	Salchichas fermentadas	Kivanc y col., 1992
Citrinina	<i>P. viridicatum</i>	Jamón curado	Wu y col., 1974
	<i>P. citrinum</i>	Jamón curado	Bailly y col., 2005
Ocratoxina A	<i>P. verrucosum</i>	Salchichas fermentadas	Spotti y col., 1999 y 2001b
	<i>A. ochraceus</i>	Jamón curado	Escher y col., 1973
Patulina	<i>P. expansum</i>	Salchichas fermentadas	Alperden y col., 1973
Esterigmatocistina	<i>A. versicolor</i>	Jamón curado	Halls y Ayres, 1973

¹Suma de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

Tabla 7. Micotoxinas detectadas en productos cárnicos durante su comercialización.

Micotoxina	Producto	Incidencia (%)	Niveles	Referencias
Ácido ciclopiazónico	Salami	25	< 0,5 µg/kg	Ostrý y Polster, 1989
	Jamón curado		50 µg/kg	Bailly y col., 2005
Ocratoxina A	Salchichas fermentadas	16	40 µg/kg	Skrinjar y col., 1989
	Salchichas fermentadas	50	0,01-0,27 µg/kg	Gareis y Scheuer, 2000
	Salchichas fermentadas	47	0,006-0,4 µg/kg	Monaci y col., 2005
	Tripa ¹	45	3-18 µg/kg	Iacumin y col., 2009
	Jamón curado	53	0,2-2 µg/kg	Spotti y col., 2001b
	Jamón curado	83	0,2-2,3 µg/kg	Chiavaro y col., 2002
	Jamón curado	50	0,1-7,3 µg/kg	Toscani y col., 2007
	Jamón curado	50	2-29,2 µg/kg	Rodríguez y col., 2012
Paté	8	0,84-1,77 µg/kg	Jiménez y col., 2001	

¹Tripa de salchichas fermentadas, el interior del producto no contenía niveles detectables de OTA (límite de detección=0,1 µg/kg).

1.2.2.1. OCRATOXINA A

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por algunas especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que crecen de manera natural en un gran número de productos alimenticios. La estructura química de la OTA consiste en una dihidroisocumarina unida por el grupo carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 2). Tiene efectos nefrotóxicos, teratogénicos, inmunodepresores y carcinogénicos (Creppy, 1999; Kuiper–Goodman y Scott, 1989; O’Brien y Dietrich, 2005; Petzinger y Ziegler, 2000; Pfohl-Leszkowicz y col., 2002). De todos ellos destacan los daños nefrotóxicos, ampliamente demostrados en aves y mamíferos, siendo esta micotoxina la principal responsable de la nefropatía porcina (Krogh, 1987; Pfohl-Leszkowicz y col., 2002). Asimismo, la OTA podría ser responsable de la enfermedad conocida como nefropatía endémica de los balcanes (BEN, del inglés Balcanic Endemic Nefropaty) (Mally y col., 2007; Pfohl-Leszkowicz y col., 2002). Sin embargo, esto no está suficientemente demostrado y también se han citado otros posibles agentes etiológicos como son la contaminación con metales como el cadmio y el plomo (Wedeen, 1991), la deficiencia de selenio (Maksimovic, 1991) y la infección por

bacterias o virus (Apostolov y Spasic, 1975). En relación con los posibles efectos carcinogénicos, en animales de experimentación se ha asociado la OTA con la aparición de tumores en el tracto urinario (Pfohl-Leszkowicz y col., 2002) y se ha hipotetizado sobre su papel en el cáncer testicular (Schwartz, 2002). En humanos no se ha demostrado ningún efecto carcinogénico pero, atendiendo a los datos anteriores, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la OTA como carcinógeno del grupo 2B, donde se encuentran las sustancias carcinógenas potenciales.

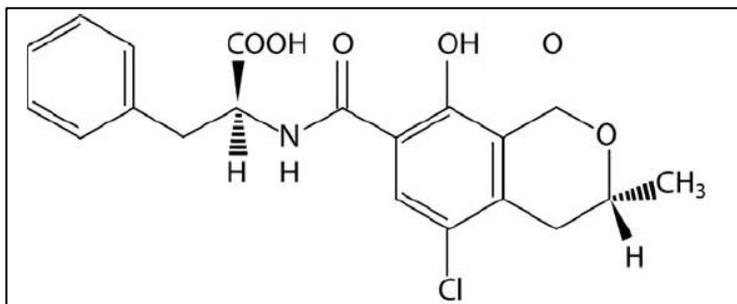


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A.

Fuente: www.food-info.net

La presencia de OTA se ha descrito en múltiples sustratos entre los que destacan los productos derivados de cerdo y aves. Así se ha detectado OTA en cereales (Pittet, 1998), leguminosas (Domijan y col., 2005), uva y derivados (Battilani y Pietri, 2002; Cabañes y col., 2002), café (Taniwaki y col., 2003), cacao y derivados (Mounjouenpou y col., 2008), leche de vaca (Skaug, 1999) y productos cárnicos de cerdo y aves (Canela y col., 1994; Curtui y col., 2001; Gareis y Scheuer, 2000; Gareis y Wolff, 2000; Jiménez y col., 2001; Leistner y Eckardt, 1979; Lusky y col., 1994; Scott y col., 1991; Slayne, 2001; Van Egmond y Speijers, 1994). Asimismo, también se ha detectado la presencia de OTA en productos cárnicos madurados (Tabla 7).

Las especies de hongos productores de OTA pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Dentro del género *Aspergillus*, *A. ochraceus* es la especie en la que se describió por primera vez la producción de OTA en 1965, por lo que es la más conocida como productora. Crece en un rango de temperaturas alto (12-37°C) y se asocia con climas cálidos y tropicales. Sin embargo, existen otras especies productoras como *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. petrakii* y *A. esclerotiorum* (en el grupo de *A. ochraceus*); *A. alliaceus* y *A. albertensis* (en la sección *Flavi*) y las especies de la sección *Nigri*.

En el género *Penicillium*, *Penicillium viridicatum* fue la primera especie ocratoxigénica descrita (Van Walbeek y col., 1969). Sin embargo, aunque durante los últimos años diversos autores han continuado citando a *P. viridicatum* como la principal especie ocratoxigénica (Aziz y col., 1998; Czerwiecki y col., 2002; Höhler, 1998; Mantle y McHugh, 1993) en la actualidad destaca principalmente *Penicillium verrucosum* (Castella y col., 2002; Cairns-Fuller y col., 2005; Larsen y col., 2001; Lund y Frisvad., 2003). En este sentido, Spotti y col. (1999 y 2001a) evaluaron la capacidad ocratoxigénica de *P. verrucosum* en salchichas fermentadas bajo condiciones similares a las del proceso de elaboración del producto, detectando la OTA en la tripa y periferia del producto. Actualmente se considera la posible división de *P. verrucosum* en dos especies ocratoxigénicas, *P. verrucosum* y *Penicillium nordicum*, ambas pertenecientes serie *Verrucosa* de la sección *Viridicata*. En menor grado, otras especies de *Penicillium* se han descrito como productoras de OTA (Tabla 8).

Tabla 8. Especies de *Penicillium* productoras de OTA (diferentes de *P. verrucosum* y *P. viridicatum*)

Subgénero	Especie	Referencias bibliográficas
<i>Aspergilloides</i>	<i>P. glabrum</i>	Vazquez-Belda, 1995
	<i>P. frequentans</i>	Giridhar y Reddy, 1998 y 1997
	<i>P. purpurescens</i>	El-Banna y col., 1987; Krivobok y col., 1987; Leistner y Pitt, 1977; Lillehoj y Goransson, 1980
	<i>P. sclerotiorum</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. implicatum</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. montanense</i>	Ueno y col., 1991
<i>Biverticillium</i>	<i>P. rugulosum</i>	Giridhar y Reddy, 1997
	<i>P. funiculosum</i>	Giridhar y Reddy, 1997
	<i>P. variabile</i>	Aziz y col., 1998; Frisvad, 1985; Giridhar y Reddy, 1997; Jiménez y col., 1986; Leistner y Pitt, 1977; Sanchis y col., 1982
	<i>P. pinophilum</i>	Battilani y Pietri, 2002
	<i>P. purpurogenum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 2001; Ueno y col., 1991
	<i>P. verruculosum</i>	Lillehoj y Goransson, 1980; Ueno y col., 1991
<i>Furcatum</i>	<i>P. oxalicum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 2001
	<i>P. citrinum</i>	Giridhar y Reddy, 1997 y 1998
	<i>P. canescens</i>	Giridhar y Reddy, 1997; Ueno y col., 1991
	<i>P. janczewskii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. melinii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. raistrickii</i>	Ueno y col., 1991
	<i>P. miczynskii</i>	Ueno y col., 1991
<i>Penicillium</i>	<i>P. atramentosum</i>	Bridge y col., 1989
	<i>P. aurantiogriseum</i>	Krivobok y col., 1995; Mills y col., 1989; Skrinjar y col., 1995
	<i>P. brevicompactum</i>	Kozakiewicz y col., 1993
	<i>P. chrysogenum</i>	Czerwiecki y col., 2002; Krivobok y col., 1987; Leistner y Pitt, 1977; Mills y Abramson, 1982; Mills y col., 1989; Skrinjar y col., 1992; Vazquez-Belda y col., 1995
	<i>P. commune</i>	Creppy y col., 1995; Skrinjar y col., 1992
	<i>P. cyclopium</i>	Czerwiecki y col., 2002; Leistner y Pitt, 1977; Mills y Abramson, 1982; Northolt y col., 1979; Vazquez-Belda y col., 1995
	<i>P. expansum</i>	Bridge y col., 1989; Kozakiewicz y col., 1993; Krivobok y col., 1987; Mills y col., 1989
	<i>P. glandicola</i>	Abramson y col., 1992
	<i>P. griseofulvum</i>	Giridhar y Reddy, 1997; Mantle y McHugh, 1993
	<i>P. nordicum</i>	Land y Hult, 1987; Larsen y col., 2001
	<i>P. palitans</i>	Sanchis y col., 1982; Scott y col., 1972
	<i>P. solitum</i>	Bridge y col., 1989; Mantle y McHugh, 1993
	<i>P. verrucosum</i> var. <i>Cyclopium</i>	Skrinjar y col., 1992
	<i>P. verrucosum</i>	Larsen y col., 2001
	<i>P. viridicatum</i>	Frisvad, 1981; Frisvad y Filtenborg, 1983 y 1989; Pitt, 1987

Entre las especies fúngicas productoras de OTA que más interés tienen en la contaminación de jamones y carnes curadas se encuentran *P. verrucosum*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium nalgiovense* y *Aspergillus ochraceus*, las cuales han sido aisladas a partir de estos productos y han mostrado su potencial toxigénico en numerosos trabajos. Así, en el estudio realizado por Martin y col. (2004b), en el que se testaron 20 cepas fúngicas aisladas habitualmente en productos cárnicos curados, se mostró que el 50% de dichas cepas era

potencialmente productor de micotoxinas. Del mismo modo, Iacumin y col. (2012) identificaron cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA. Otros investigadores habían demostrado con anterioridad la producción de ocratoxinas A y B por *A. ochraceus* (Escher y col., 1973), todos ellos aislados de jamón curado. En jamón ibérico, Núñez y col. (1996) pusieron de manifiesto una elevada incidencia de cepas toxigénicas; del total de cepas aisladas seleccionaron 59 para investigar su posible potencial toxigénico, de las cuales el 54% mostró toxicidad pasadas 24 horas de incubación y el 76% pasadas 48 horas. Estas cepas pertenecían fundamentalmente a los géneros *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp. y *Penicillium* spp. aislados sobre todo al final del proceso de curado. En Italia, Battilani y col. (2007) identificaron la población fúngica de varias plantas de producción de jamón italiano, tanto en el ambiente de las cámaras de maduración y envejecimiento como en las piezas existentes en las mismas. El género mayoritario fue *Penicillium* dentro del cual dominaron las especies *P. nalgiovense* y *P. nordicum*. Tras estudiar la capacidad de producir OTA por *P. nordicum* se concluyó que el 50% de los aislados tenían dicha capacidad. Este descubrimiento podría justificar el hallazgo encontrado en otros estudios en los que se detectó OTA en jamón (Escher y col., 1973; Pietri y col., 2006; Spotti y col., 2001a), algunos de ellos superando los límites máximos que estaban regulados por la legislación italiana (1µg/kg). Tras el estudio de otros productos cárnicos curados Bogs y col. (2006) pusieron de manifiesto la presencia de hongos productores de OTA al detectar un 11% de cepas productoras de *P. nordicum* en la superficie de estas carnes. En cambio, la investigación llevada a cabo por Iacumin y col. (2009), centrada en salchichas secas producidas industrialmente, obtuvo unos resultados sorprendentes, al detectar la presencia de OTA en un 45 %, con concentraciones de 3 a 18 µg/Kg.

I.2.2.2. ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

El ácido ciclopiazónico (CPA), químicamente clasificado como un indol del ácido tetrámico ($C_{20}H_{20}N_2O_3$) (Figura 3), es una micotoxina cuyo nombre proviene de la primera especie donde se aisló *Penicillium cyclopium* Westing. El CPA es un inhibidor específico del enzima ATP-asa calcio-dependiente, el cual es tóxico para hombre y animales (Riley y Coeger, 1992). Ha estado implicado en dos micotoxicosis agudas en humanos: “koudua poisoning” (Rao y Husain, 1985), en la que se producen náuseas y mareos y “Turkey disease X”, en la cual el CPA causa neurotoxicidad caracterizada por opistótonos, catalepsia, hipotermia y sedación (Blount, 1961).

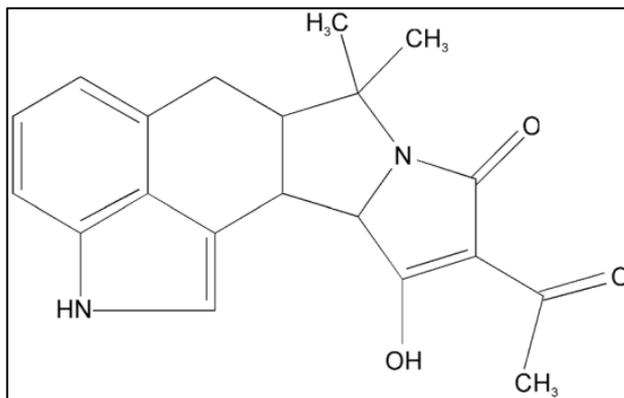


Figura 3. Estructura química del ácido cliclopiazónico

Fuente: www.food-info.net

Numerosas especies de *Penicillium* y *Aspegillus* han presentado capacidad para biosintetizar CPA (Cole, 1984; Dorner y col., 1984; Frisvad, 1989; Trucksess y col., 1987). Dentro del género *Penicillium*, el principal productor de esta micotoxina es *Penicillium commune*, el cual ha sido aislado de jamón curado y otros productos cárnicos (Baily y col., 2005; López-Díaz y col., 2001; Moldes-Anaya y col., 2009; Núñez y col., 2007; Soriano del Castillo, 2007). Del mismo modo, se han aislado cepas de *P. commune* productoras de CPA en el ambiente de cámaras de procesamiento de carnes. Algunas de estas cepas producían la

micotoxina en concentraciones de 188 ppm (Kozlovsky y col., 2014). Diversos trabajos han estudiado las condiciones requeridas para la producción de CPA por *P. commune*. Así, Gqaleni y col. (1996) reportaron que la relación óptima de a_w y temperatura era de 0,98 $a_w/20^\circ\text{C}$, llegando a detectar esta toxina en concentraciones de hasta 7678,0 ng/ g. Del mismo modo, Sosa y col. (2002) demostraron que las condiciones óptimas para producir CPA por cepas de *P. commune* aisladas de jamón curado eran de 30°C y a_w de 0,96, condiciones que se reproducen durante la etapa de estufaje, mientras que su producción disminuía con valores de a_w inferiores a 0,90. Además de *P. commune* y *P. cyclopium*, otras especies son productoras de CPA como *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium dipodomyicola*, *Penicillium griseofulvum* y *Penicillium palitans* (Tabla 9).

Tabla 9. Especies de *Penicillium* productoras de CPA

Subgénero	Especie	Referencias bibliográficas
Furcatum	<i>P. miczynskii</i>	Houbraken y col., 2011
	<i>P. aurantiogriseum</i>	Finoli y col., 1999; Ostrý y Polster, 1989
	<i>P. brevicompactum</i>	Frisvad y col., 2000; Sørensen y col., 2008
	<i>P. camemberti</i>	Bockelmann y col., 1999; Bullerman, 1997; Frisvad, 1986; Frisvad y col., 2000; Frisvad y Thrane, 1996; Geisen y col., 1990; Hill y col., 1986; Holzapfel, 1968; Le Bars, 1979; Lund, 1995; Mantle, 1991; Moss, 1991; Nishi y col., 1985; Pitt, 1997; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Taniwaki y col., 2001
	<i>P. chrysogenum</i>	Bullerman 1997; Mantle, 1991; Moss, 1991
	<i>P. commune</i>	Bullerman 1997; Finoli y col., 1999; Frisvad, 1986; Frisvad y Thrane, 1996; Gqaleni y col., 1996; López-Díaz y col., 2001; Lund, 1995; Mantle, 1991; Moldes-Anaya y col., 2009; Moss, 1991; Núñez y col., 2007; Ostrý y Polster, 1989; Pitt, 1997; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Soriano del Castillo, 2007; Sosa y col., 2002
	<i>P. crustosum</i>	Frisvad y Filtenborg, 1989
	<i>P. cyclopium</i>	Holzapfel, 1968; Neethling y McGrath, 1977
	<i>P. dipodomyicola</i>	Frisvad y col., 2000; Frisvad y , 2004
	<i>P. expansum</i>	Finoli y col., 1999;
	<i>P. griseofulvum</i>	Bullerman 1997; Frisvad y Filtenborg, 1983; Frisvad y col., 2000; Frisvad y Samson, 2004; Frisvad y Thrane, 1996; Galvalisi y col., 2012; Mantle, 1991; Moss, 1991; Pitt, 1997; Sánchez y col., 2008
	<i>P. palitans</i>	Frisvad, 1986; Frisvad y col., 2000; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Sørensen y col., 2008
	<i>P. solitum</i>	Frisvad, 1986; Polonelli y col., 1987
	<i>P. viridicatum</i>	Bullerman 1997; Leistner y Pitt, 1977; Mantle, 1991; Moss, 1991; Pitt, 1997; Tabuc y col., 2004

La presencia de CPA se ha descrito en múltiples sustratos: queso (Finoli y col., 1999; Pitt y col., 1986), cacahuete (Horn y Dorner, 1999), maíz (Mansfield y col., 2007; Resnik y col.,

1996), leche de vaca (Dorner y col., 1994; Oliveira y col., 2006; Prasongsidh, 1998), huevos (Dorner y col., 1994), carne (Ostrý y Polster, 1989), salami (Ostrý y Polster, 1989) y productos cárnicos curados (Leistner, 1984; Leistner y Eckardt, 1981). Asimismo, la Tabla 7 muestra los estudios que han detectado la presencia de CPA en productos cárnicos madurados.

I.3. DETECCIÓN Y CONTROL DE OTA Y CPA EN JAMÓN CURADO

Uno de los aspectos fundamentales para llevar a cabo el control de micotoxinas en el jamón curado es la capacidad de detección analítica del compuesto. De forma general, las micotoxinas presentan una distribución poco uniforme en los alimentos y, dado su bajo peso molecular, pueden difundir hacia el interior de los mismos (Pitt, 2000). La capacidad de difundir en los productos cárnicos depende de las propiedades químicas de la toxina, como la polaridad y la carga, así como de las propiedades químicas y físicas del producto cárnico, como el pH, la actividad de agua y la distribución de grasa (Leistner y Eckardt, 1981). En este sentido, diversos trabajos han demostrado la capacidad de la OTA para difundir hacia el interior del jamón curado y otros productos cárnicos (Escher y col., 1973; Incze y col., 1976; Spotti y col., 1999 y 2001a). Por ello, para investigar la presencia de micotoxinas el método de muestreo debe ser representativo y, previo a la extracción de la toxina fúngica con disolventes orgánicos, es necesario homogeneizar cuidadosamente la muestra. Por otra parte, la alta complejidad de los productos cárnicos, donde se encuentran presentes cantidades importantes de proteínas, lípidos, agua, hidratos de carbono y otros componentes minoritarios, requiere una purificación para eliminar las sustancias interferentes y aumentar la concentración de la micotoxina en el extracto obtenido. Así, después de la extracción con disolventes es importante llevar a cabo una etapa de purificación que permita obtener cromatogramas más limpios. En algunos métodos el extracto obtenido se lava una o más veces con isooctano para eliminar los lípidos presentes en la muestra (Gimeno y Martins, 1982).

Los métodos analíticos para determinar micotoxinas en alimentos han sido actualizados recientemente en diversos trabajos (Andrade y col., 2014; Cigic y Prosen, 2009; Krska y col., 2008; Pleadin y col., 2013; Turner y col., 2009; Zöllner y Mayer-Helm, 2006). Inicialmente, los métodos utilizados en la detección de micotoxinas en productos cárnicos se basaban en la extracción con solventes orgánicos y cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) mediante placas de gel de sílice con indicador de fluorescencia o ultravioleta, según la micotoxina a determinar (Alperden y col., 1973; Escher y col., 1973; Wu y col., 1974). Sin embargo, aunque la TLC es una técnica que continúa siendo adecuada para realizar analíticas rutinarias de bajo coste, debido a que no precisa de un equipamiento excesivamente caro, su límite de detección es demasiado elevado para la detección trazas, por lo que esta técnica se utiliza principalmente como método de cribado o *screening* en un número limitado de muestras (Bailey y col., 2005). En la actualidad, los métodos para determinar micotoxinas están basados principalmente en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), debido principalmente a su alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y a que puede ser fácilmente automatizado. Del mismo modo, el HPLC tiene unas recuperaciones superiores al 90%. Por ello, este método analítico ha sido aceptado como método oficial por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Association of Official Analytical Chemists, AOAC International) para la determinación de micotoxinas en alimentos. El límite de detección de esta técnica es de 0,14 ng/g para la OTA y 0,01 µg/g para el CPA (Finoli y col., 1999; Matrella y col., 2006).

Para la detección y cuantificación de OTA y CPA mediante HPLC generalmente se usan columnas de fase reversa. Debido a las características ligeramente ácidas de estas micotoxinas, la fase móvil empleada en el HPLC de fase reversa debe ser ácida para evitar una adsorción inespecífica a la columna. En la mayoría de los casos se usan mezclas de acetonitrilo o metanol con ácido acético diluido o ácido fosfórico, generalmente en una elución isocrática. La utilización de acetonitrilo es más frecuente debido a que las mezclas de éste con agua tienen

una menor viscosidad y mejor eficacia en la separación que las mezclas de metanol con agua. Para la detección de OTA se utiliza un detector de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 330 nm y 460 nm, respectivamente, siendo éste el método más utilizado en estudios realizados para determinar OTA en carne (Chiavaro y col., 2002; Gareis y Scheuer, 2000; Monaci y col., 2005; Toscani y col., 2007). Para la detección de CPA se mide el espectro de ultravioleta visible desde 200 a 400 nm (Hayashi y Yoshizawa 2005; Urano y col., 1992).

Por otro lado, los métodos inmunohistoquímicos para la detección de OTA han recibido una gran aceptación debido a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de analizar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. Desde la descripción del primer ELISA para la detección de OTA en 1981 (Kuiper-Goodman y Scott, 1989), se han puesto a punto diversos métodos ELISA y RIA para la detección de OTA en cereales (Abouzied y col., 2002; Barna-Vetró y col., 1996), sangre (Solti y col., 1999; Ueno y col., 1998), productos cárnicos (Wilson y col., 1998) y riñón (Clarke y col., 1994; Frohlich y col., 1997) y suero porcinos (Ueno y col., 1991). Sin embargo, en la actualidad no existen kits inmunohistoquímicos para la determinación de CPA en alimentos.

La incidencia de micotoxinas en productos alimenticios ha permanecido estable durante los últimos años. En los informes anuales que elabora el RASFF (RASFF: "*Rapid Alert System for Food and Feed*") desde 2002, este peligro siempre supone una de las categorías de riesgo con mayor número de notificaciones, en torno a un 20% del total. Así, durante el año 2012 se produjeron un total de 2604 notificaciones, 405 de las cuales estaban relacionadas con micotoxinas (RASFF, 2013). No obstante, a pesar de que estos datos suponen un elevado porcentaje, ninguna de estas notificaciones estaba relacionada con carnes o productos cárnicos (Figura 4). Este hecho resulta sin embargo previsible, ya que el plan de vigilancia de micotoxinas en alimentos realizada por las Autoridades Sanitarias no incluye el muestreo de

carnes y productos cárnicos, debido a que la presencia de micotoxinas en estos productos se atribuye a la alimentación de los animales con piensos contaminados, lo que conlleva a la acumulación de la toxina en músculo, sangre, grasa y diferentes órganos (Gareis y Wolff, 2000; Petzinger y Weidenbach, 2002). Así, en la actualidad el control de las micotoxicosis por ingestión de productos cárnicos se basa principalmente en la vigilancia sanitaria en la etapa de producción primaria, investigando la presencia de micotoxinas en piensos. En este sentido, a pesar de que existen múltiples investigaciones que han puesto de manifiesto tanto la presencia de hongos toxigénicos como de toxinas fúngicas en productos cárnicos, no existe legislación europea a día de hoy que regule los contenidos máximos permisibles de micotoxinas en estos productos. Sin embargo, aunque en la actualidad está derogada (Ley Ómnibus 25/2009), Italia contaba ya desde el año 1999 con una legislación específica que regula la presencia de OTA en productos cárnicos, estableciendo como límite máximo $1\mu\text{g}/\text{Kg}$.

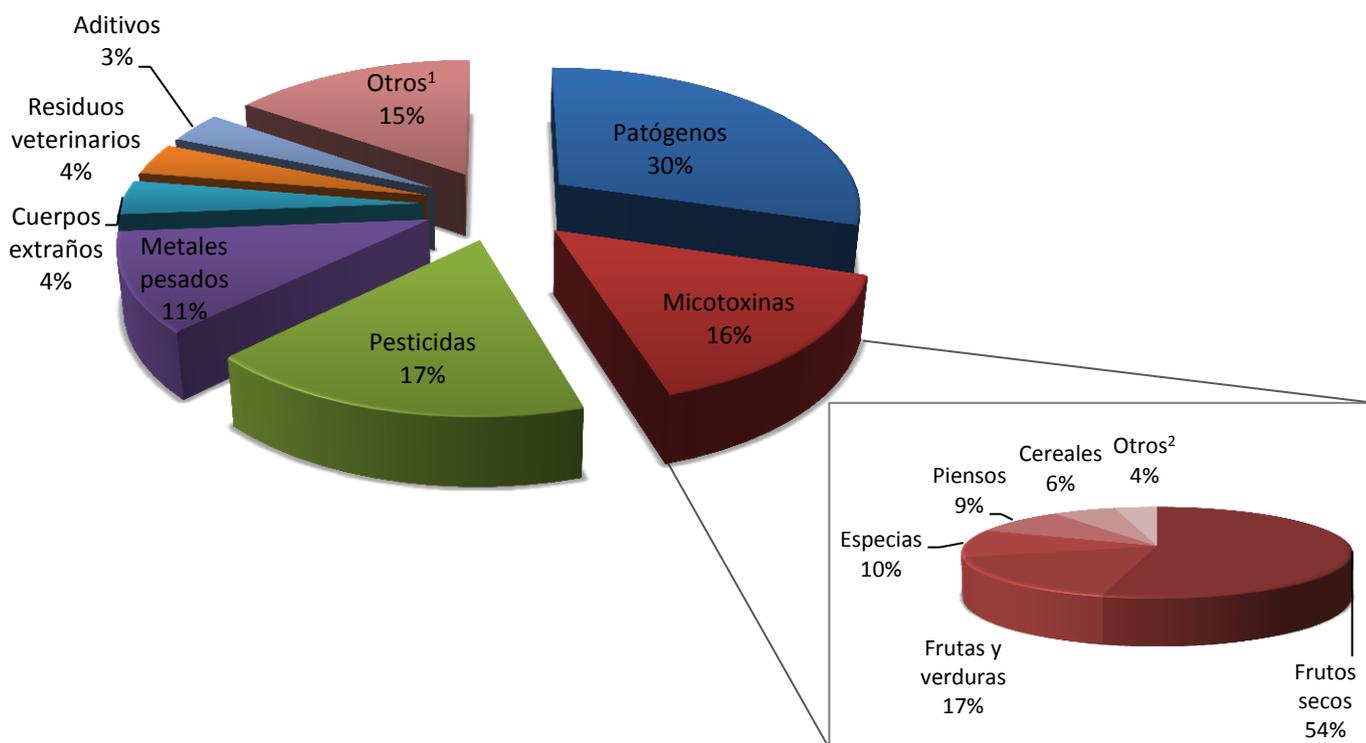


Figura 4. Notificaciones de alertas alimentarias de miembros del RASFF en 2013 (RASFF, 2013).

¹Otros peligros notificados: OMG (Organismos Modificados Genéticamente), alérgenos, biocontaminantes, biotoxinas, contaminantes químicos, migraciones y parásitos.

²Otros alimentos: Leche y productos lácteos, bebidas no alcohólicas y snacks.

Aunque apenas se dispone de información sobre la importancia de la ingesta de OTA, CPA y otras micotoxinas a partir de carnes curadas, dada la gran cantidad de hongos productores que se han aislado en jamones y otros productos curados se estima que ésta pueda ser importante (Battilani y col., 2007). Por ello, en futuras revisiones del Reglamento (CE) Nº 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, está previsto el establecimiento de un contenido máximo para la OTA en productos cárnicos. Sin embargo, en dicho reglamento no se contempla el CPA.

Por todo ello es necesario destacar que el control de micotoxinas en productos cárnicos curados no debe realizarse sólo a nivel de producción primaria, ya que durante la etapa de maduración del producto interviene una abundante micoflora, perteneciente fundamentalmente a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium*, que incluyen múltiples especies toxigénicas (Battilani y col., 2007). Así, aunque estos hongos contribuyen a la maduración de los productos curados, si se trata de cepas micotoxigénicas podrían contaminar estos alimentos.

En este sentido, para alcanzar los requerimientos de calidad y seguridad en algunos productos cárnicos, como los embutidos crudo-curados, se suelen inocular cultivos iniciadores o “starters” que, por su velocidad de crecimiento, la utilización de nutrientes o la liberación de sustancias inhibidoras, compiten con otros microorganismos alterantes o que pueden afectar a la salubridad del producto. Sin embargo, en la actualidad la elaboración del jamón curado es todavía un proceso lento y artesanal en el que no se emplean este tipo de cultivos, siendo los hongos presentes en las cámaras de secado los que colonizan el producto durante su maduración (Battilani y col., 2007; Sørensen y col., 2008). Así, la biota fúngica presente en el jamón está compuesta por hongos heterogéneos, entre los que pueden encontrarse microorganismos indeseables que pueden conducir a serios problemas para el productor y/o el consumidor.

Por otro lado, no existen métodos de descontaminación eficaces, por lo que una vez producida la micotoxina ésta permanece en el producto aunque se elimine el micelio fúngico. Asimismo, los procedimientos de limpieza y desinfección de los secaderos no contemplan la descontaminación del ambiente de las cámaras mediante productos fungicidas debido a su poca efectividad real por la elevada cantidad de esporas que producen los hongos y a su inespecificidad, que evitaría la contribución beneficiosa que algunas de estas especies ejercen en las propiedades sensoriales del jamón curado.

Por todo ello, para minimizar los riesgos derivados del desarrollo fúngico sobre la superficie de los productos cárnicos y controlar la formación de micotoxinas, además del control de piensos, es necesario controlar la biota fúngica presente durante el proceso de maduración, prestando especial atención a su capacidad toxigénica (Núñez y col., 1996). Para llevar a cabo dicho control es de vital importancia caracterizar los hongos presentes en el producto, es decir, identificarlos y evaluar los posibles efectos adversos o beneficiosos que éstos pueden producir en el jamón curado.

I.4. TAXONOMÍA E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DEL GÉNERO *PENICILLIUM*

Las especies de *Penicillium* son consideradas como contaminantes habituales de diferentes sustratos y pueden presentar capacidad para producir diferentes micotoxinas, entre las que se encuentra la OTA y el CPA. Estos hongos filamentosos forman colonias que crecen generalmente de manera rápida, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presentan coloraciones verdosas (Figura 5A). La textura de las colonias es un aspecto a tener en cuenta en su identificación. Ésta puede ser aterciopelada, lanosa, funicolosa o fasciculada, y depende de la disposición de los conidióforos. La estructura de reproducción asexual característica de *Penicillium* es un conidióforo en una estructura ramificada semejante a un pincel o penicilio. Este pincel puede estar formado por diversas

estructuras que reciben nombres distintos según su localización y complejidad (métulas, ramas, etc.) y que sustentan en la parte más apical un conjunto de fiálides. Las fiálides o células conidiógenas poseen forma de botella (7-12 μ m) y dan lugar a las esporas o conidios (2,5-4 μ m). Éstas son lisas, elipsoidales, generalmente de color verde y aparecen formando cadenas, no ramificadas, donde la espora más joven se sitúa en la base de la cadena y la más madura en su extremo (Figura 5B). La morfología de los conidióforos determina la primera división taxonómica del género en 4 subgéneros diferentes: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Penicillium* y *Furcatum*. Para determinar a qué subgénero pertenece un aislamiento se debe contar el número de puntos de ramificación entre la fiálide (o cadena de conidios) y la estipe. Las diferentes morfologías que pueden presentar los conidióforos son: monoverticilados (un único verticilio de fiálides, característico del subgénero *Aspergilloides*), biverticilado (morfología propia del subgénero *Biverticillium*, presentan fiálides y métulas), teverticilados (poseen fiálides, métulas y ramas, característico del subgénero *Penicillium*) y cuaverticilados (3 o más puntos de ramificación, propio del subgénero *Furcatum*).

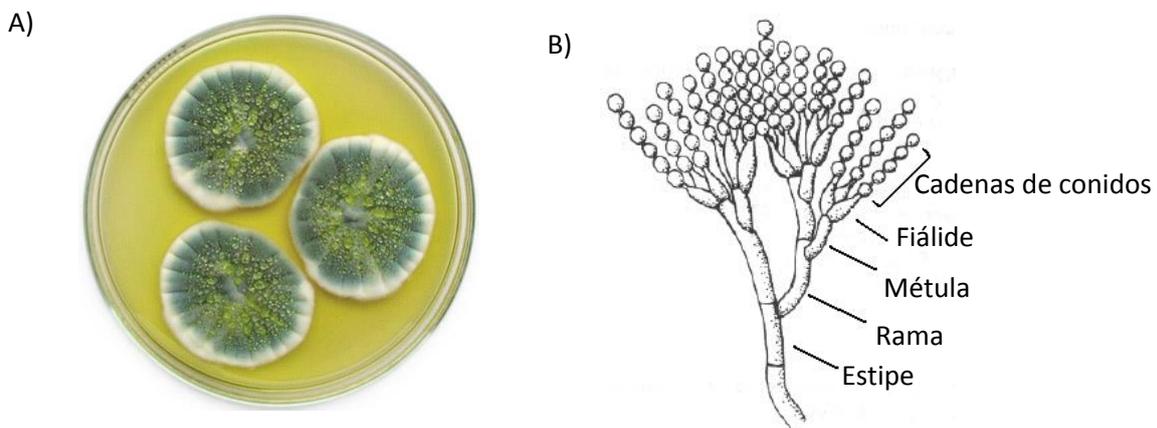


Figura 5. A) Cultivo de *Penicillium* B) Representación de las partes del conidióforo del género *Penicillium*.

Para identificar las especies del género *Penicillium* se suelen utilizar las características morfológicas de las colonias crecidas en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, así como sus características microscópicas. Los medios de cultivo y temperaturas

de incubación que se utilizan son el Agar Czapek (*Czapek-Dox extract Agar, Cz*) a 5, 25 y 37°C, el agar Extracto de Malta (*Malt Extract Agar, MEA*) a 25°C y el agar Extracto de Malta al 2% (*Malt Extract Agar 2%, ME2*) a 25°C (Pitt, 1973; Pitt, 1993; Pitt y Hocking, 1997; Samson y Pitt, 2000; Samson y Frisvad, 2004). Otras pruebas fisiológicas y de cultivo utilizadas para facilitar la identificación de las cepas de este género, y fundamentalmente las pertenecientes al subgénero *Penicillium*, incluyen la utilización de medios con creatina como fuente de nitrógeno, como lo son el medio agar creatina (*Creatine Agar, CREA*) o el medio neutro creatina sacarosa (*Neutral Creatine Sucrose Agar, CSN*) (Frisvad 1981, 1985 y 1993). En dichos medios de cultivo se evalúa la variabilidad existente entre las diferentes especies en cuanto a la capacidad de crecimiento y producción de diferente coloración del medio, según la formación de ácido o álcali a partir de la sacarosa y la creatina, respectivamente. También se puede utilizar el reactivo de Ehrlich que permite detectar sobre una porción del cultivo la formación de indol o sus metabolitos como el ácido ciclopiazónico, quetoglobosina C, etc. (Lund, 1995). Asimismo, la utilización de otros criterios basados en quimiotaxonomía permiten detectar el perfil de metabolitos secundarios producidos por las cepas para facilitar su identificación (Samson y Frisvad, 2004; Soriano del Castillo, 2007). Así, Ciegler y col. (1973 y 1981) estudiaron la producción de micotoxinas como valor taxonómico para la clasificación de cepas de *P. viridicatum* en diferentes subgrupos. Finalmente, otra de las características fisiológicas a las que se le ha propuesto su utilización con fin taxonómico es la producción de enzimas por las diferentes especies del género. En este sentido, diversos estudios obtuvieron resultados prometedores, al seguir patrones similares al de las especies descritas por Pitt en 1979 (Bridge y Hawksworth, 1984; Cruickshank y Pitt, 1987; Paterson y col., 1989).

Las especies de *Penicillium* productoras de OTA y CPA pertenecen principalmente al subgénero *Penicillium* al presentar conidióforos teverticilados (Figura 6). Todos ellos producen una gran cantidad de esporas, a partir del 5-7º día de crecimiento, y a menudo sus conidióforos aparecen agrupados formando fascículos. Sin embargo a este subgénero

pertenecen especies muy diversas, filogenética y ecológicamente distintas, que han sido aisladas a partir de numerosos estratos como plantas, algas, animales, materiales procesados, viviendas de hombres y animales, etc.

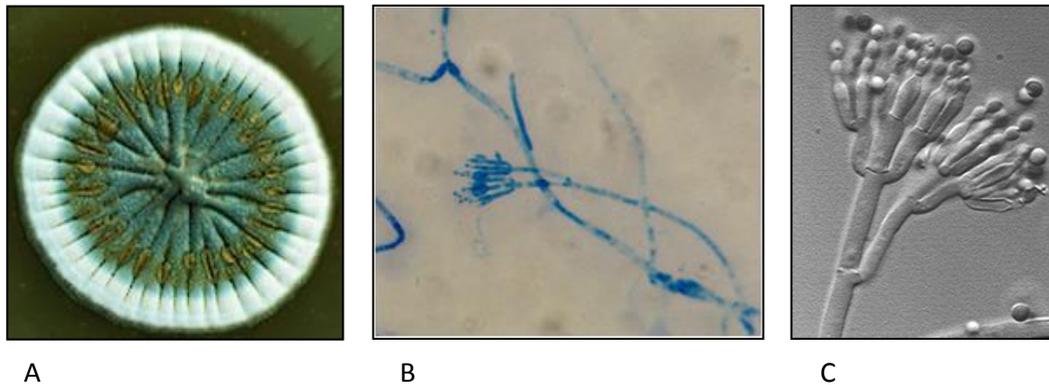


Figura 6. Colonia (A) y conidióforo (B y C) de *Penicillium* subgénero *Penicillium*.

El subgénero *Penicillium* está formado por 6 secciones: *Coronata*, *Roqueforti*, *Chrysogena*, *Penicillium*, *Digitata* y *Viridicata* que a su vez están divididas en diferentes series. Así, la sección *Coronata* está formada por la serie *Olsonii* cuya característica principal es la formación de colonias de aspecto compacto con largos conidióforos. La sección *Roqueforti*, formada por la serie *Roqueforti*, se caracteriza por presentar una elevada resistencia al ácido propiónico, ácido láctico y otros ácidos, lo que convierte a los hongos pertenecientes a esta sección en especies capaces de competir en su crecimiento con las bacterias ácido lácticas. Por otro lado, la sección *Chrysogena* se caracteriza por presentar conidióforos cortos y amplios y una rápida velocidad de crecimiento, más acusado a temperaturas de 30°C, y está compuesta por las series *Chrysogena*, *Mononematosa*, *Aethiopica* y *Persicina*. Sin embargo, la sección *Penicillium*, formada por las series *Expansa*, *Urticolae*, *Claviformia*, *Italica* y *Gladioli*, engloba diferentes morfologías de conidios al ser éstos lisos, amurallados y elipsoidales en la mayoría de sus especies, excepto en *P. marinum* y *P. gladioli*, los cuales presentan conidios con forma globosa o subglobosa. Por el contrario la sección *Digitata*, cuyo único representante es *P.*

digitatum de la serie *Digitata*, presenta morfologías conidiales y conidióforos irregulares y excepcionalmente largos en comparación con otros *Penicillium*. Finalmente, la sección *Viridicata* está formada por las series *Viridicata*, *Corymbifera*, *Verrucosa*, *Camamberti* y *Solita* (Samson y col., 2004a; Samson y Frisvad, 2004).

Cabe señalar que dentro de las series *Viridicata* y *Verrucosa* se clasifican casi la totalidad de los hongos con capacidad para producir OTA (*P. verrucosum*, *P. nordicum* y *Penicillium polonicum* entre otros) y dentro de la serie *Camemberti* casi la totalidad de hongos productores de CPA (*P. commune* y *P. camemberti*). Los hongos de la serie *Camemberti* se caracterizan por formar colonias aterciopeladas, con esporulación moderada de colores azules o verdes grisáceos y con estipes más o menos rugosos; crecen abundantemente en medios con creatina, donde dan lugar a la formación de ácido y base, y presentan la reacción positiva frente al reactivo de Ehrlich. Las series *Viridicata* y *Verrucosa* se caracterizan por presentar un crecimiento rápido, aunque éste es limitado en los de la serie *Verrucosa* al formar colonias en general por debajo de los 25 mm de diámetro, y formar colonias con textura de granular a algodonosa con coloraciones variables, desde blanco a verde muy oscuro en el anverso y colores claros, amarillo o cremoso, en el reverso. Los hongos de la serie *Verrucosa*, *P. nordicum* y *P. verrucosum* pueden crecer en medios ricos en nitratos (aprovechándolos como única fuente de nitrógeno), pero crecen débilmente si la fuente de nitrógeno es la creatina. Inicialmente estas especies se consideraban una sola al no existir diferencias en la morfología de las colonias ni en su aspecto microscópico. Posteriormente, éstas se dividieron taxonómicamente en dos especies ocratoxigénicas al encontrar diferencias en ciertos aspectos quimiotaxonómicos y moleculares (Larsen y col., 2001). Así, *P. verrucosum* es la única especie, dentro de la serie *Verrucosa*, capaz de producir verrucina y un pigmento rojo-marrón sobre ciertos medios de cultivo, lo que le diferencia de *P. nordicum*.

No obstante, cabe destacar que se han encontrado muchas especies con capacidad de producir OTA pertenecientes también a los otros tres subgéneros de *Penicillium*. Este hecho no debe sorprender, puesto que este género fúngico presenta una verdadera complejidad taxonómica y dificultad en la identificación de sus especies (Mossel, 1983). Así pues, la gran variedad fenotípica existente da lugar a valores intermedios en los caracteres morfológicos y de cultivo, que hacen difícil su identificación. Además, la forma y tamaño de los conidios, uno de los datos morfológicos más usados por su gran utilidad en la diferenciación de algunas especies, no es determinante en muchas de ellas. Por lo tanto, las técnicas clásicas de detección de hongos, basadas en el aislamiento y posterior identificación del hongo mediante pruebas morfológicas y fisiológicas clásicas, llevan varias semanas de trabajo y, en muchas ocasiones, no ofrecen resultados concluyentes, implicando un coste importante.

En la actualidad se han incorporado nuevas técnicas que nos permiten disponer de un mayor número de caracteres, que pueden ser utilizadas en la identificación de las especies del género *Penicillium*. Los métodos moleculares basados en la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR por las siglas en inglés de “polymerase chain reaction”) constituyen una buena alternativa por su sensibilidad, rapidez y fiabilidad de resultados y son, por tanto, la metodología empleada en la actualidad en la gran mayoría de estudios. Las técnicas moleculares en general, y sobre todo las basadas en ácidos nucleicos como la PCR, han aportado nuevas herramientas para resolver los problemas de identificación de la taxonomía clásica. Aunque la obtención de grandes cantidades de determinadas secuencias de ácidos nucleicos era muy laboriosa en el pasado, hoy en día, el proceso tarda unas pocas horas gracias a los termocicladores actuales. La amplificación por PCR utiliza como reactivos básicos las 4 bases del ADN: adenina, guanina, timina y citosina (en sus formas de nucleósido trifosfato dNTPs: dATP, dGTP, dTGP y dCTP), una polimerasa que funciona a altas temperaturas (*Taq polimerasa*) y un par de oligonucleótidos, denominados *primers*, que delimitan la región a amplificar. Existen diferentes genes diana a amplificar para la identificación de los hongos. Los

genes diana de copia única (por ejemplo, genes que codifican calmodulina, actina o quitina sintasa) son altamente especie-específicos, pero pueden no llegar a ser lo suficientemente sensibles para detectar una baja concentración del hongo. Por lo contrario, los genes multicopia presentan una sensibilidad más elevada, debido a que el gen o genes diana van a estar en mayor cantidad en la muestra. Los más utilizados dentro de esta última categoría son el grupo de genes del ADN ribosomal (ADNr), dentro de los cuales destaca el empleo de las regiones ITS (ITS1 y ITS2).

El DNA ribosomal (ADNr) nuclear de los organismos eucariotas está formado por varios cientos de copias repetidas en tándem de una unidad de transcripción, más varios espacios adyacentes no transcritos. Dentro de la unidad transcripcional se encuentran los genes que codifican para los ARNs 18S, 5,8S, y 28S, más dos espacios transcritos internos que separan estos genes, denominados ITS1 e ITS2. Los espacios adyacentes a la unidad transcripcional contienen dos zonas espaciadoras. La primera de ellas es el espaciador transcrito externo (ETS), que está localizado “upstream” del gen 18S y contiene señales de parada de la transcripción. La segunda es un espaciador no transcrito (NTS), o también llamado espaciador intergénico (IGS), y se encuentra separando cada una de la copias de unidad de transcripción (Figura 7).

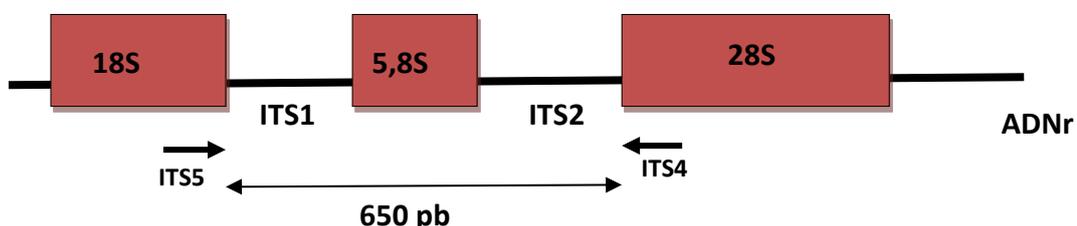


Figura 7. Genes del ribosoma que codifican para los ARNr 18S, 5.8S y 28S, y espaciadores internos ITS1 e ITS2.

Una de las razones más importantes por las que el empleo del ADNr se considera especialmente útil en estudios taxonómicos y filogenéticos, es la desigual evolución que presentan las diferentes regiones que lo componen, o dicho de otra forma, la tasa de

sustitución nucleotídica presenta ritmos diferentes en las distintas especies. La elección de la región de estudio es quizás el paso más crítico. Los criterios seguidos para seleccionar entre regiones conservadas o regiones variables dependen del interés de cada caso particular. Así, la subunidad pequeña (18S) es la que representa una tasa de evolución más baja y sería útil para el estudio de organismos muy divergentes. La subunidad grande (28S) muestra una tasa de evolución más rápida que la anterior, presentando algunas regiones concretas con mayor variabilidad, que pueden utilizarse para discriminar entre especies. El gen 5,8S muestra una variabilidad parecida a la subunidad pequeña, pero su menor tamaño dificulta el estudio de organismos muy divergentes. Por último, las zonas espaciadoras son las más variables y son de utilidad para el estudio de organismos que se encuentran próximos en la filogenia.

Entre las regiones espaciadoras más utilizadas se encuentran las regiones intergénicas ITS1 e ITS2. La variabilidad que se encuentra en estas regiones puede usarse para discriminar tanto entre especies próximas, como entre variedades de la misma especie. Además, la amplificación por PCR de estas regiones se encuentra facilitada no sólo por su presencia en múltiples copias, sino también por la proximidad de las regiones conservadas, a partir de las cuales se pueden diseñar los oligonucleótidos necesarios para actuar como *primers* o cebadores (Bruns y Shefferson, 2004; Nilsson y Ehrenberg, 2008). De este modo, tomando como base secuencias conservadas de los genes 18S y 28S respectivamente, White y col. (1990), desarrollaron una pareja de oligonucleótidos denominados ITS1 e ITS4 para amplificar por PCR estas regiones, más el gen que codifica para el RNA 5,8S. Mediante el empleo de estos oligonucleótidos se ha amplificado las regiones ITS de diferentes hongos filamentosos, y sus secuencias han servido para el estudio de las relaciones filogenéticas entre especies dentro de distintos géneros como *Phytophthora* (Lee y Taylor, 1992), *Penicillium* (Lobuglio y Taylor., 1993), *Sclerotinia* (Carbone y Kohn, 1993) y *Metarhizium* (Currant y col., 1994).

Finalmente, cabe destacar que dada la enorme complejidad existente en la identificación de los hongos pertenecientes al género *Penicillium* mediante las técnicas tradicionales, la secuenciación de los espacios transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2) ha ofrecido grandes ventajas en dicha tarea por su especificidad y sensibilidad. Por ello, son muchos los trabajos en los que han identificado las especies de *Penicillium* usando esta técnica molecular. Así, Iacumin y col. (2009) caracterizó la microbiota desarrollada sobre la superficie de salchichas mediante la secuenciación de los fragmentos ITS1 e ITS2. Del mismo modo, Oliveira y col. (2010) secuenció los fragmentos ITS1 e ITS2 para estudiar así los hongos contaminantes ambientales de una región de Portugal.

Por otro lado, se ha descrito un método de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) que permite, mediante digestión con el enzima de restricción *HaeIII* del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del ADN que codifica para el ARN ribosomal, identificar a la especie *P. aurantiogriseum* (Colombo y col., 2003). Del mismo modo, Samson y col. (2004b) y Seifert y Louis-Seize (2000) analizaron una región de 360 pares de bases del gen que codifica la β -tubulina para identificar especies del complejo *P. aurantiogriseum* y otras especies de interés del subgénero *Penicillium*. También, Logrieco y col. (1990) analizaron secuencias de ADN ribosómico para corroborar la identidad de diversas especies del subgénero *Penicillium*.

I.5. OBJETIVOS

La biota fúngica presente en la superficie de los jamones curados determina en gran medida la calidad higiénico-sanitaria y organoléptica del producto. El jamón de Teruel es una de las D.O.P. de nuestro país pero no se ha encontrado bibliografía en la que se haya caracterizado su biota fúngica. Numerosos trabajos demuestran que tanto el jamón como otros productos cárnicos curados pueden presentar una importante contaminación por micotoxinas, particularmente OTA Y CPA. Por este motivo, consideramos de gran interés estudiar la microbiota presente en la superficie del jamón D.O.P. de Teruel. Así, el objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar la biota fúngica del jamón D.O.P. de Teruel y estudiar la capacidad toxigénica y enzimática de esta biota, con un interés especial en los hongos del género *Penicillium*. Para abordar dicho objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento, recuento e identificación mediante técnicas moleculares de los hongos aislados en el jamón y en el ambiente de las cámaras de producción del jamón D.O.P. de Teruel.
2. Caracterización molecular de las cepas de *Penicillium* aisladas.
 - 2.1. Caracterización intraespecífica de las cepas mediante el empleo de PCR con primers arbitrarios (ap-PCR).
 - 2.2. Análisis filogenético mediante la secuenciación de las regiones ITS.
3. Evaluación de la capacidad de producir ácido ciclopiazónico (CPA) y ocratoxina A (OTA) *in vitro* de las cepas de hongos aisladas.
4. Detección y cuantificación de CPA y OTA en muestras de jamón D.O.P. de Teruel.
5. Determinación de la actividad lipolítica y proteolítica de los hongos aislados.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Para el aislamiento fúngico se obtuvieron un total de 67 muestras de jamón y 80 de ambiente de 2 secaderos inscritos a la Denominación de Origen Protegida de Teruel, situados en los municipios de Mora de Rubielos (secadero 1, S1) y Puebla de Valverde (secadero 2, S2). En ambos secaderos se tomaron muestras de las superficies de los jamones y del ambiente, en las diferentes etapas de producción (Figura 8A, Tabla 10). El proceso productivo difería ligeramente entre ambos secaderos ya que al final de cada etapa de S2 los jamones se lavaban, raspaban y se untaban con manteca para eliminar los micelios fúngicos desarrollados. Sin embargo, en S1 dichas acciones únicamente se llevaban a cabo antes de la venta de los jamones.

Para la determinación y cuantificación de Ácido Ciclopiazónico (CPA) y Ocratoxina A (OTA) en el producto cárnico se tomaron un total de 10 muestras comerciales de jamón. Los productos procedían de los mismos secaderos muestreados para realizar el aislamiento fúngico, S1 y S2.

Tabla 10. Toma de muestras de jamón y ambiente realizada en los dos secaderos estudiados (S1 y S2).

Secadero	Etapas	Meses en la etapa	Temperatura y HR ^a de la cámara	Muestras de jamón	Muestras de ambiente
S1	Postsalado	3	1,5°C, 85% HR	5	10
	Secado	3	9°C, 80% HR	5	10
	Envejecimiento	14	12°C, 70% HR	20	20
S2	Postsalado	3	3°C, 82% HR	10	20
	Secado	7	8°C, 85% HR	17	10
	Envejecimiento	10	16°C, 85% HR	10	10

^aHumedad Relativa

II.2. PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS

II.2.1. MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO FÚNGICO

Las muestras de jamón se obtuvieron de tres partes diferentes del mismo: maza, babilla y punta. Para ello se realizaron frotados superficiales usando 3 escobillones estériles diferentes y plantillas estériles de 5 cm² para delimitar la superficie a muestrear (Figura 8B). Las muestras se transportaron en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio siendo inmediatamente analizadas tras su recepción.

Una vez en el laboratorio, se cortaron las puntas de los tres escobillones que formaban cada muestra de jamón en condiciones de esterilidad y se introdujeron en tubos con 10 ml de agua de peptona estéril al 0,1% (p/v) (Oxoid L37) donde se agitaron mediante un vórtex durante 1 minuto (dilución madre). La dilución 10⁻¹ se preparó tomando una alícuota de un 1 ml con una punta de pipeta estéril de la dilución madre y pasándola a otro tubo con 9 ml de agua de peptona estéril al 0,1% (p/v).

Las muestras de ambiente se obtuvieron dejando abiertas durante 30 minutos placas Petri con agar PDA (Potato Dextrosa Agar, Scharlau Microbiology 01-483). Éstas se distribuyeron en puntos equidistantes y a diferentes alturas por toda la sala (Figura 8C). Las muestras de ambiente no se sometieron a ninguna dilución ni preparación previa a su incubación.



(A) Muestreo de una de las cámaras de secado.

(B) Toma de muestras de la superficie del jamón mediante escobillones y plantillas estériles.

(C) Toma de muestras de ambiente.

Figura 8. Toma de muestras en la etapa de secado de uno de los secaderos incluidos en el estudio.

II.2.2. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

Para el estudio de la presencia de micotoxinas en el jamón se seleccionaron 10 pernils que habían terminado su etapa de envejecimiento y que habían sido muestreados previamente durante dicha etapa para el aislamiento e identificación fúngica. Las muestras se obtuvieron mediante escisión de 100 gramos de cada pieza, formados a su vez de tres partes diferentes: maza, babilla y punta. Las muestras se conservaron en congelación (-18°C) hasta el posterior procesamiento y extracción de micotoxinas (véase apartado II.9.2 de Material y Métodos).

II.3. AISLAMIENTO Y RECuento DE HONGOS

Para el aislamiento y recuento de hongos a partir de las muestras de jamón, se realizaron siembras en superficie en medio DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol, Scharlau Microbiology 01-657) a partir de la dilución madre y la dilución 10^{-1} (Pitt y Hocking, 1997). Para ello se tomaron alícuotas de 0,1 ml de cada una de ellas con puntas de pipeta estériles y se depositaron en placas Petri con agar DRBC (Scharlau Microbiology 01-657). Las alícuotas se extendieron con la ayuda de asas de siembra acodadas de plástico, estériles y de un solo uso. Las placas inoculadas se incubaron a 25°C durante 5 días en aerobiosis y condiciones de oscuridad. Los resultados se expresaron como ufc/cm².

Para el aislamiento de hongos a partir de las muestras ambientales, las placas Petri de medio PDA (Scharlau Microbiology 01-483) se incubaron a 25°C durante 5 días en aerobiosis y condiciones de oscuridad. Transcurrido el periodo de incubación se realizó el recuento de los hongos. Los resultados se expresaron como ufc/cm².

Los recuentos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza mediante el programa estadístico Statgraphics 5.1.

De todas las colonias obtenidas a partir de las muestras de jamón y de ambiente, se seleccionaron aleatoriamente colonias representativas de cada tipo y se aislaron cultivos puros en placas Petri con agar MEA (Malt Extract Agar, Scharlau Microbiology 07-080). Las placas de resiembra se incubaron a 25°C durante 5 días en aerobiosis y condiciones de oscuridad.

II.4. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS

El mantenimiento y conservación de los hongos se llevó a cabo de dos formas diferentes:

- a) Para el trabajo diario en el laboratorio, las cepas se mantuvieron por resiembras periódicas en placas con agar PDA (Scharlau Microbiology 01-483). Los cultivos bien esporulados se almacenaron a 4°C por periodos inferiores a 6 meses, al cabo de los cuales se obtuvieron nuevas resiembras.
- b) Para la conservación a largo plazo, se prepararon suspensiones en agua estéril y glicerol al 80% de pequeños trozos de cultivo del hongo en PDA (Scharlau Microbiology 01-483). Los glicerizados se almacenaron a -18°C y así mantuvieron su viabilidad y estabilidad genética durante más de un año.

II.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Los hongos aislados se identificaron mediante métodos tradicionales y moleculares. La identificación tradicional consistió en analizar las características macroscópicas y microscópicas con la ayuda de directrices publicadas (Klich, 2002; Samson y col., 2004a y 2004b). La identificación macroscópica se realizó mediante la observación de los caracteres más distintivos de las colonias crecidas en agar MEA (Scharlau Microbiology 07-080): color y tonalidad (anverso y reverso), textura superficial, exudados, pigmentos, tamaño, morfología,

crecimiento, presencia de surcos y/o estrías (anverso y reverso) de las colonias. La identificación microscópica se realizó mediante observaciones al microscopio de preparaciones de los hongos crecidos en agar MEA (Scharlau Microbiology 07-080), prestando especial atención a la presencia o ausencia de tabiques, al color del micelio vegetativo y a la morfología de esporas e hifas especializadas del micelio reproductor. Para la preparación microscópica las preparaciones se tiñeron con azul de lactofenol.

Las colonias identificadas macroscópicamente y microscópicamente como *Penicillium* se caracterizaron también con métodos moleculares mediante el empleo de la técnica ap-PCR (del inglés Arbitrary Primers PCR), que se basa en el uso de la PCR para amplificar fragmentos de ADN con cebadores específicos para secuencias repetitivas presentes en el genoma y denominadas microsatélites. Esta técnica difiere de los RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) en que los cebadores son de mayor tamaño y la temperatura de hibridación es mayor, por lo que hibridan en zonas específicas del genoma y su reproducibilidad es mayor. El resultado es la obtención de patrones de bandas que pueden ser característicos de cepas o variedades dentro de una misma especie. Las cepas que presentaron los mismos patrones de bandas mediante la caracterización por ap-PCR, se agruparon y se seleccionaron cepas representativas para su posterior análisis mediante secuenciación de la región 5,8S-ITS del ADN ribosomal (Figura 9).

Todas las colonias no identificadas como *Penicillium* que presentaron idénticas características macroscópicas y microscópicas se agruparon y consideraron como pertenecientes a la misma especie fúngica para su posterior análisis mediante secuenciación de la región 5,8S-ITS del ADN ribosomal (Figura 9).

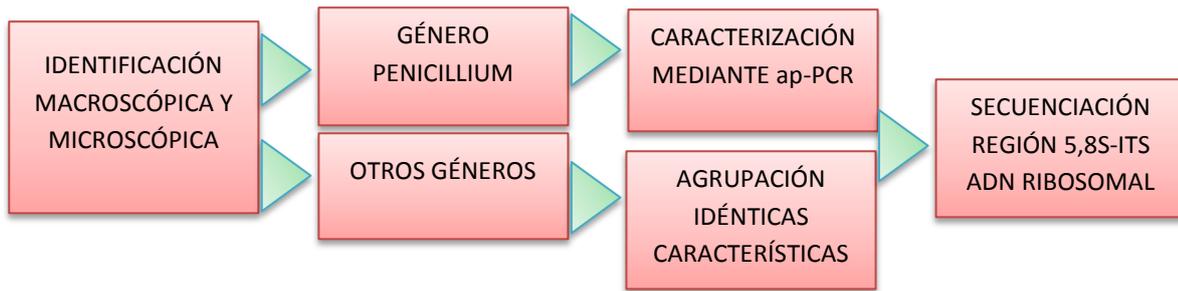


Figura 9. Procedimiento de identificación de las colonias aisladas en el estudio.

II.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE AP-PCR

II.6.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN genómico de las cepas de *Penicillium*, se inocularon conidios con la ayuda de un palillo estéril en 500 µl caldo PDB (Potato Dextrosa Broth) y se incubaron durante 48 horas a 24°C en estufa con agitación (Ecotron, 200 rpm). Pasado el periodo de incubación, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y se desechó el líquido sobrenadante. El micelio se resuspendió en 300 µl de TENS (Tris-HCl 200mM pH 8,5, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%), se añadieron 5 bolitas metálicas y se homogenizó con un disruptor celular (Mini Bead-Beater) durante 2 minutos a 4°C. Se adicionaron 150 µl de NaOAc 3M pH 5,2 y se incubó a -20°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos y se adicionó al líquido sobrenadante 1 volumen de isopropanol (1:1, v/v). Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se desechó el líquido sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) (Moslem y col., 2010).

II.6.2. ARBITRARY PRIMERS (AP-PCR)

Para la caracterización molecular de los hongos se utilizaron los siguientes cebadores específicos: GACGACGACGACGAC [(GAC)₅], GACAGACAGACAGACA [(GACA)₄] y

GACAGGACAGGACAG [(GACAG)₃] (Freeman y col., 2004; Freeman y Shabi, 1996; Martínez-Culebras y col., 2009). Las reacciones ap-PCR se realizaron en 25 µl de volumen final, conteniendo 40 ng ADN, 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl, 0,2 mM (cada uno) dNTP, 1,6 µM de cada cebador, 3 mM MgCl₂ y 1 U de ADN polimerasa (Netzyme, Molecular Netline Bioproducts, N.E.E.D, SL, Valencia, España). Las mezclas ensayadas se incubaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, U.S.A.) con el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 48°C [para (GACA)₄ y (GACAG)₃] o 60°C [para (GAC)₅] y 2 minutos a 72°C, y un último ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente, 5 µl de los productos de PCR se utilizaron para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1,25 % en tampón SB 1X (0,01M NaOH, 0,8M ácido bórico, pH 8). Los productos de la PCR se visualizaron tras inmersión en bromuro de etidio (5 mg/ml) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

II.6.3. DENDROGRAMA

El análisis de los patrones de bandas resultantes de la caracterización de las cepas mediante ap-PCR se realizó mediante la elaboración de un dendrograma. Como cepas de referencia se incluyeron las siguientes cepas: *P. camemberti* CECT 2267, *P. chrysogenum* CECT 20753, *P. citrinum* CECT 20822, *P. commune* CBS 109822, *P. expansum* CECT 2278, *P. expansum* CECT 2279, *P. nordicum* CBS 110769, *P. nordicum* CBS 112573, *P. nordicum* CBS 113876, *P. polonicum* CBS 101479, *P. verrucosum* CBS 302.48 y *P. verrucosum* CBS 325.92. Para la elaboración del dendrograma, se calculó la movilidad relativa de todas las bandas obtenidas mediante ap-PCR de cada uno de los patrones de bandas. Los resultados se transformaron en una matriz de datos en la que las bandas se consideraron como caracteres binarios y se evaluaron como “1” cuando hubo presencia y “0” cuando hubo ausencia de ellas.

Con el fin de normalizar los patrones de bandas, se incluyeron en la electroforesis marcadores moleculares de pares de bases. Sólo se incluyeron en el análisis aquellas bandas que podían ser obtenidas de manera inequívoca. El polimorfismo de los cebadores se evaluó de acuerdo al poder discriminatorio, según el procedimiento descrito por Hunter (1990). La matriz de similitud se elaboró utilizando el coeficiente de correlación de *Jaccard*, el cual proporciona similitud en base a las curvas densitométricas. Los patrones de bandas obtenidos mediante ap-PCR usando los cebadores [(GAC)₅], [(GACA)₄] y [(GACAG)₃] se agruparon teniendo en cuenta el número de bandas compartidas utilizando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). La consistencia de las agrupaciones obtenidas se estimó empleando el método de bootstrap. Todos los análisis se realizaron para los patrones de bandas obtenidos en cada uno de los cebadores utilizados y compilando los patrones obtenidos en todos ellos, utilizando el programa estadístico NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2002). Las cepas que presentaron los mismos patrones de bandas se agruparon y se seleccionaron cepas representantes para su posterior análisis mediante secuenciación de la región ITS-5,8S del ADN ribosomal.

II.7. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 5,8S-ITS DEL ADN RIBOSOMAL

Un representante de cada cepa de *Penicillium* y del resto de hongos identificados mediante métodos tradicionales se identificaron en base a la secuencia ITS-5,8S del ADN ribosomal.

II.7.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Todas las cepas seleccionadas se cultivaron durante 6-8 días en medio de cultivo MEA (Scharlau Microbiology 07-080). Se recogió micelio de las placas, se congeló con nitrógeno líquido y se trituró con la ayuda de un mortero hasta conseguir micelio triturado en forma de

polvo fino. Las extracciones de ADN se realizaron empleando 100 mg del polvo y el kit comercial EZNA de ADN fúngico (Omega bio-teck, Doraville, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Ultrospec® 2100pro (Amersham Biosciencias).

II.7.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN RIBOSOMAL MEDIANTE PCR

La región 5,8S-ITS se amplificó mediante la técnica de PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) empleando los cebadores universales: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG [ITS5] y TCCTCCGCTTATTGATATGC [ITS4] (White y col., 1990). Las reacciones PCR se realizaron en 100 µl de volumen final, conteniendo 100-200 ng ADN, 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl, 80 µM (cada uno) dNTP, 1 µM de cada cebador, 2 mM MgCl₂ y 1 U de ADN polimerasa (Netzyme, Molecular Netline Bioproducts, N.E.E.D, SL, Valencia, España).

En todos los casos se incluyó un control negativo de reacción con las mismas condiciones pero sin ADN molde. Las mezclas ensayadas se incubaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, U.S.A.) con el siguiente programa térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C y 1 minuto a 72°C, y un último ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C. Posteriormente, 5 µl de los productos de PCR se utilizaron para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, pH 7,6 y 1 mM Na₂EDTA). Los productos de la PCR se visualizaron tras inmersión en bromuro de etidio (5 mg/ml) y posterior irradiación con luz UV.

II.7.3. PURIFICACIÓN DE ADN

Los productos de PCR se limpiaron con el kit de purificación (EZNA[®] Plant DNA Miniprep Kit, Omega Bio-Tek, Doraville, USA) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor y se mantuvieron a -20 °C hasta su secuenciación.

II.7.4. SECUENCIACIÓN 5,8S-ITS ADN RIBOSOMAL

Para las reacciones de secuenciación se partió de 200 ng de DNA y se utilizó el kit BigDye[®] Terminator v3.1, Cycle Sequencing (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR de secuenciación se realizó utilizando los cebadores ITS4 e ITS5 con el siguiente programa técnico: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94°C, seguido por 99 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C. La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied biosystems) del servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia.

II.7.5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y ÁRBOL FILOGENÉTICO

Para el análisis filogenético de las cepas de *Penicillium* identificadas, las secuencias obtenidas se alinearon con el programa MEGA versión 4.1 (Kumar y col., 2001). Como cepas de referencia se utilizaron las siguientes secuencias de *Penicillium* obtenidas de las bases de datos: AF033483, *P. atramentosum*; EF634441, *P. brevicompactum*; AJ004814, *P. camemberti*; AF034463, *P. canescens*; EU833212; *P. chrysogenum*; DQ249212, *P. chrysogenum*; AJ004813, *P. commune*; AF455477, *P. commune*; EF200099, *P. commune*; DQ339561, *P. concentricum*; X82361, *P. crustosum*; EF634415, *P. crustosum*; AB479316, *P. echinulatum*; AF033479, *P. expansum*; GU372903, *P. glabrum*; DQ681334, *P. granulatum*; GQ305305, *P. griseofulvum*; EF198531, *P. meleagrinum*; AJ004895, *P. nalgiovense*; DQ339554, *P. paneum*; GU566221, *P. polanicum*; AB479317, *P. verrucosum*; AJ005482, *P. viridicatum*. Las distancias filogenéticas se

calcularon usando el modelo de Jukes-Cantor y la inferencia filogenética se obtuvo por el método del vecino más próximo (Neighbour-joining, NJ) (Saitou y Nei, 1987). El árbol NJ y la confianza estadística de un grupo particular de secuencias del árbol, evaluados mediante el procedimiento de remuestreo por el método de bootstrap (Hills y Bull, 1993), también se realizó mediante el programa MEGA versión 4.1 (Kumar y col., 2001).

II.8. CEPAS DE REFERENCIA

Para el análisis filogenético y el estudio de la actividad enzimática y toxigénica de las cepas aisladas en el estudio, se incluyeron también como referencia las cepas de *Penicillium* reflejadas en la Tabla 11. Éstas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) y del Centro de Biodiversidad Fúngica *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Holanda).

Tabla 11. Cepas de referencia.

Cepa	Nombre cepa	Aislamiento	Origen	Actividad enzimática ¹	Micotoxinas ²
CECT 2267	<i>P. camemberti</i>	Carne de cerdo	Alemania	Bruna y col., 2003	Taniwaki y col., 2001 (CPA)
CECT 20753	<i>P. chrysogenum</i>	Jamón	España	Rodríguez-Martín y col., 2010	
CBS 20822	<i>P. citrinum</i>	Desconocido	EEUU		
CBS 122398	<i>P. citrinum</i>	Cacahuete	Indonesia		
CBS 109822	<i>P. commune</i>	Salchicha	Alemania		
CECT 2279	<i>P. expansum</i>	Salami	Bulgaria		
CECT 2278	<i>P. expansum</i>	Salchichón	Holanda		Luque y col., 2011 (Patulina)
CBS 110769	<i>P. nordicum</i>	Salami	Italia		Rodríguez y col., 2011 (OTA)
CBS 113876	<i>P. nordicum</i>	Salchicha	Italia	Berni y col., 2011	Berni y col., 2011 (OTA)
CBS 112573	<i>P. nordicum</i>	Salami	Italia		Frisvad y Samson, 2004 (OTA)
CBS 101479	<i>P. polonicum</i>	Alimentos	Bulgaria		Frisvad y Samson, 2004 (Verr) ³
CECT 2905	<i>P. roqueforti</i>	Queso	EEUU	Fernández-Bodega y col., 2009	Frisvad y Samson, 2004 (Roq) ⁴
CBS 324.92	<i>P. verrucosum</i>	Salami	Dinamarca		Rodríguez y col., 2011 (OTA)
CBS 325.92	<i>P. verrucosum</i>	Salami	Dinamarca		Información de la CBS (OTA)
CBS 302.48	<i>P. verrucosum</i>	Queso			Información de la CBS (OTA)

¹Estudios que han descrito la actividad proteolítica y/o lipolítica de las cepas.

²Estudios que han descrito la capacidad toxigénica de las cepas.

³Verrucosidina

⁴Roquefortina

II.9. DETERMINACIÓN ACTIVIDAD TOXIGÉNICA

II.9.1. EXTRACCIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA EN MEDIO DE CULTIVO

Los hongos se sembraron en el en medio de cultivo sólido Czapeck Agar (Cz), inductor de la producción de CPA, ((sacarosa 3% (p/v), Czapeck concentrado 1% (v/v), KH_2PO_4 0,1% (p/v) y agar 1,5% (p/v); siendo Czapeck concentrado (100x) (NaNO_3 30% (p/v), KCl 5% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5% (p/v) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v)) y en medio de cultivo sólido Czapeck Yeast Agar (CYA), inductor de la producción de OTA (KH_2PO_4 0,1% (p/v), que contiene Czapeck concentrado 1% (v/v), solución traza de metales 0,1% (v/v), extracto de levaduras 0,5% (p/v), sacarosa 3% (p/v) y agar 2% (p/v); siendo Czapeck concentrado (100x) (NaNO_3 30% (p/v), KCl 5% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5% (p/v) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v)) y solución traza de metales ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% (p/v) y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v)). La siembra en ambos casos se realizó en tres puntos equidistantes en la placa de cultivo y se incubaron a 25 °C durante 21 días. La extracción de la micotoxina se realizó siguiendo la metodología descrita por Bràgulat y col. (2006). Brevemente, el método de Bràgulat y col., (2006) consiste en tomar tres porciones de agar con un sacabocados (6 mm de diámetro) del centro, medio y extremo de cada una de las tres colonias de cada placa, tras 14 y 21 días de incubación para la extracción de CPA y tras 7 y 14 días de incubación para la extracción de la OTA (Figura 10). Posteriormente, los trozos de agar se introdujeron en un tubo eppendorf con 500 μl de metanol, se agitaron con el vortex durante 10 segundos y se dejaron macerar durante una hora. A continuación, el líquido se pasó por filtros de 0,45 μm (MillexR SLHV 013NK, Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.) y se almacenó en otro vial a -18°C hasta la realización de los análisis cromatográficos.

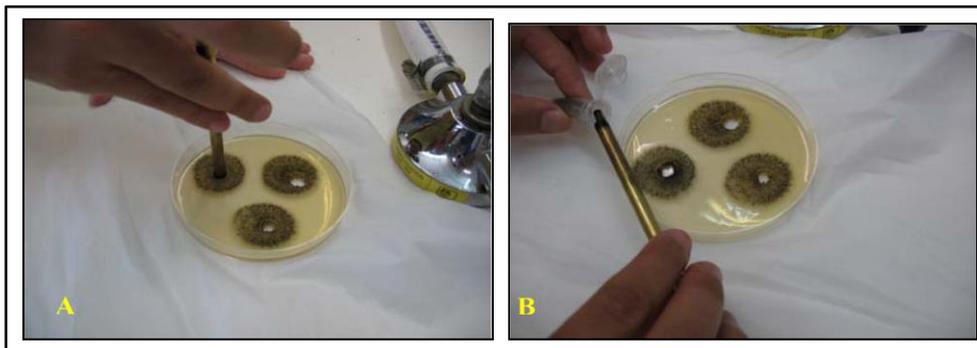


Figura 10. A y B) Extracción de una muestra de *Aspergillus* mediante un sacabocados a los 7 días de incubación en el medio de cultivo CYA.

La producción de CPA se detectó y cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 (250×4.6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula; Supelcosil LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)) conectada a una pre-columna Security Guard (20×4.6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula, LC-18 Supelguard, Supelco), siguiendo la metodología descrita por Urano y col. (1992) y Hayashi y Yoshizawa (2005), con algunas modificaciones. La fase móvil consistía en metanol 85% (v/v) (diluyente A), metanol 85%, 4 mM ZnSO₄·7H₂O (v/v) (diluyente B) y ácido acético 0,1% (v/v) (diluyente C) con un gradiente de elución de: 100% A a 100% B (0–10 minutos), 100% B (10–12 minutos), 100% B a 100% C (12–15 minutos), 100% C (15–25 minutos), 100% C a 100% A (25–27 minutos) y 100% A (27–32 minutos). El volumen de inyección fue de 20 µl, el flujo de 1 ml/minuto y el tiempo de retención de 9,6 minutos (Figura 11). El espectro de ultravioleta visible se midió desde 200 a 400 nm y presentó dos picos máximos de absorción a 220,3 nm y 281,9 nm (Figura 12). El tiempo de retención y el espectro de absorción obtenido en las muestras se compararon con el estándar puro de CPA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). El límite de detección en estas condiciones fue de 0,0001 µg CPA/g medio cultivo.

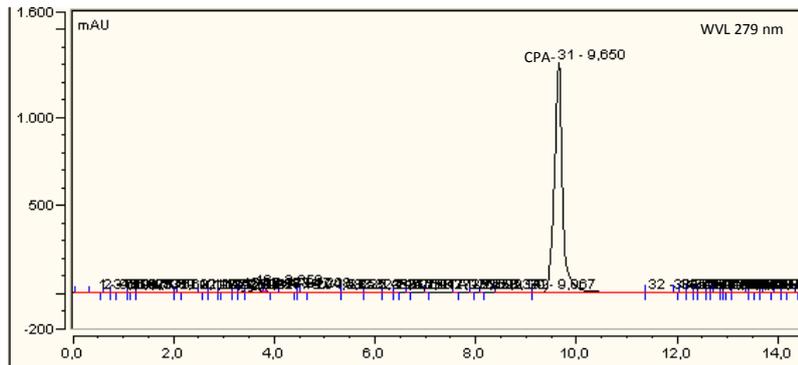


Figura 11. Cromatograma de un patrón comercial de CPA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico del CPA se produce a los 9,6 minutos.

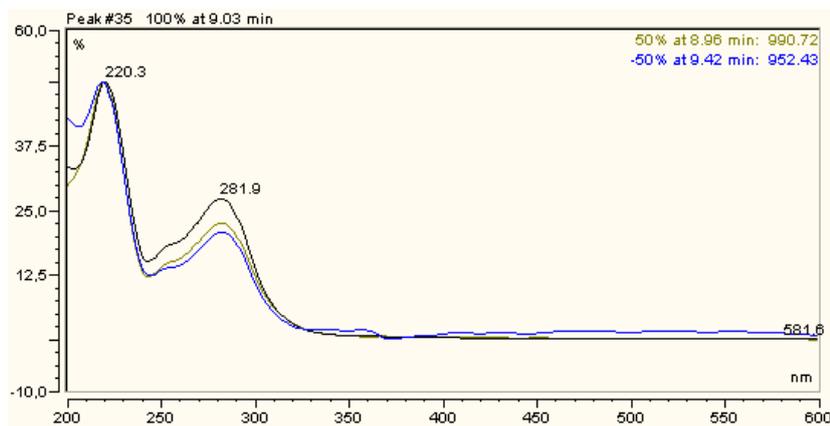


Figura 12. Espectro completo de absorción de un patrón de CPA medido a una longitud de onda de 279 nm.

La producción de OTA se detectó y cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La detección se realizó utilizando un detector de fluorescencia (λ_{exc} 330 nm; λ_{em} 460 nm) (Dionex RF-2000, Sunnyvale, CA, USA) y una columna C18 (150 x 4,6 mm i.d., 5 mm de tamaño de partícula, Kromasil C18, Análisis Vínicos S.L., Tomelloso, España), conectada a una precolumna Kromasil C18 (10 x 4,6 mm i.d., 5 μ m de tamaño de partícula, Análisis Vínicos S.L.). La fase móvil consistía en acético 0,1% (v/v), acetonitrilo 80% (v/v) con 0,1% de acético y acético 40% (24:71:5, v/v). El volumen de inyección fue de 20 μ l, el flujo de 1 ml/minuto y un tiempo de retención de 4,4 minutos (Figura 13). El espectro de ultravioleta

característico de la OTA presentó dos picos máximos de absorción a 231,6 nm y 332,3 nm (Figura 14). El estándar de OTA para la cuantificación se obtuvo de *Aspergillus ochraceus* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). El límite de detección en estas condiciones fue de 0,0002 µg OTA/g medio cultivo.

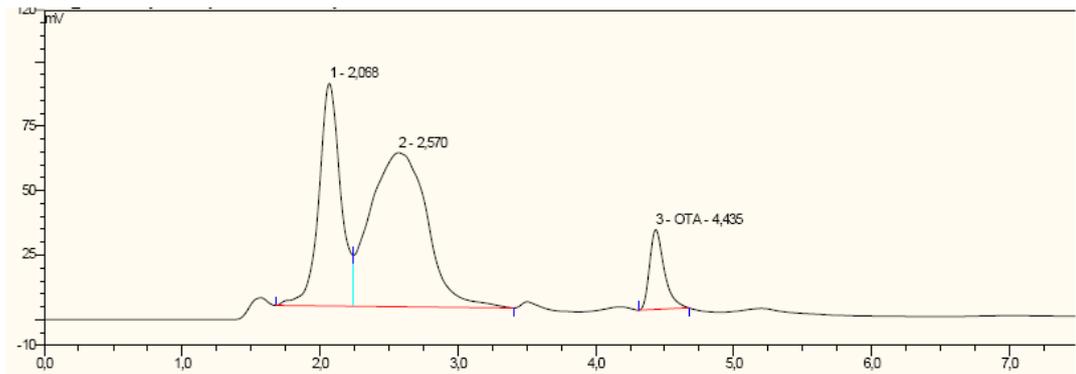


Figura 13. Cromatograma de un patrón comercial de OTA donde se puede ver que el tiempo de retención del pico de la OTA se produce a los 4,4 minutos.

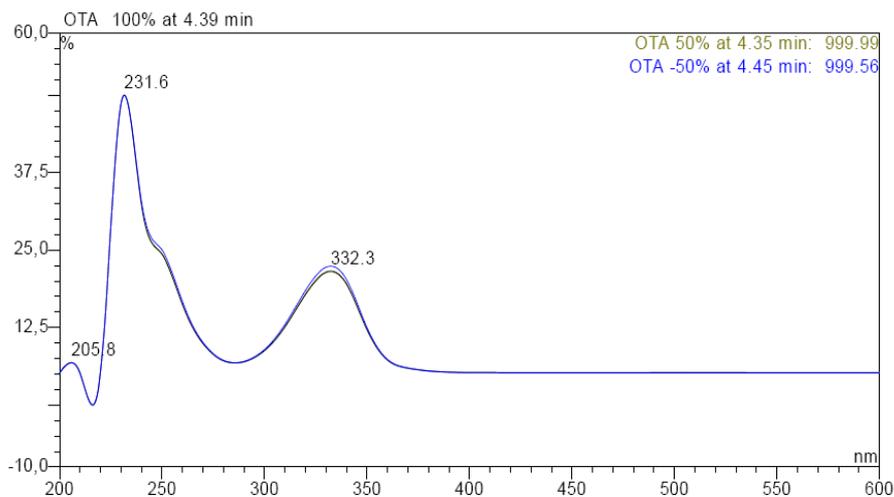


Figura 14. Espectro completo de absorción de la OTA (longitud de onda de 330 nm).

Para cuantificar la cantidad de CPA y OTA producida por las cepas, se elaboró una curva patrón con un total de ocho concentraciones de una muestra comercial de CPA (100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml) y un total de diez concentraciones de una muestra comercial de OTA (5 µg/ml, 3 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,001 µg/ml). Los picos de CPA y OTA

obtenidos con cada una de las concentraciones de la curva patrón se integraron y con ello se obtuvieron los distintos valores de área. En las Figuras 15 y 16 se muestran las curvas patrón donde se representan los distintos valores de área obtenidos y los $\mu\text{g/ml}$ de CPA y OTA a los que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una recta de regresión. Utilizando dicha recta de regresión se calcularon las concentraciones de OTA y CPA producidas por cada una de las cepas analizadas.

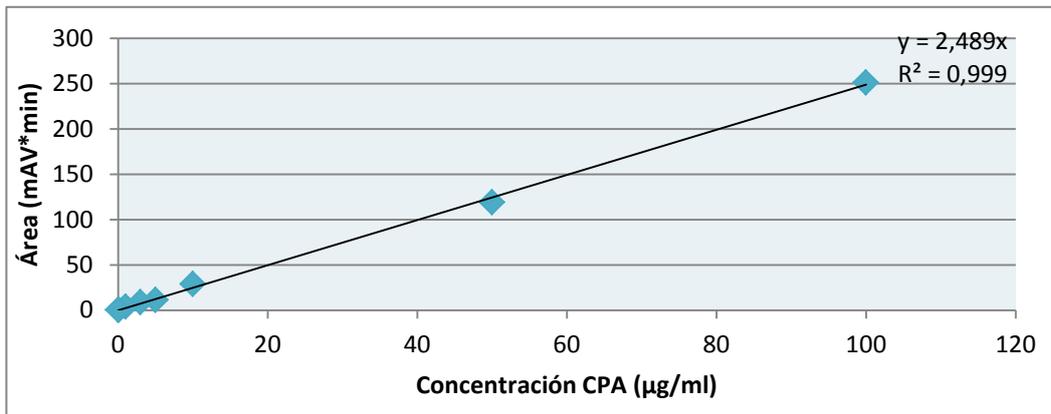


Figura 15. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.

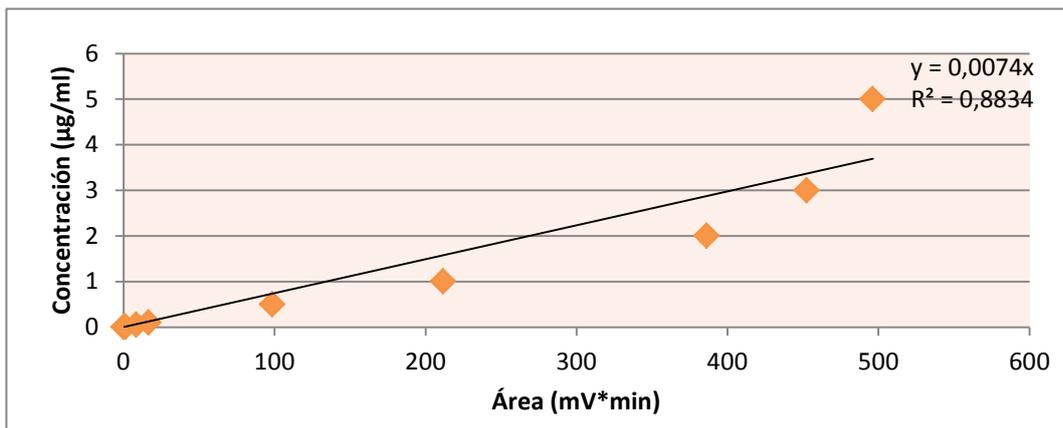


Figura 16. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.

II.9.2. EXTRACCIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA EN MUESTRAS DE JAMÓN

La extracción y purificación del CPA de las muestras de jamón se realizó siguiendo la metodología descrita por Hayashi y Yoshizawa (2005) con algunas modificaciones. Las muestras de jamón (10 g de cada una) se extrajeron con acetronitrilo:bicarbonato sódico 1% (7:3, v/v, 50 ml), se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos y se filtraron usando filtros Whatman Nº 4. Se ajustó el pH del filtrado a pH 2 y se suspendió en 25 ml de cloroformo (1:1, v/v). Como paso adicional para purificar la muestra, la fase orgánica (50 ml) se extrajo 2 veces consecutivas con bicarbonato sódico 5% (25 ml por purificación). La fase acuosa (40 ml) se acidificó hasta pH 2 y se suspendió en 25 ml de cloroformo (1:1, v/v). Finalmente el cloroformo se evaporó al vacío en un rotovapor y la muestra se suspendió en 500 µl de metanol. El porcentaje de recuperación y el límite de detección de CPA bajo estas condiciones fue del 75% y 0,00015 µg/g, respectivamente. El líquido resultante se pasó por filtros de 0,45 µm (MillexR SLHV 013NK, Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.) y se almacenó en otro vial a -18°C hasta la realización de los análisis cromatográficos. Los análisis cromatográficos se realizaron según lo reflejado en el apartado II.9.1. del presente capítulo.

Para cuantificar la cantidad de CPA existente en las muestras se elaboró una curva patrón con un total de seis concentraciones de una muestra comercial de CPA (0,3 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,015 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,001 µg/ml). La Figura 17 muestra la curva patrón donde se representan los distintos valores de área obtenidos y la concentración de CPA a la que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una recta de regresión que permitió calcular la concentración de CPA existente en cada una de las muestras de jamón analizadas.

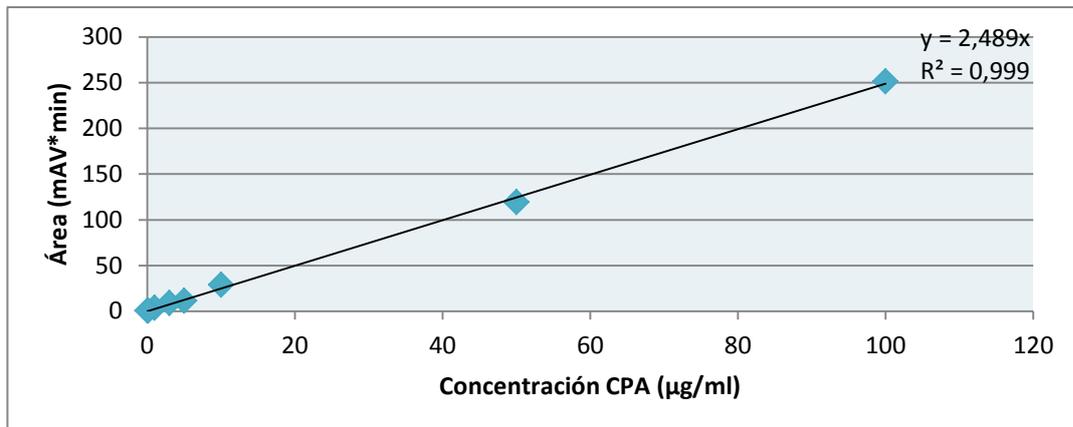


Figura 17. Curva que representa la relación lineal entre el área obtenida en el ensayo HPLC de las muestras patrón de CPA y la concentración de dichas muestras.

La extracción y purificación de la OTA de las muestras de jamón se realizó de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el proveedor del Kit ELISA (Ridascreen Ochratoxin A; R-Biopharm, Italy). Para ello se adicionó 17,5 ml de HCl 1M a 10 g de la muestra picada y se realizó una extracción con 20 ml de diclorometano. El líquido resultante se analizó mediante el kit ELISA. El límite de detección en estas condiciones fue de 0,00125 µg/g.

Para cuantificar la cantidad de OTA existente en el jamón se elaboró una curva patrón con un total de seis concentraciones de una muestra comercial de OTA (1800 ppt, 900 ppt, 300 ppt, 100 ppt, 50 ppt, 0 ppt). La absorbancia a 450 nm obtenida con cada una de las concentraciones de la curva patrón se integró y con ello se obtuvieron los distintos valores de absorbancia. En la Figura 18 se muestra la curva patrón donde se representan los distintos valores de absorbancia obtenidos y la concentración de OTA a la que corresponde. A partir de estos valores se elaboró una línea de tendencia polinómica. Utilizando dicha línea de tendencia se calcularon las concentraciones de OTA existentes en cada una de las muestras analizadas.

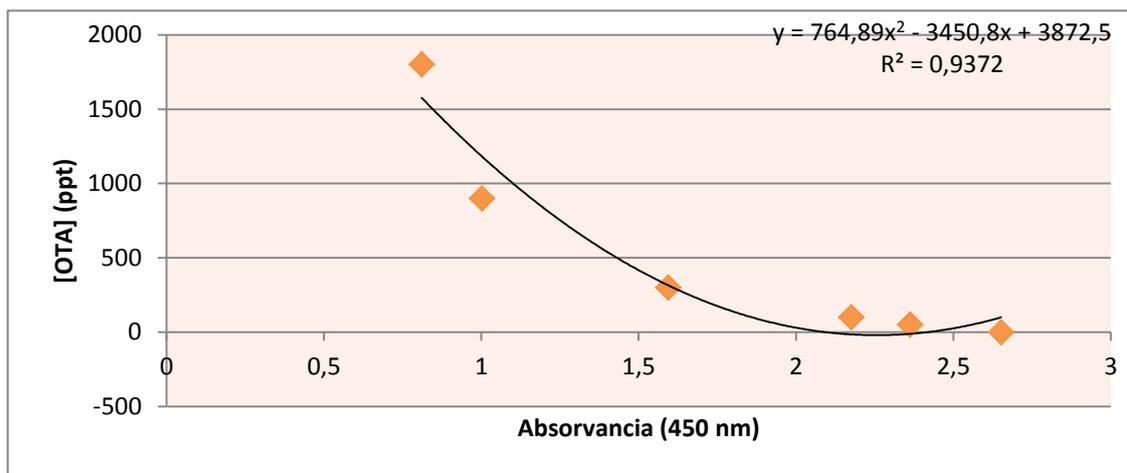


Figura 18. Curva que representa la relación polinómica entre la absorbancia obtenida en el ensayo ELISA de las muestras patrón de OTA y la concentración de dichas muestras.

II.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS HONGOS AISLADOS

II.10.1. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

La actividad lipolítica se evaluó en todas las cepas previamente secuenciadas frente a los ácidos grasos láurico, palmítico, esteárico y oleico, según la metodología descrita por Sierra (1957), con algunas modificaciones. Para ello las cepas se sembraron en el medio de cultivo Tween (peptona 1%, NaCl 0,3M, $\text{CaCl}_2 + 1\text{H}_2\text{O}$ 5mM, agar bacteriológico 1%, pH 7,7) al que se adicionó un 1% de tween 20, tween 40, tween 60 o tween 80 según el ácido graso a testar. Pasados 15 días de incubación a 28°C, la actividad lipolítica se observó mediante la aparición de un precipitado alrededor de los micelios fúngicos correspondiente a la precipitación de los ácidos grasos libres con las sales del medio de cultivo. Por su actividad lipolítica, se utilizaron como cepas control *Penicillium camemberti* CECT 2267 y *Penicillium roqueforti* CECT 2905 (Bruna y col., 2003; Fernández-Bodega y col., 2009).

II.10.2. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica se evaluó también en todas las cepas previamente secuenciadas en medio de cultivo PDA-Caseína (compuesto por Potato Dextrosa Agar con Skin Milk al 20%). Transcurridos 15 días de incubación a 28°C la actividad proteolítica de las cepas se observó mediante la aparición de un halo transparente alrededor del micelio.

Las cepas que presentaron un halo transparente superior a 10 mm o entre 3 y 10 mm en el medio de cultivo PDA-Caseína, se testaron sobre miosina de porcino (MYOSIN M-0273 SIGMA). Para ello, las cepas a testar se prepararon según el protocolo descrito por Rodríguez y col. (1998). Las cepas se sembraron en un tubo eppendorf con 59 μ l de solución de miosina (0,355 mg de miosina, 50% glicerol, cloruro de potasio 0,6M y tampón fosfato potásico pH 6,8 10 mM), 416 μ l de medio de cultivo (obtenido a partir de 1g de caldo Lauril Triptosa (DIFCO 31149), 50 ml de agua destilada y NaCl 0,8M), 100 μ g de cloranfenicol y se incubaron a 25°C durante 15 días en condiciones de oscuridad. Tras el periodo de incubación, y justo en el momento previo al desarrollo de la electroforesis, se tomó una alícuota de 30 μ l, se mezcló con 3 μ l de tampón reductor (4,6 % de SDS, 10% ml β -mercaptoetanol, 20% de glicerina, 25% de tampón fosfato potásico pH 6,8 y unas gotas azul de bromofenol) y se calentó a 100°C durante 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas.

El análisis de la actividad proteolítica se realizó sobre un gel de poliacrilamida discontinuo al 10% SDS-PAGE, según metodología descrita por Weber y Osborn (1969), con algunas modificaciones. El gel de resolución se preparó con poliacrilamida al 10% (acrilamida/bisacrilamida 10%, Tris 0,4M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,1% y TEMED 0,001%) y el gel concentrador con poliacrilamida al 5% (acrilamida/bisacrilamida 5%, Tris 0,12M pH 6,8, SDS 0,09%, persulfato amónico 0,14%, TEMED 0,14%). La electroforesis se desarrolló a potencia constante de 200V, durante 40 minutos, utilizando como tampón de electroforesis running buffer 1x (Tris 0,025M, glicina 0,192M y SDS 0,1%). Como marcador de

la electroforesis se utilizó el Sigma Marker N°3788. Finalizado el desarrollo electroforético, el gel se tiñó con tinción de Coomassie (Coomassie blue 0,25%, metanol 27%, ácido acético 5%) durante 1 hora con un suave y constante vaivén. Transcurrido el tiempo de tinción, el gel se decoloró con una solución de metanol 25% y ácido acético 10% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente el gel se fotografió para la caracterización de las bandas. *Penicillium chrysogenum* CECT 20753 (Rodríguez-Martín y col., 2010) se utilizó como cepa de referencia para evaluar la capacidad proteolítica.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 1. RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS PRESENTES EN EL JAMÓN Y AMBIENTE

En este apartado se ha fijado como objetivo principal aislar, realizar el recuento e identificar a nivel de especie los hongos presentes en las muestras de jamón curado y ambiente a lo largo de las diferentes etapas de producción.

III.1.1. RECUENTO DE HONGOS

El aislamiento y recuento de hongos a partir de muestras de jamón y ambiente se realizó según lo descrito en el apartado II.3. de Material y Métodos. En la Tabla 12 se muestran los recuentos mínimos, máximos y medios obtenidos a partir de las muestras procedentes de S1 y S2 en las diferentes etapas de elaboración. Los resultados se expresaron en ufc/cm². En la Figura 19 se puede observar la morfología típica de las colonias crecidas en los diferentes medios de cultivo utilizados.

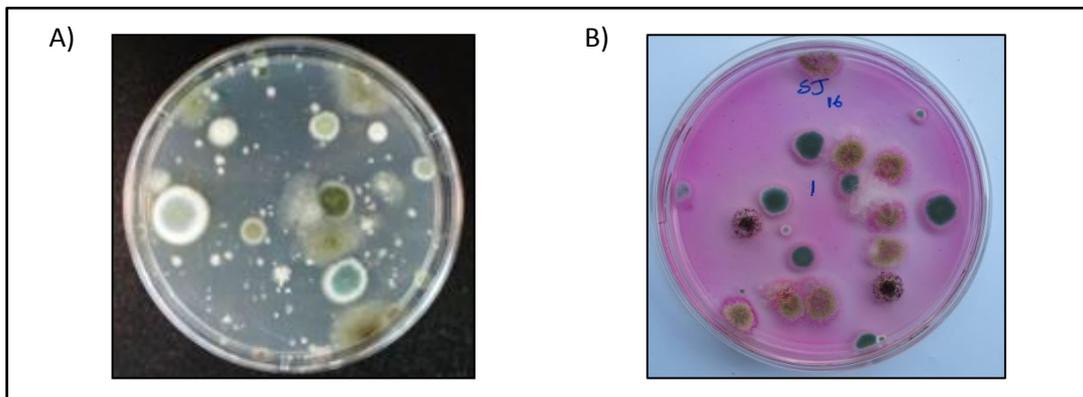


Figura 19. A) Hongos ambientales crecidos en agar PDA B) Hongos aislados en jamón crecidos en agar DRBC.

En todas las etapas de elaboración del jamón fue posible el aislamiento de hongos a partir de muestras de jamón, lo que demuestra su capacidad para crecer en un rango de temperaturas muy amplio (4-30°C). Sin embargo, el mayor recuento se obtuvo en las fases de secado natural y secado, donde la temperatura ambiental es próxima a 30°C, con valores

medios de 15,23 y 20,26 ufc/cm² para S1 y S2, respectivamente. De igual forma, en las muestras procedentes de ambiente, los mayores recuentos se obtuvieron en la fase de secado natural, con un valor medio de 3,67 ufc/cm² en el caso de S1. Los recuentos también fueron moderados en la fase de maduración en bodega, con valores máximos de 10,53 y 2,36 ufc/cm² para S1 y S2, respectivamente. Finalmente, cabe destacar la disparidad de resultados obtenidos entre ambos secaderos para las muestras de jamón en la fase de postsalado, al obtenerse valores medios de 0,03 ufc/cm² en S1 y 6,08 ufc/cm² en S2. Este último valor es inusualmente elevado para la fase de postsalado y difiere con los resultados obtenidos en los estudios realizados por Andrade y col. (2009), Battilani y col. (2007) y Monte y col. (1986), donde los mayores recuentos se dieron en la fase de maduración y éstos fueron mínimos en la fase de postsalado.

Tabla 12. Recuentos fúngicos obtenidos en las diferentes etapas de elaboración de los secaderos 1 y 2.

Secadero	Muestra	Fase	Mínimo (ufc/cm ²)	Máximo (ufc/cm ²)	Medio (ufc/cm ²)
1	Jamón	Postsalado	<1	0,16	0,03
		Secado	<1	6	1,2
		Maduración en bodega	<1	1,6	0,32
		Secado Natural	<1	43	15,23
		Total proceso	<1	43	5,39
	Ambiente	Postsalado	<1	1,73	0,74
		Secado	<1	2,04	0,79
		Maduración en bodega	<1	10,53	3,23
		Secado Natural	<1	11	3,67
		Total proceso	<1	11	2,08
2	Jamón	Postsalado	<1	48,25	6,08
		Secado	<1	200	20,26
		Maduración en bodega	<1	3,14	0,86
		Total proceso	<1	200	9,45
	Ambiente	Postsalado	<1	1,4	0,41
		Secado	<1	1	0,45
		Maduración en bodega	<1	2,36	1,23
		Total proceso	<1	2,36	0,62

Los recuentos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza. En dicho análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos obtenidos en

jamón para ambos secaderos. En este sentido, que no se encontraran diferencias en los recuentos de los hongos de ambos secaderos, podría ser indicativo de la ineffectividad del frotado superficial para la eliminación de los micelios, así como la limpieza y untado con manteca de los jamones para eliminar la contaminación fúngica (estos tratamientos solamente se realizaron en S2, al inicio de cada una de las fases). Por el contrario, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados procedentes de las muestras de ambiente entre ambos secaderos, siendo éstos más elevados en S1, con un valor medio de 2,08 ufc/cm². Del mismo modo, también se estudiaron las diferencias en los recuentos obtenidos en las diferentes fases. En los resultados procedentes del jamón de S1 se concluyó que sí existían diferencias estadísticamente significativas entre la fase de secado natural, donde se obtuvieron los recuentos máximos del S1 (43 ufc/cm²), y el resto de las fases. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las fases de S2. Respecto a los recuentos procedentes del ambiente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos secaderos. Además, en el caso de S1, se encontraron diferencias entre las fases de postsalado y secado natural y secado y secado natural, siendo en la fase de secado natural donde se obtuvieron los recuentos más elevados con 11 ufc/cm². Por otro lado, en el S2 las diferencias se encontraron entre las fases postsalado y maduración en bodega y secado y maduración en bodega.

III.1.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS

Se obtuvieron un total de 338 cultivos puros, de los cuales 146 se aislaron del jamón y 192 del ambiente. Todos ellos se identificaron a nivel de género mediante métodos tradicionales en base a sus características macroscópicas y microscópicas (véase apartado II.5. de Material y Métodos). En la Figura 20 se observa la morfología típica de algunas de las colonias crecidas sobre medio de cultivo DRBC y la imagen microscópica de los conidióforos de los géneros con mayor frecuencia de aislamiento.

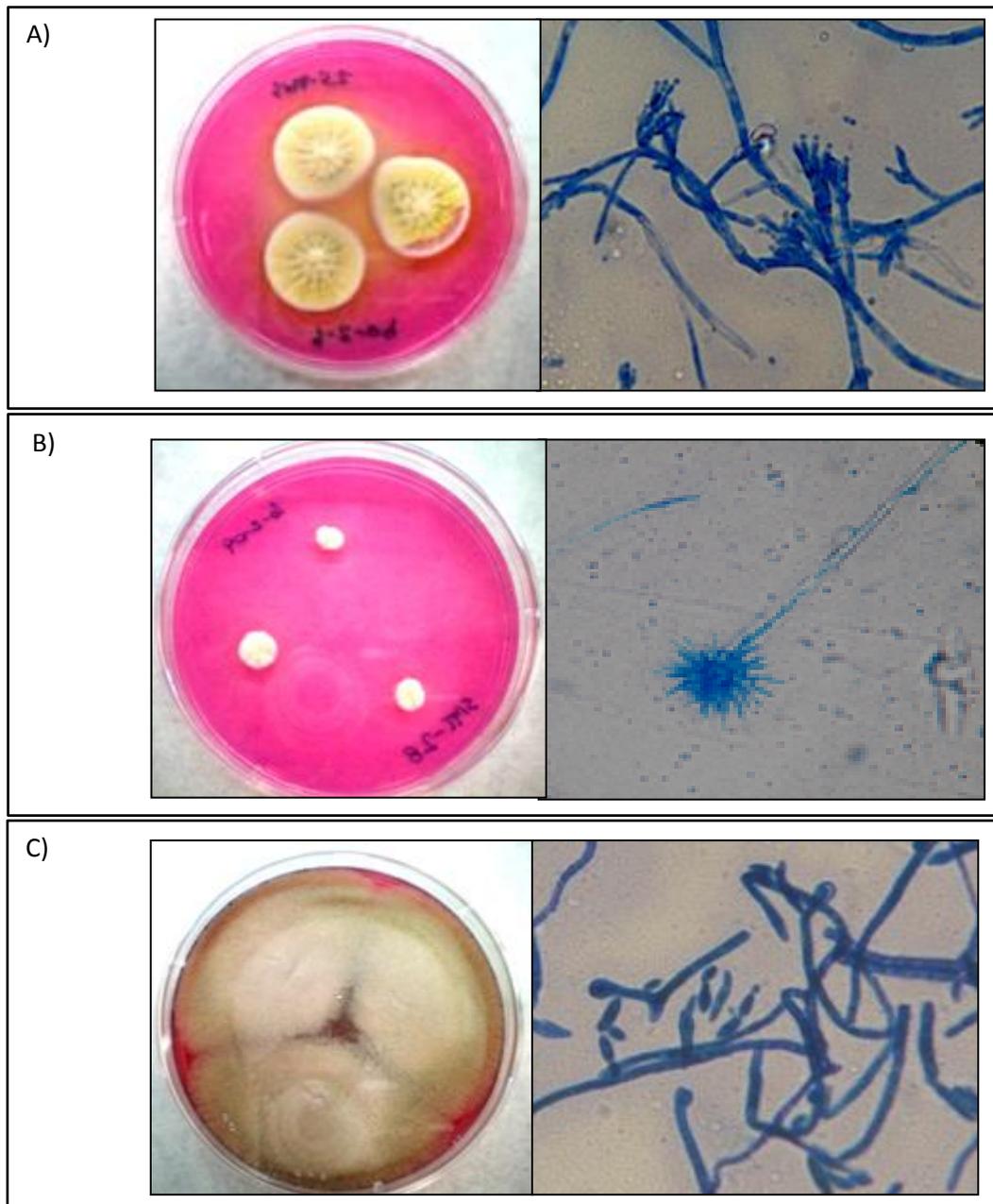


Figura 20. Aspecto macroscópico y microscópico de un cultivo de A) *Penicillium*; B) *Aspergillus*; C) *Cladosporium*.

En ambos tipos de muestras (jamón y ambiente) los géneros mayoritariamente aislados fueron *Penicillium* (221 aislados, 65,45%), *Aspergillus* (54 aislados, 15,89%) y *Cladosporium* (47 aislados, 13,81%) (Tabla 13). Otros géneros encontrados fueron *Byssochlamys* (7 aislados, 2,05%), *Trichoderma* (4 aislados, 1,18%) y *Alternaria* (2 aislados, 0,58%). En menor frecuencia se aislaron *Acremonium*, *Pleospora* y *Engyodontium* con 1 aislado

cada uno. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Comi y col. (2004), Núñez y col. (1996) y Sutic y col. (1972), aunque en estos trabajos también identificaron hongos pertenecientes al género *Eurotium* con una gran frecuencia de aislamiento.

Tabla 13. Géneros fúngicos aislados (%)¹ en las diferentes etapas de producción del jamón.

Género	SECADERO 1						SECADERO 2						TOTAL
	Jamón			Ambiente			Jamón			Ambiente			
	P ²	S ²	MS ²	P ²	S ²	MS ²	P ²	S ²	M ²	P ²	S ²	M ²	
<i>Penicillium</i>		2,36	7,37	0,88	0,29	11,50	6,78	12,09	7,08	7,37	3,24	6,49	65,45
<i>Aspergillus</i>			6,78	0,59	0,88	3,24	0,29	0,59	1,76	0,59	0,29	0,88	15,89
<i>Cladosporium</i>	0,29	0,29	3,83	0,88	0,58	0,88	2,06	1,18	0,88	1,77	0,88	0,29	13,81
<i>Byssochlamys</i>			0,88			0,29		0,29	0,59				2,05
<i>Trichoderma</i>									1,18				1,18
<i>Alternaria</i>									0,29			0,29	0,58
<i>Acremonium</i>					0,29								0,29
<i>Pleospora</i>										0,29			0,29
<i>Engyodontium</i>												0,29	0,29

¹Porcentaje calculado sobre el total de aislamientos (338 cepas)

²Etapas muestreadas: Postsalado (P), Secado (S), Maduración en bodega-Secado Natural (MS), Maduración en bodega (M).

En las muestras procedentes de jamón, el género predominante fue *Penicillium* con 121 cultivos aislados (62,96%), seguido por *Aspergillus* con 31 aislados (16,13%) y *Cladosporium* con 29 aislados (15,09%). Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios en los que el género mayoritario encontrado fue *Aspergillus* seguido por *Penicillium* (Cantoni y col., 1977; Huerta y col., 1987). Por otro lado, otros autores como Battilani y col. (2007) aislaron el género *Penicillium* como predominante en los 7 secaderos que investigaron, oscilando su frecuencia de aislamiento entre el 38% y el 90%, mientras que el género *Aspergillus* no fue aislado a partir de muestras de jamón. En menor frecuencia se aislaron hongos de los géneros *Byssochlamys* (3,12%) *Trichoderma* (2,08%) y *Alternaria* (0,29%) con 6, 4 y 1 aislados, respectivamente. Las cepas de *Penicillium* se aislaron en su mayor parte de S2 (88 colonias, 72% del total), habiéndose aislado el 50% de éstos en la etapa de secado. Por otro lado, las cepas de *Aspergillus* se aislaron en su mayor parte de S1 (23 colonias, 75% del total),

habiéndose aislado el 100% de éstos en la etapa de secado natural. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios en los que identificaron el género *Penicillium* como mayoritario en las etapas iniciales, desde postsalado hasta mitad de bodega, y el género *Aspergillus* como mayoritario al final de la maduración (Leistner y Rödel, 1975; Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996; Pitt y Hocking, 1985). No obstante, *Penicillium* es el género predominante durante todo el procesado, tanto en las etapas iniciales como en las finales, lo que difiere de los resultados obtenidos en dichos estudios. No se encontraron diferencias entre ambos secaderos en lo que respecta a la frecuencia de aislados de *Cladosporium*, al haberse aislado 15 (51%) y 14 (49%) colonias de S1 y S2, respectivamente (Figura 21).

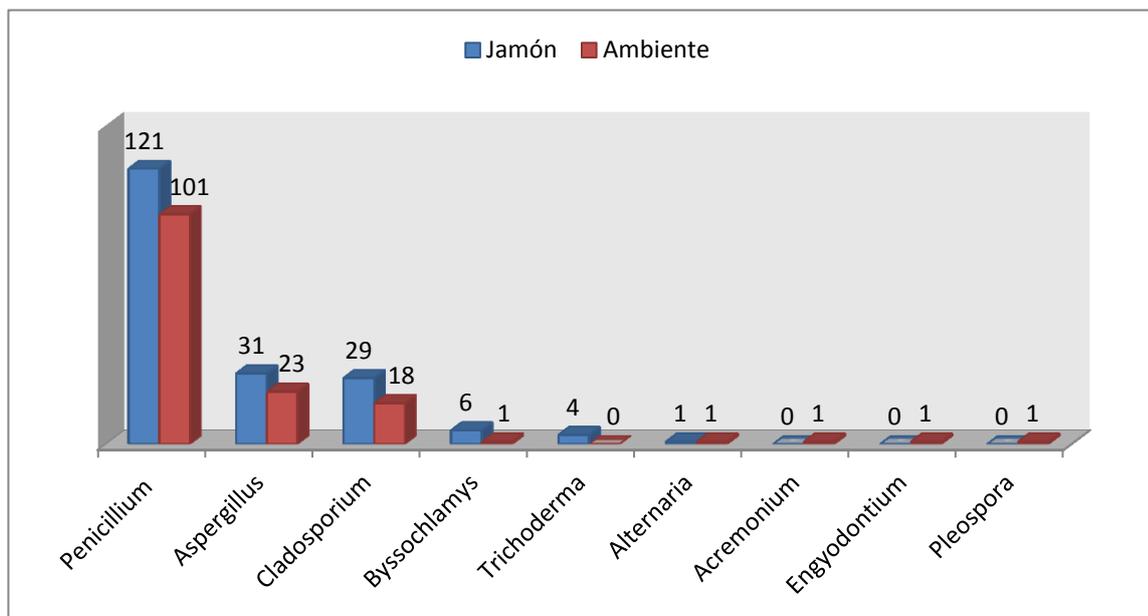


Figura 21. Representación de los distintos géneros fúngicos aislados en jamón y ambiente en ambos secaderos.

En las muestras procedentes de ambiente, el género predominante fue *Penicillium* con 101 cultivos aislados (68,85%), seguido por *Aspergillus* con 23 aislados (15,14%) y *Cladosporium* con 18 aislados (12,39%) (Tabla 13). Estos resultados coincidieron con los obtenidos en los estudios realizados por Battilani y col. (2007), Comi y col. (2004) y Spotti y col. (1988), en los que también se identificó como género predominante *Penicillium*. No obstante,

la frecuencia de aislamiento de *Penicillium* en dichos estudios fue todavía mayor, al ser ésta del 94% frente al 69% obtenido en el presente trabajo. En menor frecuencia se aislaron hongos de los géneros *Acremonium* (0,68%), *Alternaria* (0,68%), *Byssochlamys* (0,68%), *Engyodontium* (0,68%) y *Pleospora* (0,68%), todos ellos con 1 aislado. De los géneros mencionados, *Alternaria* se había aislado de forma esporádica en distintos tipos de jamones con anterioridad (Huerta y col., 1987; Rojas y col., 1991).

Respecto a los aislamientos de *Penicillium*, es necesario señalar que se aislaron cepas de *Penicillium* en proporción muy similar en ambos secaderos (43 colonias en S1 (42%) y 58 colonias en S2 (58%)). Sin embargo, si se tiene en cuenta la etapa de procesado sí que se pueden establecer diferencias entre ambos secaderos. En el caso de S2 se aisló *Penicillium* en todas las etapas (25 colonias (43%) en postsalado, 11 (19%) en secado y 22 (38%) en maduración en bodega) mientras que, en S1, el 90% de los aislados de *Penicillium* (39 colonias) procedieron de las últimas etapas (maduración y secado natural). Estos datos se correlacionan con los observados por Battilani y col. (2007), donde se demuestra que el aumento progresivo de la temperatura a lo largo del ciclo productivo favorece el crecimiento de *Penicillium* en el ambiente, por lo que su frecuencia de aislamiento es también mayor en las últimas etapas del procesado. Los aislados de *Aspergillus* procedieron en su mayor parte de S1 (16 colonias, 79%). En lo que respecta a los aislados de *Cladosporium*, el 41% del total se obtuvo de S1 y el 59% del total de S2 (8 y 10 colonias respectivamente).

Cabe destacar que, al igual que en otros trabajos realizados con anterioridad, en los géneros mayoritarios existe una correlación entre la frecuencia de aislamiento obtenida a partir del ambiente y la obtenida a partir de las muestras de jamón (Battilani y col., 2007; Comi y col., 2004; Huerta y col., 1987). Así, las elevadas frecuencias de aislamiento obtenidas para los géneros *Penicillium* (69%), *Cladosporium* (12%) y *Aspergillus* (9,5%) en ambiente se corresponden también con elevados porcentajes de aislamiento en jamón 63%, 15% y 16%, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que la colonización fúngica de los jamones

viene determinada por los hongos presentes en el ambiente de las cámaras. Este fenómeno fue previamente descrito en los trabajos de Huerta y col. (1987) y Núñez y col. (1996). Por ello, es de gran importancia el control del ambiente de las cámaras de procesado, ya que la micoflora presente en las mismas va a condicionar su calidad sensorial así como la posible contaminación por hongos potencialmente toxigénicos en el producto. En el caso de los géneros minoritarios como *Byssochlamys*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Engyodontium* y *Pleospora*, no se observó dicha relación entre las frecuencias de aislamiento de las muestras de jamón y ambiente.

III.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS AISLADOS

III.1.3.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *PENICILLIUM* MEDIANTE ap-PCR

Las 221 cepas de *Penicillium* aisladas en las muestras de jamón y ambiente de ambos secaderos se caracterizaron molecularmente mediante la amplificación arbitraria de fragmentos del ADN genómico utilizando los siguientes cebadores específicos: [(GAC)₅], [(GACA)₄] y [(GACAG)₃] (véase apartado II.6. de Material y Métodos). La utilización de dichos cebadores proporcionó entre 3 y 10 productos de amplificación, con un tamaño que oscilaba entre 100 pb y 1500 pb (Tabla 14). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez-Culebras y col. (2009) y Schena y col. (1999) en los cuales obtuvieron productos de amplificación de características similares empleando dichos cebadores para tipificar hongos del género *Aspergillus* y *Aureobasidium*. En algunos casos, los productos obtenidos dieron como resultado distintos patrones de bandas dependiendo del cebador empleado (Figura 22). La Tabla 15 muestra los patrones de bandas obtenidos para cada uno de los cebadores. Tal y como puede observarse, se obtuvieron 8 patrones de bandas para el cebador [(GAC)₅], 19 patrones de bandas para el cebador [(GACA)₄] y 20 patrones de bandas para el cebador

[(GACAG)₃]. Sin embargo, el 42,2% de las cepas estudiadas mostraron un patrón de bandas único.

Tabla 14. Tamaño de los fragmentos de amplificación por ap-PCR obtenidos con cada uno de los cebadores utilizados : [(GAC)₅], [(GACA)₄] y [(GACAG)₃].

Patrón	Productos de amplificación (pb)
GAC-1	250+300+350+375+600+650+700+800+850+900
GAC-2	250+300+600+650+700+850+875
GAC-3	250+300+650+700+975+1000
GAC-4	250+500+650+850+875
GAC-5	250+300+400+500+850+900+110
GAC-6	250+300+400+600+900
GAC-7	250+300+400+600+650+700+900+950
GAC-8	250+300+500+600+650+850+875+900
GACA-1	500+650+800+850+875+900+1000+1100+1200
GACA-2	700+800+850+900+1000
GACA-3	650+700+750+800+900+950
GACA-4	250+300+350+500+600+700+850
GACA-5	400+500+600+700+800+1000+1100
GACA-6	450+550+800
GACA-7	800+950+1050+1075+1150
GACA-8	700+850+900+975+1000+1100
GACA-9	900+1050+1200+1250
GACA-10	250+350+450+500+600+800+900+1000
GACA-11	250+300+350+550+650+850+1000
GACA-12	550+650+750+850+975+1050
GACA-13	450+500+700+800+900+1050
GACA-14	350+550+700+850+900+1050+1100+1300
GACA-15	300+500+550+900+1000+1100+1200+1350
GACA-16	250+500+600+700+800
GACA-17	500+600+900+1000+1150+1200+1300+1350
GACA-18	400+500+900+1000+1100+1200+1300+1500
GACA-19	250+400+500+800+900
GACAG-1	300+500+550+600+700+750+950
GACAG-2	400+500+700+750+1000+1100
GACAG-3	350+700+900+1000+1100
GACAG-4	350+375+400+500+600+700+800+900
GACAG-5	500+700+850+900
GACAG-6	300+350+450+500+600+750+1100
GACAG-7	500+600+700+800+900+1100
GACAG-8	400+450+600+650+1000
GACAG-9	350+400+500+600+700+800
GACAG-10	400+500+600+650+800+900+1000
GACAG-11	250+350+450+500+600+700+800+950
GACAG-12	100+200+300+400+600
GACAG-13	200+250+350+450+600+750
GACAG-14	400+500+600+750+850+900+1000
GACAG-15	200+300+400+500+600+750+850+900
GACAG-16	300+500+600+800+900
GACAG-17	400+500+550+600+700+1100+1150+1200
GACAG-18	300+350+600+700+800+1000
GACAG-19	300+500+600+650+700+1000
GACAG-20	700+800+850+900+1300

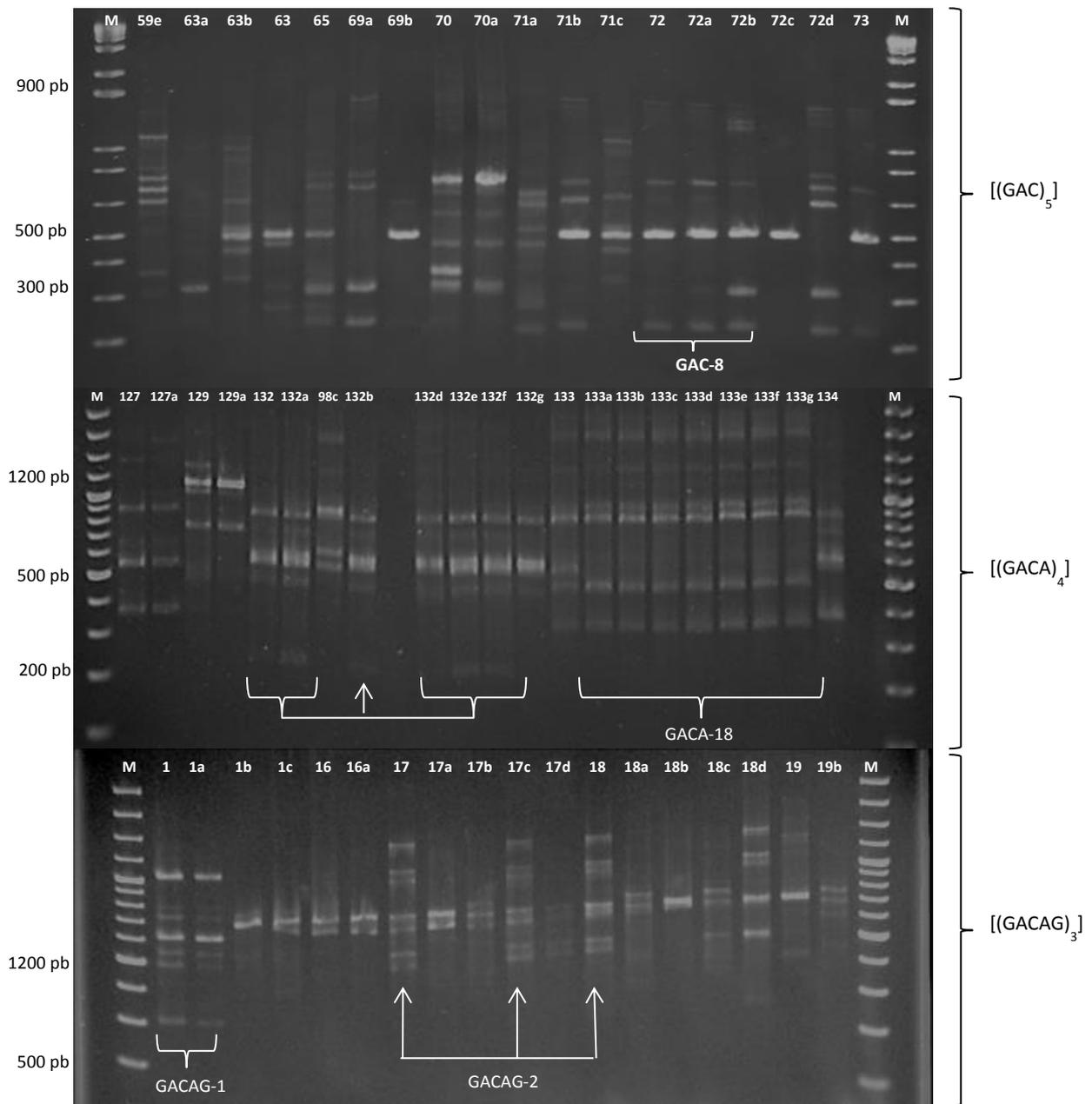


Figura 22. Patrones de bandas obtenidos tras la amplificación de ADN genómico de las cepas mediante los cebadores específicos $[(GAC)_5]$, $[(GACA)_4]$ y $[(GACAG)_3]$. Los carriles M se corresponden con el marcador de pesos moleculares (GenRuler™ 100 bp Plus Dna Ladder). Las cepas 72, 72a, y 72b dieron lugar al mismo patrón de bandas con el cebador $[(GAC)_5]$, las cepas 133, 133a, 133b, 133c, 133d, 133e, 133f y 133g y las cepas 132, 132a, 132b, 132d, 132e y 132f presentaron el mismo patrón con el cebador $[(GACA)_4]$ y las cepas 1 y 1a y las cepas 17, 17c y 18 dieron lugar al mismo patrón de bandas con el cebador $[(GACAG)_3]$ (Tabla 15).

Tabla 15. Patrones de bandas obtenidos con cada uno de los cebadores específicos empleados en la caracterización molecular de las cepas de *Penicillium* aisladas: [(GAC)₅], [(GACA)₄] Y [(GACAG)₃]. Las cepas seleccionadas para secuenciar se encuentran resaltadas en rojo. El tamaño de los fragmentos de amplificación que componen cada patrón se indica en la Tabla 14.

Patrón	Cepas
GAC-1	H09-17c, H09-7101/12/2014 H09-76c, H09-83a, H09-89, H09-90, H09-97
GAC-2	H09-98d, H09-99 , H09-100a, H09-101d, H09-102 , H09-103c, H09-103d
GAC-3	H09-44, H09-70b, H09-75 , H09-75a, H09-75b, H09-75d, H09-75e, H09-75g, H09-75h
GAC-4	H09-42, H09-42a, H09-46, H09-48a, H09-48b, H09-48c, H09-98a, H09-98b
GAC-5	H09-22b, H09-22c, H09-22d, H09-22e, H09-22f, H09-22g, H09-22h
GAC-6	H09-23b, H09-23c, H09-23d, H09-58, H09-58a, H09-58e, H09-58f, H09-59d, H09-96, H09-96a
GAC-7	H09-24a, H09-25 , H09-49, H09-54 , H09-54a, H09-54b, H09-54c, H09-76b, H09-76g, H09-82, H09-83, H09-88, H09-91, H09-93, H09-100 , H09-101a
GAC-8	H09-72 , H09-72a, H09-72b, H09-80 , H09-133, H09-133a, H09-133b, H09-133d, H09-133e, H09-133f, H09-133g
GACA-1	H09-1b, H09-17, H09-17a, H09-18, H09-33
GACA-2	H09-22a, H09-22b, H09-22c, H09-22d, H09-22e, H09-22f, H09-22g, H09-22h
GACA-3	H09-23b, H09-23c, H09-80, H09-92
GACA-4	H09-48b, H09-48c, H09-100a
GACA-5	H09-49, H09-54 , H09-54a, H09-54b, H09-54c
GACA-6	H09-56, H09-58, H09-58a
GACA-7	H09-28 , H09-28a, H09-31, H09-31a, H09-58c, H09-58e, H09-58f, H09-59 , H09-59a
GACA-8	H09-30 , H09-30a
GACA-9	H09-35, H09-36, H09-39 , H09-42a, H09-46
GACA-10	H09-48d, H09-55
GACA-11	H09-75h, H09-76b, H09-76e, H09-76h, H09-83a, H09-89, H09-97
GACA-12	98a, H09-98b
GACA-13	H09-101c, H09-101d
GACA-14	H09-104 , H09-104d, H09-104e, H09-104g, H09-104h, H09-104i, H09-104j
GACA-15	H09-104l, H09-104m, H09-108, H09-108a
GACA-16	H09-126 , H09-126a
GACA-17	H09-113, H09-122
GACA-18	H09-133, H09-133a, H09-133b, H09-133c, H09-133d, H09-133e, H09-133f, H09-133g
GACA-19	H09-132, H09-132a, H09-132b, H09-132d, H09-132e, H09-132f
GACAG-1	H09-1 , H09-1a
GACAG-2	H09-17, H09-17c, H09-18
GACAG-3	H09-22b, H09-22c, H09-22d, H09-22e, H09-22f, H09-22g, H09-22h
GACAG-4	H09-23b, H09-23c, H09-23d, H09-24a
GACAG-5	H09-28 , H09-28 ^a
GACAG-6	H09-30 , H09-30a
GACAG-7	H09-38, H09-39 , 42, H09-42a
GACAG-8	H09-54 , H09-54a, H09-54b, H09-54c
GACAG-9	H09-58e, H09-58f, H09-59d
GACAG-10	H09-71b, H09-73
GACAG-11	H09-72 , H09-72a
GACAG-12	H09-88, H09-91
GACAG-13	H09-76b, H09-76g

Patrón	Cepas
GACAG-14	H09-98a, H09-98b
GACAG-15	H09-98d, H09-99
GACAG-16	H09-101, H09-101b, H09-101d
GACAG-17	H09-104, H09-104b, H09-104c, H09-104d, H09-104e, H09-104g, H09-104h, H09-104i, H09-104j, H09-104k, H09-104l, 104m, H09-108, H09-108a
GACAG-18	H09-126, H09-126a
GACAG-19	H09-132, H09-132a, H09-132b, H09-132d, H09-132e, H09-132f, H09-132g
GACAG-20	H09-133, H09-133a, H09-133b, H09-133c, H09-133d, H09-133e, H09-133f, H09-133g

La selección de cepas de *Penicillium* a secuenciar se llevó a cabo atendiendo a las características morfológicas y a los diferentes patrones de ap-PCR obtenidos para los tres cebadores específicos empleados. De todos aquellos grupos de cepas que presentaron patrones distintos con estos marcadores, se seleccionó una cepa como representante (Tabla 15). Por otra parte, con el fin de comprobar si las cepas que presentaron los mismos patrones moleculares tenían también la misma secuencia ITS-5,8S del ADN ribosomal, de los grupos más numerosos se secuenció más de una cepa, procurando que éstas tuviesen distintos orígenes (jamón o ambiente; S1 o S2) y que presentaran ligeras diferencias en sus características morfológicas. Asimismo, también se seleccionaron para secuenciar cepas que no presentaron un patrón de bandas idéntico a ninguna otra cepa.

III.1.3.2. SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 5.8S-ITS DEL ADN RIBOSOMAL

Con el fin de llevar a cabo una identificación de los hongos más precisa, nos planteamos analizar las secuencias ITS-5,8S del ADN ribosomal (véase apartado II.7. de Material y Métodos). Del total de las 338 cepas aisladas, se seleccionaron 74 cepas para secuenciar utilizando como criterios la variabilidad morfológica y molecular. De las 74 cepas secuenciadas, 59 fueron cepas de *Penicillium* y 15 de otros géneros. El análisis electroforético de los productos de la amplificación reveló la presencia de una única banda de

aproximadamente 650 pb (Figura 23). El tamaño de esta banda fue igual en todas las cepas analizadas.

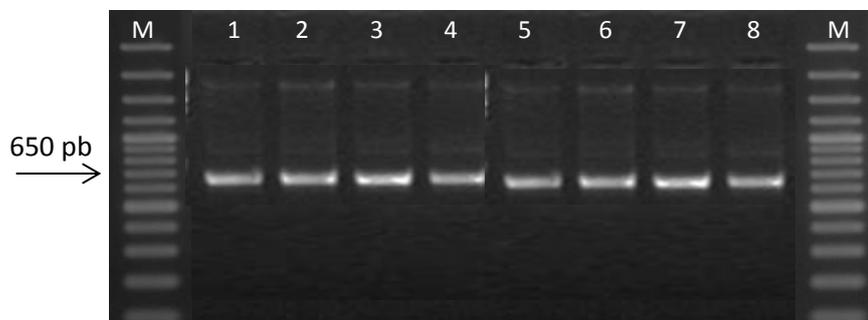


Figura 23. Gel de agarosa con marcador de pares de bases (M; GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder) y bandas de ADN fúngico amplificado (carriles 1 – 8).

Tabla 16. Identificación molecular de las cepas mediante secuenciación de la región 5,8S-ITS.

Especie	Nº Cepas	Código de cepa	OTA	CPA	Procedencia ¹	Nº EMBL ²	Tamaño ³	
<i>Alternaria alternata</i>	1	H09-10			Ambiente (M; S1)	KC009771	522	
<i>Alternaria tenuissima</i>	1	H09-9			Ambiente (M; S1)	KC009770	529	
<i>Aspergillus ruber</i>	1	H09-29			Jamón (M; S1)	KC009779	468	
<i>Aspergillus niveoglaucum</i>	1	H09-47			Jamón (M; S1)	KC009789	554	
<i>Aspergillus repens</i>	1	H09-78			Ambiente (P, S2)	KC009799	509	
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	2	H09-8			Ambiente (P, S1)	KC009769	563	
		H09-43			Jamón (M; S1)	KC009788	588	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	H09-5			Ambiente (M; S1)	KC009766	444	
		H09-128			Jamón (S; S2)	KC009834	498	
		H09-131			Jamón (M; S2)	KC009837	513	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	H09-130			Jamón (P; S2)	KC009836	493	
<i>Engyodontium album</i>	1	H09-77			Ambiente (M; S2)	KC009798	490	
<i>Penicillium atramentosum</i>	1	H09-86		+	Jamón (M; S2)	KC009803	531	
<i>Penicillium atroveteum</i>	1	H09-2		+	Ambiente (M; S1)	KC009765	484	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	H09-75			Ambiente (S; S2)	KC009596	568	
<i>Penicillium carneum</i>	1	H09-106		+	Jamón (M; S2)	KC009821	609	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	13	H09-13			Ambiente (M; S1)	KC009772	553	
		H09-16			Ambiente (M; S1)	KC009773	610	
		H09-22			Ambiente (P, S1)	KC009774	610	
		H09-24			Ambiente (M; S1)	KC009775	551	
		H09-25			Ambiente (M; S1)	KC009776	552	
		H09-35			+	Jamón (S; S1)	KC009783	484
		H09-52		+		Jamón (S; S1)	KC009790	549
		H09-82			+	Ambiente (S; S2)	KC009801	544
		H09-100			+	Jamón (M; S2)	KC009815	601
		H09-107				Jamón (P; S2)	KC009822	549

Especie	Nº Cepas	Código de cepa	OTA	CPA	Procedencia ¹	Nº EMBL ²	Tamaño ³			
<i>Penicillium commune</i>	24	H09-109		+	Jamón (M; S2)	KC009823	544			
		H09-114			Jamón (P; S2)	KC009826	613			
		H09-116				Jamón (S; S2)	KC009827	465		
		H09-1				Ambiente (M; S1)	KC009764	587		
		H09-6				Ambiente (M; S1)	KC009767	484		
		H09-27			+	Jamón (M; S1)	KC009777	548		
		H09-28				Jamón (S, S1)	KC009778	587		
		H09-37			+	Jamón (S; S1)	KC009785	551		
		H09-38				Jamón (M; S1)	KC009786	549		
		H09-39			+	+	Jamón (M; S1)	KC009787	549	
		H09-72			+		Ambiente (M; S2)	KC009793	541	
		H09-73				+	Ambiente (P; S2)	KC009794	536	
		H09-80				+	Ambiente (S; S2)	KC009800	588	
		H09-83				+	Ambiente (M; S2)	KC009802	574	
		H09-89					Jamón (S; S2)	KC009806	547	
		H09-90				+	+	Jamón (M; S2)	KC009807	546
		H09-92					+	Jamón (S; S2)	KC009809	537
		H09-93					+	Jamón (M; S2)	KC009810	536
		H09-97						Jamón (S; S2)	KC009812	613
		H09-99				+	+	Jamón (M; S2)	KC009814	613
		H09-101						Jamón (S; S2)	KC009816	613
		H09-102					+	Jamón (S; S2)	KC009817	611
		H09-103					+	Jamón (M; S2)	KC009818	613
		H09-104					+	Jamón (S; S2)	KC009819	613
H09-118						Jamón (S; S2)	KC009828	603		
H09-122				+	+	Jamón (S; S2)	KC009831	604		
H09-127					+	Jamón (S; S2)	KC009833	613		
<i>Penicillium echinulatum</i>	1	H09-34			+	Jamón (M; S1)	KC009782	552		
<i>Penicillium expansum</i>	1	H09-87				Jamón (M; S2)	KC009804	539		
<i>Penicillium glabrum</i>	1	H09-36				Jamón (S; S1)	KC009784	540		
<i>Penicillium italicum</i>	1	H09-129				Jamón (M; S2)	KC009835	550		
<i>Penicillium lanosum</i>	1	H09-74			+	Ambiente (M; S2)	KC009795	433		
<i>Penicillium nalgiovense</i>	3	H09-30				Jamón (M; S1)	KC009780	485		
		H09-54				Jamón (M; S1)	KC009791	565		
		H09-76				Ambiente (S; S2)	KC009797	485		
<i>Penicillium polonicum</i>	5	H09-33				Jamón (M; S1)	KC009781	537		
		H09-88				Jamón (S; S2)	KC009805	436		
		H09-91					Jamón (S; S2)	KC009808	544	
		H09-98				+	+	Jamón (M; S2)	KC009813	503
		H09-112				+	+	Jamón (S; S2)	KC009824	604
<i>Penicillium solitum</i>	1	H09-113			+	Jamón (S; S2)	KC009825	475		
<i>Penicillium sumatrense</i>	1	H09-59				Ambiente (S; S2)	KC009792	442		
<i>Penicillium verrucosum</i>	3	H09-120			+	Jamón (S; S2)	KC009829	611		
		H09-121			+	Jamón (M; S2)	KC009830	611		
		H09-126			+	+	Jamón (M; S2)	KC009832	586	

Especie	Nº Cepas	Código de cepa	OTA	CPA	Procedencia ¹	Nº EMBL ²	Tamaño ³
<i>Pleospora herbarum</i>	1	H09-7			Ambiente (P, S1)	KC009768	536
<i>Trichoderma citrinoviridae</i>	1	H09-105			Jamón (M; S2)	KC009820	764
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	H09-95			Jamón (M; S2)	KC009811	837

¹Procedencia: Postsalado (P), Secado (S), Maduración (M), Secadero 1 (S1), Secadero 2 (S2)

²Número de acceso del GenBank a la secuencia de la región 5,8S-ITS

³Tamaño de la secuencia expresado en pares de bases (pb)

Dentro del género *Penicillium*, se identificaron un total de 16 especies diferentes. La especie predominante fue *Penicillium commune* (24 cepas, 32,43%) seguida de *Penicillium chrysogenum* (13 cepas, 17,57%) (Tabla 16, Figura 24). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos en los que también aislaron *P. commune* y *P. chrysogenum* como especies predominantes en diversos productos cárnicos curados (Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996; Rodríguez y col., 1998; López-Díaz y col., 2001; Sørensen y col., 2008). Sin embargo, difieren en parte con otros estudios en los que además de identificar como predominantes las especies *P. commune* y *P. chrysogenum*, identificaron como mayoritarios *Penicillium expansum* (Núñez y col., 1996), *Penicillium frequentans*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium lanoso-coeruleum* y *Penicillium lanoso-griseum* (Comi y col., 2004). También difieren con los resultados de otros estudios, donde *Penicillium nalgiovense* fue la especie con mayor número de aislamientos (Battilani y col. 2007, Asefa y col., 2009; Samson y col., 2004a; Samson y Frisvad, 2004). Por el contrario, únicamente el 4,05% de las cepas aisladas en el presente trabajo pertenecieron a dicha especie. Respecto a la procedencia de las especies mayoritarias, *P. commune* se aisló principalmente en la superficie del producto (Figura 25). Este hecho es más evidente en el S2 donde se obtuvieron frecuencias de aislamiento de 37,5% y 16,67% a partir de las muestras de secado y maduración del jamón, respectivamente, mientras que las frecuencias de aislamiento obtenidas a partir del ambiente de postsalado, secado y maduración fueron de 4,17%, 4,17% y 8,33%, respectivamente. Sin embargo, no se detectaron grandes diferencias entre las frecuencias de aislamiento de *P. chrysogenum* obtenidas en ambos tipos de muestras. Así, el 43,95% de las cepas se aislaron en el ambiente y el 53,83% se

aislaron a partir de la superficie del producto (Figura 25). Además de estas dos especies de *Penicillium* predominantes, también se aislaron cepas pertenecientes a las siguientes especies de *Penicillium*: *Penicillium atramentosum* (1 cepa), *Penicillium atroveteum* (1 cepa), *Penicillium brevicompactum* (1 cepa), *Penicillium carneum* (1 cepa), , *Penicillium echinulatum* (1 cepa), *Penicillium expansum* (1 cepa), *Penicillium glabrum* (1 cepa), *Penicillium italicum* (1 cepa), *Penicillium lanosum* (1 cepa), *Penicillium nalgiovense* (3 cepas), *Penicillium polonicum* (5 cepas), *Penicillium solitum* (1 cepa), *Penicillium sumatrense* (1 cepa) y *Penicillium verrucosum* (3 cepas). En este sentido, diversos trabajos aislaron como especies mayoritarias en jamón curado *P. nalgiovense*, *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Asefa y col., 2009; Battilani y col., 2007; Samson y col., 2004a; Samson y Frisvad 2004; Sonjak y col., 2011). Sin embargo, en nuestro estudio no se aislaron cepas de *P. nordicum*.

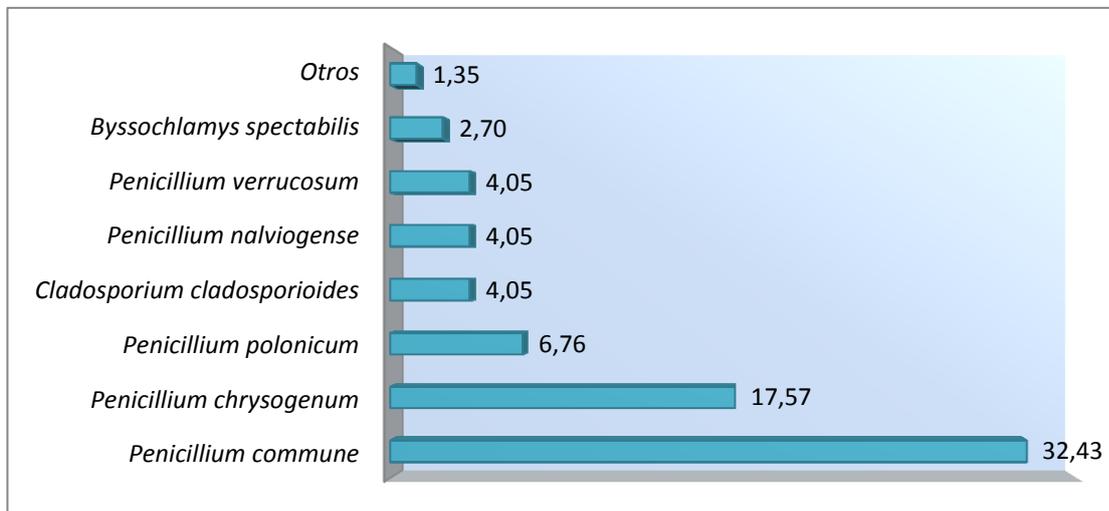


Figura 24. Frecuencias de aislamiento (%) de las principales especies identificadas

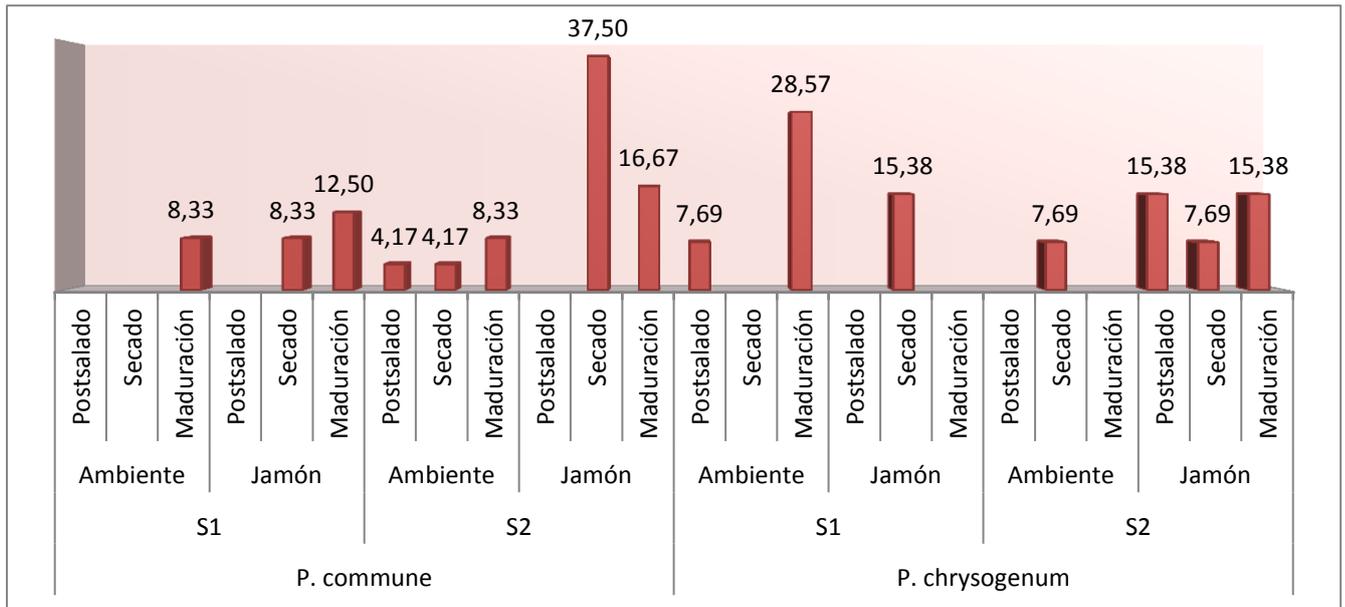


Figura 25. Frecuencias de aislamiento (%) de las especies mayoritarias identificadas en cada etapa.

III.2. ANALISIS FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS DE *PENICILLIUM*

Puesto que la mayor parte de los hongos aislados fueron cepas pertenecientes al género *Penicillium*, en este capítulo se ha fijado como objetivo profundizar en las relaciones taxonómicas entre las diferentes cepas de *Penicillium* aisladas en este trabajo.

III.2.1. ÁRBOL FILOGENÉTICO

Para realizar el estudio filogenético se agruparon aquellas cepas que presentaron secuencias idénticas de entre las 59 cepas de *Penicillium* secuenciadas. De este modo, se seleccionó una cepa representante de cada grupo de secuencias para incluirlas en el análisis filogenético, obteniendo un total de 31 cepas representativas. La Tabla 17 muestra las agrupaciones de cepas con idéntica secuencia 5,8S-ITS y la cepa representante de cada una de ellas. Así, las relaciones filogenéticas observadas para las cepas representativas fueron extrapolables al conjunto de cepas cuya secuencia resultó ser idéntica y que no están incluidas

en el árbol. Además, en el análisis se incluyeron 23 secuencias de *Penicillium* obtenidas de la base de datos del GenBank (véase apartado II.7.5. de Material y Métodos).

Tabla 17. Agrupación de cepas con secuencia 5,8S-ITS idéntica.

Cepa representante	Cepas de secuencia idéntica
H09-2	H09-75
H09-22	H09-116; H09-24; H09-16; H09-100; H09-82; H09-109; H09-114
H09-36	H09-59
H09-39	H09-34; H09-38; H09-104; H09-122; H09-92; H09-72; H09-73; H09-6
H09-80	H09-27; H09-93
H09-103	H09-89; H09-37; H09-127; H09-118; H09-101; H09-28; H09-97; H09-102

Las cepas resaltadas en rojo resultaron productoras de OTA, en azul productoras de CPA y en verde resultaron productoras de OTA y CPA.

El árbol obtenido mediante el método de “Neighbor-Joining” se muestra en la Figura 26. En él puede observarse el grado de similitud entre las secuencias ITS que presentan las diferentes cepas. Así, las cepas H09-39, H09-83, H09-33, H09-99, H09-120, H09-90, H09-80 y H09-126 presentaron secuencias idénticas y se agruparon con las cepas de referencia *P. commune* EF200099, *P. commune* AJ004813, *P. echinulatum* AB479316 y *P. camemberti* AJ004814. Sin embargo, aunque la cepa H09-121 se encontraba próxima filogenéticamente a dicha agrupación, presentó ligeras diferencias en sus secuencias. Como era lo esperado según la identificación molecular realizada, la cepa H09-121 resultó ser *P. verrucosum* KC009830 y se encontraba próxima filogenéticamente con la cepa de referencia *P. verrucosum* AB479317. Asimismo, los resultados obtenidos para las cepas H09-39, H09-83, H09-99, H09-90 y H09-80 eran de esperar ya que tras la identificación resultaron ser *P. commune* KC009787, *P. commune* KC009802, *P. commune* KC009814, *P. commune* KC009807 y *P. commune* KC009800, respectivamente, y todas ellas presentaron una homología del 100% en sus secuencias. Por otro lado, tal y como se observa en la Figura 26, las cepas H09-98 y H09-113 se emparejaron y se encontraban próximas filogenéticamente con las cepas H09-88, H09-112 y H09-91, las cuales presentaron secuencias ITS idénticas. Estos resultados eran los esperados ya que las

cepas H09-98, H09-88, H09-112 y H09-91 resultaron ser *P. polonicum* KC009813, *P. polonicum* KC009805, *P. polonicum* KC009824 y *P. polonicum* KC009808, respectivamente, y se agruparon con la cepa de referencia *P. polonicum* GU566221. Sin embargo, la cepa de referencia *P. viridicatum* AJ005482 también presentó idéntica secuencia que dicha agrupación. En este sentido, la revisión taxonómica realizada por Frisvad y Samson (2004) clasifica a *P. polonicum* y *P. viridicatum* dentro de la misma serie dentro del subgénero *Penicillium* (sección *Viridicata*, serie *Viridicata*), por lo que este hecho podría justificar la proximidad filogenética observada en dichas cepas en este estudio. Del mismo modo, otra relación taxonómica representada es la existente entre las cepas H09-87 y H09-129, las cuales se emparejaron con un valor de “bootstrap” del 82% y se encontraban próximas filogenéticamente con la cepa H09-52. Asimismo, cabe señalar que las cepas H09-87 y H09-129 resultaron ser *P. expansum* KC009804 y *P. italicum* KC009835, respectivamente. A este respecto, Samson y col. (2004b) estudiaron las relaciones filogenéticas del subgénero *Penicillium* empleando la secuencia del gen que codifica la β -tubulina. Así, dicho estudio puso de manifiesto que ambas especies eran cercanas filogenéticamente, por lo que dicho hallazgo podría justificar la similitud filogenética observada en este trabajo entre *P. expansum* KC009804 y *P. italicum* KC009835. Asimismo, tal y como era de esperar, las cepas H09-30, H09-76 y H09-54, identificadas como *P. nalgiovense* KC009780, *P. nalgiovense* KC009797 y *P. nalgiovense* KC009791, respectivamente, presentaron secuencias idénticas y se agruparon con la cepa de referencia *P. nalgiovense* AJ004895. Sin embargo, la cepa H09-1, que resultó ser *P. commune* KC009764, presentó una homología del 100% con las secuencias de dicha agrupación. Por otro lado, tal y como se observa en la Figura 26, la cepa H09-103, identificada como *P. commune* KC009818, presentó una homología del 100% con las cepas de referencia *P. crustosum* EF634415 y *P. crustosum* X82361. A este respecto, es necesario señalar que *P. commune* y *P. crustosum* pertenecen a la serie *Camemberti* de la sección *Viridicata* dentro del subgénero *Penicillium*, por lo que este hecho podría justificar la homología observada en este estudio entre ambas cepas. Asimismo, otra

relación taxonómica observada es la existente entre las cepas H09-25, H09-22, H09-106 y H09-107. En este sentido, las cepas H09-25 y H09-22 presentaron secuencias idénticas y se identificaron como *P. chrysogenum* KC009776 y *P. chrysogenum* KC009774, respectivamente. Del mismo modo, las cepas H09-106 y H09-107 también presentaron una homología del 100% en sus secuencias. Sin embargo, tras la identificación la cepa H09-106 resultó ser *P. carneum* KC009821 y la cepa H09-107 se identificó como *P. chrysogenum* KC009822, pertenecientes según la clasificación taxonómica realizada por Frisvad y Samson (2004) a la sección *Roqueforti* y *Chrysogena* del subgénero *Penicillium*, respectivamente. Por otra parte, según lo esperado por los resultados obtenidos en la identificación molecular, la cepa H09-86 presentó idéntica secuencia ITS que la cepa de referencia *P. atramentosum* AF033483, con un valor de “bootstrap” significativo, es decir, superior al 75%. Asimismo, cabe destacar la cepa H09-74, identificada como *P. lanosum* KC009795, ya que fue completamente diferente del resto de secuencias y no se pudo agrupar con ninguna de ellas, por lo que sería necesario incluir en el análisis filogenético secuencias de diversas cepas de dicha especie. Del mismo modo, la Figura 26 muestra la relación filogenética existente entre la cepa H09-2, identificada como *P. atroveteum* KC009784, y la cepa de referencia *P. brevicompactum* EF634441. Sin embargo, aunque se emparejaron en el estudio, el valor de “bootstrap” de dicha agrupación no fue significativo. Finalmente, tal como cabía esperar la cepa H09-36, que resultó ser *P. glabrum* KC009784, se agrupó con la cepa de referencia *P. glabrum* GU372903 con un valor de “bootstrap” de 84%.

Como se mencionó previamente en la introducción, la taxonomía clásica divide el género *Penicillium* en cuatro subgéneros, entre los que se encuentra el subgénero *Penicillium* formado por hongos de morfología teverticilada. Así, todas las cepas incluidas en el árbol genealógico, a excepción de la cepa *P. canescens* AF034463, pertenecen a este subgénero, ya que a él pertenecen las especies productoras de OTA y CPA y la mayoría de las especies que colonizan los alimentos. En el análisis filogenético se observa la escasa divergencia existente entre

diferentes cepas, al encontrarse todas ellas muy próximas filogenéticamente. Cabe destacar que en el árbol existen cuatro agrupaciones en las que cepas de referencia pertenecientes a diferentes especies resultaron tener secuencias iguales y por ello aparecían emparejadas. Así, las cepas de referencia *P. echinulatum* AB479316, *P. camemberti* AJ004814, *P. commune* EF200099 y *P. commune* AJ004513; *P. polonicum* GU566221 y *P. viridicatum* AJ005482; *P. griseofulvum* GQ305305 y *P. granulatum* DQ681334 y *P. meleagrinum* EF198531 y *P. canescens* AF034463 presentaron las mismas secuencias. Este hecho reafirma la premisa realizada por Mossel (1983) en la que afirmaba que el género *Penicillium* presenta una verdadera complejidad taxonómica y dificultad en la identificación de sus especies. No obstante, hay que señalar que las especies *P. echinulatum*, *P. camemberti* y *P. commune* están clasificadas dentro de la misma sección dentro del subgénero *Penicillium* (sección *Viridicata*) y, concretamente, las especies *P. camemberti* y *P. commune* se incluyen dentro de la misma serie (serie *Camemberti*). De igual forma, también se encuentran próximas filogenéticamente las especies *P. polonicum* y *P. viridicatum*, al pertenecer ambas a la serie *Viridicata*. Este hecho podría justificar en cierto modo el que dichas cepas presenten las secuencias ITS1 e ITS2 iguales, y por ello aparezcan juntas en la misma agrupación. Así, para identificar aquellas cepas que no se resuelven bien con las regiones ITS, sería necesario secuenciar otras genes que presenten mayor especificidad y sí permitan diferenciar entre especies tan próximas filogenéticamente.

Por otro lado, como era de esperar ninguna cepa del análisis presentó homología con las cepas de referencia *P. meleagrinum* EF198531 y *P. canescens* AF034463. Éstas se incluyeron en el análisis filogenético debido a la elevada frecuencia de aislamiento, a partir de jamón y ambiente, que han presentado dichas especies en otros trabajos, como por ejemplo el realizado por Peintner y col. (2000). No obstante, en ningún caso se han aislado cepas pertenecientes a *P. meleagrinum* y *P. canescens* en el presente trabajo.

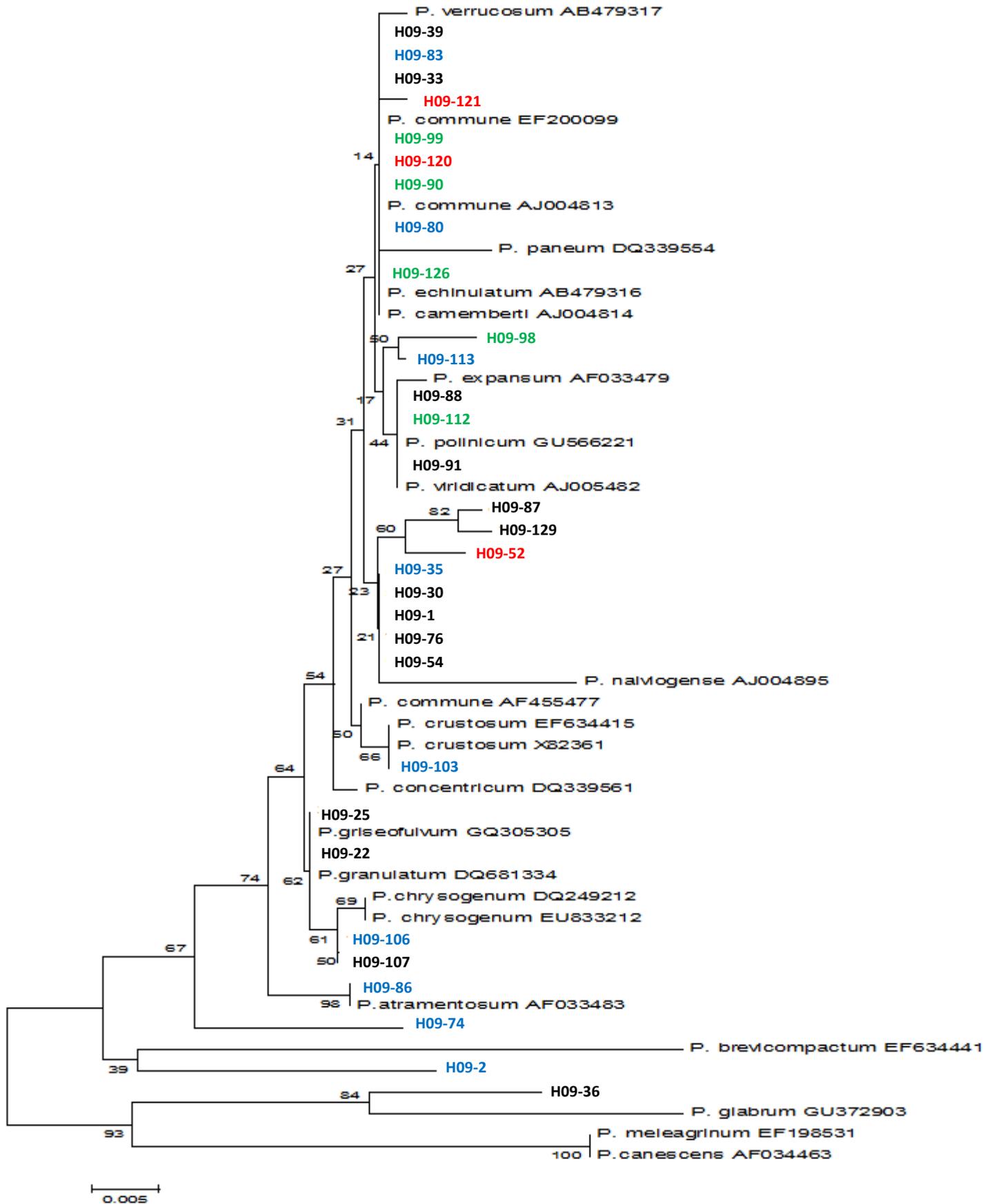


Figura 26. Árbol filogenético sin raíz obtenido mediante el método de "Neighbor Joining", utilizando el modelo de Jukes-Cantor para estimar las distancias. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que aparece la agrupación determinada al realizar el análisis por remuestreo de 1000 réplicas según el modelo de "bootstrap". En el árbol se incluyen las secuencias pertenecientes a las cepas utilizadas como referencia, así como las secuencias de las cepas de *Penicillium* identificadas a partir de las muestras de jamón y ambiente. Las cepas resaltadas en rojo resultaron productoras de OTA, resaltadas en azul productoras de CPA y resaltadas en verde resultaron productoras de OTA y CPA.

III.2.2. DENDROGRAMA

Debido a la escasa diversidad genética observada entre las secuencias 5,8S-ITS de algunas cepas de *Penicillium*, se realizó un estudio de los productos de amplificación resultantes de la caracterización molecular realizada de todas las cepas de *Penicillium* aisladas (véase apartado II.6.3. de Material y Métodos). Así, tal y como se ha descrito con anterioridad, se amplificó el ADN genómico de un total de 233 cepas de *Penicillium* mediante ap-PCR empleando los cebadores [(GAC)₅], [(GACA)₄] y [(GACAG)₃], 221 de las cuales se habían aislado en nuestro estudio y 12 se incluyeron como cepas de referencia. Como resultado de dicha reacción se obtuvieron un total de 3315 bandas, de las cuales el 100% fueron polimórficas para todas las cepas analizadas. La Figura 27 muestra el dendrograma resultante a dicho análisis, el cual muestra las relaciones genéticas entre todas las cepas de *Penicillium* que conformaron la población de estudio (véase Anexo). Tal y como puede observarse en dicha figura, el dendrograma puede ser dividido en 2 agrupamientos principales: grupo A y grupo B.

El grupo A está formado por el 97% del total de cepas incluidas en el análisis y puede subdividirse a su vez en dos subgrupos principales: A₁ y A₂. Respecto al primero de ellos, está formado por un total de 218 cepas pertenecientes a 16 especies diferentes de *Penicillium*. En este sentido, cabe señalar que la procedencia de aislamiento de cada una de las cepas que integraron este subgrupo fue diversa, ya que incluía cepas aisladas tanto en jamón como ambiente de los dos secaderos muestreados. Sin embargo, las agrupaciones de cepas genéticamente idénticas y entre cepas que presentaron un coeficiente de similitud genética elevado (superior a 0,75) estaban formadas todas ellas por cepas procedentes de la misma fuente de aislamiento. Así, las cepas H09-54, H09-54a, H09-54b y H09-54c, las cuales presentaron el mismo patrón de bandas con los tres cebadores empleados, se aislaron de la superficie del jamón durante la etapa de maduración en el S1 (Figura 28). También, las cepas H09-133a, H09-133, H09-133g y H09-133f se aislaron del jamón durante la etapa de maduración en el S2 y resultaron genéticamente idénticas. Del mismo modo, resultados

similares se observaron en las relaciones filogenéticas observadas entre las cepas H09-108b, H09-108 y H09-108a, las cuales procedían de la superficie del jamón durante la etapa de maduración del S2 y presentaron un coeficiente de similitud elevado (0,95) (Figura 29). Por ello, estos resultados podrían sugerir que la fuente de aislamiento de cada cepa tuvo correlación con las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de las agrupaciones con coeficientes de similitud genética superiores a 0,75. Sin embargo, cabe mencionar que dado que ninguna de las agrupaciones de cepas genéticamente idénticas estaba formada por cepas aisladas de ambiente y jamón dentro de la misma etapa en el mismo secadero, dicho hallazgo no apoyaría los resultados obtenidos en diversos estudios en los cuales concluyeron que la microbiota de la superficie del producto es consecuencia de la colonización de hongos presentes procedentes del ambiente de las cámaras de elaboración (Battilani y col., 2007; Comi y col., 2004). Por otro lado, algunas de las relaciones genéticas representadas en el dendrograma no sugirieron la existencia de ningún vínculo entre éstas y la clasificación taxonómica de las cepas. Así, las cepas H09-34 y H09-113, identificadas como *P. echinulatum* KC09782 y *P. solitum* KC009825, respectivamente, presentaron una elevada distancia genética, con un coeficiente de similitud genética de 0,129, a pesar de pertenecer ambas a la serie *Solita*, de la sección *Viridicata* dentro del subgénero *Penicillium*. Del mismo modo, las cepas H09-76a, H09-76b, H09-76c, H09-76d, H09-76e, H09-76f, H09-76g y H09-76h, clasificadas según sus características macroscópicas y microscópicas dentro de la misma serie del subgénero *Penicillium* (serie *Chrysogena*, sección *Chrysogena*), presentaron una escasa similitud genética. En cambio, cabe señalar que las agrupaciones observadas entre las cepas aisladas en el estudio y las cepas de referencia correspondieron, por lo general, con los resultados obtenidos en la identificación molecular. Así, las cepas H09-120 y H09-121, identificadas como *P. verrucosum* KC009829 y *P. verrucosum* KC009830, respectivamente, fueron genéticamente idénticas a las cepas de referencia *P. verrucosum* CBS 325.92 y *P. verrucosum* CBS 302.48, respectivamente. También, las cepas H09-104, identificada como *P.*

commune KC009819, y H09-114, identificada como *P. chrysogenum* KC009826, resultaron ser genéticamente idénticas a las cepas de referencia *P. commune* CBS 109822 y *P. chrysogenum* CECT 20753, respectivamente. Del mismo modo, la semejanza genética observada entre la cepa H09-87 y las cepas de referencia *P. expansum* CECT 2279 y *P. expansum* CECT 2278 era la esperada, ya que tras la identificación molecular la cepa H09-87 resultó pertenecer a la misma especie fúngica (*P. expansum* KC009804). De igual forma, se observaron relaciones similares entre la cepa H09-88, que resultó ser *P. polonicum* KC009805, y la cepa de referencia *P. polonicum* CBS 101479 las cuales presentaron un coeficiente de similitud genética elevado (0,769). Sin embargo, es necesario indicar que en el dendrograma apareció una agrupación en la que se observaba una elevada semejanza genética entre cepas de referencia pertenecientes a diferente especie. Así, las cepas de referencia *P. camemberti* CECT 2267 y *P. citrinum* CECT 20822 presentaron un coeficiente de similitud de 0,875. Respecto al subgrupo A₂, está formado por las cepas H09-55, H09-57 y H09-48d, las cuales presentaron un coeficiente de similitud genética reducido (0,351) respecto al subgrupo A₁. Asimismo, cabe señalar que las cepas que formaron dicho subgrupo presentaban diferente procedencia. Así, la cepa H09-57 se aisló del ambiente de la etapa de maduración de S2, la cepa H09-48d se aisló en jamón durante la etapa de secado de S1 y la cepa H09-55 procedía del jamón durante la etapa de maduración de S1. Sin embargo, la similitud genética observada entre ellas fue baja ya que presentaron un coeficiente de 0,309.

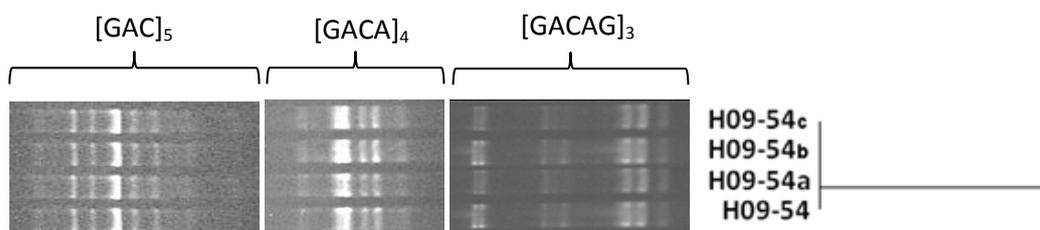


Figura 28. Patrones de bandas de ap-PCR obtenidos con [GAC]₅, [GACA]₄ y [GACAG]₃ a partir de las cepas H09-54, H09-54a, H09-54b y H09-54c. Las cepas presentaron los mismos patrones para los 3 cebadores empleados: patrón GAC-7 (cebador [GAC]₅), patrón GACA-5 (cebador [GACA]₄) y patrón GACAG-8 (cebador [GACAG]₃) y resultaron genéticamente idénticas en el análisis.

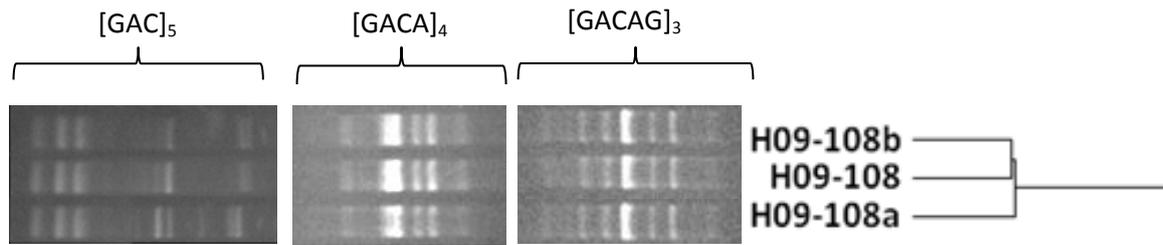


Figura 29. Patrones de bandas de ap-PCR obtenidos con $[GAC]_5$, $[GACA]_4$ y $[GACAG]_3$ a partir de las cepas H09-108b, H09-108 y H09-108a. Las cepas presentaron los mismos patrones para los cebadores $[GACA]_4$ (patrón GACA-15) y $[GACAG]_3$ (patrón GACAG-17) y resultaron genéticamente semejantes en el análisis, con un coeficiente de similitud de 0,95.

El grupo B está formado por un total de 6 cepas: H09-48, H09-48a, H09-48b, H09-48c, H09-19 y H09-19b (Figura 30). Tal y como puede observarse, dicho grupo presentó una divergencia genética elevada respecto al grupo A, ya que el coeficiente de similitud obtenido entre ambas agrupaciones fue de los más reducidos observados en el estudio (0,382). Respecto a las relaciones genéticas existentes entre las cepas del grupo B, destaca la observada entre las cepas H09-48c, H09-48b, H09-48a y H09-48 ya que resultaron genéticamente idénticas y fueron aisladas todas ellas de la misma fuente, concretamente de la superficie del jamón durante la etapa de secado de S1. Por ello, estos resultados concordarían con los observados en el grupo A ya que también podrían sugerir que la fuente de aislamiento de cada cepa tuvo correlación con las relaciones filogenéticas existentes en las agrupaciones con similitud genética elevada (coeficiente superior a 0,75). Sin embargo, aunque las cepas H09-19b y H09-19 también procedían de la misma fuente de aislamiento, la similitud genética observada en dicha agrupación fue reducida, con un coeficiente de 0,553.

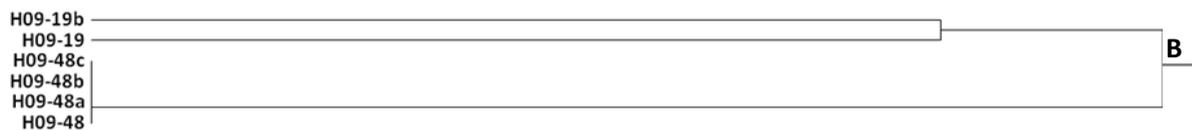


Figura 30. Agrupación B del dendrograma representado en la Figura 27.

Finalmente, cabe señalar que las relaciones filogenéticas observadas tras el análisis de la región 5,8S-ITS de las cepas no correspondieron con las observadas tras el estudio del ADN

genómico mediante ap-PCR. En este sentido, aquellas cepas que presentaron una homología del 100% en sus secuencias ITS mostraron escasa similitud genética tras la caracterización del ADN genómico. Así, por ejemplo las cepas H09-112 y H09-91 presentaron una homología en sus secuencias ITS del 100% pero mostraron una baja semejanza genética, con un coeficiente de similitud de 0,370. Del mismo modo, las cepas H09-25 y H09-22 presentaron secuencias ITS idénticas pero tras el estudio de su ADN genómico obtuvieron un coeficiente de similitud de 0,172. Por ello, al igual que los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias ITS, este hallazgo reafirma también la premisa realizada por Mossel (1983) en la que relata la verdadera dificultad taxonómica del género *Penicillium*, siendo en ocasiones necesario secuenciar otros genes que presenten mayor especificidad y permitan discernir entre especies genéticamente próximas. De igual forma, es necesario también destacar que las relaciones filogenéticas observadas en ambos análisis, representadas en el árbol filogenético y el dendrograma, no sugirieron la existencia de ninguna correlación entre el potencial toxigénico de las cepas y los resultados obtenidos tras el estudio genético. En este sentido, tal y como se observa en las Figuras 26 y 27 las cepas productoras de OTA y/o CPA, resaltadas en color rojo, verde y azul en ambas figuras, no formaron ninguna agrupación ni distribución aparente en dichos análisis.

III.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA *IN VITRO*

En este apartado se ha fijado como objetivo principal estudiar la capacidad de producir CPA y OTA *in vitro* de las cepas identificadas en el estudio. Para detectar y cuantificar la producción de CPA y OTA en medio de cultivo se realizaron análisis cromatográficos de 2 muestras de cada una de las 74 cepas secuenciadas, obtenidas al 14º y 21º día de incubación para el CPA y al 7º y 14º día de incubación para la OTA (véase apartado II.9.1. de Material y Métodos). Los resultados de la detección y cuantificación de CPA y OTA para cada una de las cepas productoras se muestran en la Tabla 18. En ella se indica el porcentaje de cepas productoras

de CPA, de OTA y de ambas micotoxinas por cada especie, intervalo de producción y valor medio de cada una, ambos expresados en $\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo.

II.3.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA *IN VITRO*

En la Figura 31 se muestra el cromatograma completo y el espectro de absorción de una muestra positiva a CPA. Tal y como se puede observar en el cromatograma, el pico de CPA apareció a un tiempo de retención de 9,6 minutos. Por otra parte, se puede observar el espectro característico del CPA que presenta dos picos máximos de absorción a una longitud de onda 279 nm.

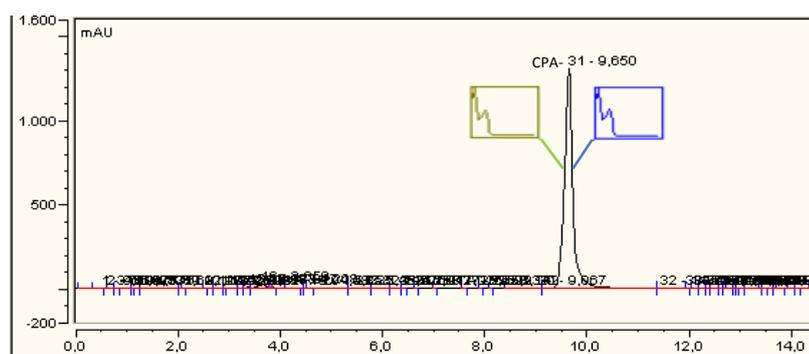


Figura 31. Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de CPA a 9,650 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 279 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con el CPA.

Tal y como se representa en la Figura 32 y la Tabla 18, un 37,84% de las 74 cepas analizadas (28 cepas) resultaron productoras de CPA, de las cuales 13 (46,43%) lo hicieron a los 14 días de incubación, 15 (53,57%) a los 21 días de incubación y 7 cepas (25%) produjeron la micotoxina indistintamente a los 14 y 21 días de incubación. Todas las cepas productoras de CPA pertenecían al género *Penicillium*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones en las que el género *Penicillium* fue la principal fuente de contaminación de CPA en jamón curado y otros productos cárnicos (Bailly y col., 2005; López-Díaz y col., 2001; Moldes-Anaya y col., 2009; Núñez y col., 2007; Soriano del Castillo, 2007). Del mismo modo, en

relación al tiempo necesario para producir CPA, algunas cepas dieron positivo a los 14 días de incubación pero posteriormente el análisis a los 21 días dio negativo, lo que podría sugerir una posible degradación del CPA en otros metabolitos. A este respecto, el trabajo realizado por Bailly y col. (2005) en el que evaluaron la estabilidad del CPA en el jamón curado contradice el resultado obtenido, ya que éste concluye que el CPA permanece estable durante más de 192 horas bajo temperaturas de entre 4 y 20°C. Del mismo modo, en otras cepas se detectó CPA en ambas extracciones (días 14 y 21) mientras que en otras se detectó CPA únicamente en la segunda extracción. Estos resultados difieren de los obtenidos por Finoli y col. (1999), donde la producción de CPA *in vitro* de todas las cepas de *Penicillium* estudiadas se produjo indistintamente a los 7, 14 y 30 días de incubación. Asimismo, tampoco se correlacionan con los resultados obtenidos por Sánchez y col. (2008) ya que en dicho estudio la producción de CPA *in vitro* se produjo tras 4 días de incubación. Finalmente, cabe señalar que el 78,57% (22 cepas) de las cepas que resultaron productoras de CPA *in vitro* se habían aislado de la superficie del jamón y que el 78,57% del total de cepas productoras procedía de S2.

En relación a las especies productoras de CPA, un total de 10 especies diferentes de *Penicillium* presentaron dicha capacidad: *P. commune*, *P. polonicum*, *P. verrucosum*, *P. echinulatum*, *P. solitum*, *P. atramentosum*, *P. chrysogenum*, *P. lanosum*, *P. atroveneteum* y *P. carneum* con un rango de producción de 0,11 a 5206,10 µg/g de medio de cultivo. Entre ellas, *P. commune* fue la especie con mayor capacidad para producir CPA en este estudio ya que el 62,5% de las cepas resultaron ser productoras, con un promedio de producción de 1168,28 µg/g de medio de cultivo y un valor máximo de producción de hasta 5206,10 µg/g de medio de cultivo. En este sentido, la capacidad de *P. commune* de producir CPA es sobradamente conocida y se ha sido puesto de manifiesto en múltiples trabajos (Andersen, 1995; Bullerman 1997; Finoli y col., 1999; Frisvad, 1986; Frisvad y Thrane, 1996; Gqaleni y col., 1996; Moldes-Anaya y col., 2009; Mantle, 1991; Moss, 1991; Núñez y col., 2007; Ostrý y Polster, 1989; Pitt, 1997; Polonelli y col., 1987; Sánchez y col., 2008; Soriano del Castillo, 2007). Así, kozlovsky y

col. (2014) demostraron la producción de esta micotoxina *in vitro* por parte de cepas de *P. commune* aisladas en salchichas ahumadas, alcanzando concentraciones de hasta 188 µg/g de medio de cultivo. Del mismo modo, López-Díaz y col. (2001) evaluaron la capacidad toxigénica de la biota fúngica presente en la superficie del chorizo de “Cantimpalos”, concluyendo que el 100% de las cepas de *P. commune* eran productoras de CPA *in vitro*. Resultados similares se obtuvieron en el estudio realizado por Sosa y col. (2002). En él evaluaron la capacidad de producción de CPA por cepas de *P. commune* aisladas en jamón curado y las condiciones necesarias para la síntesis de dicha micotoxina. En dicho estudio todas las cepas de *P. commune* aisladas fueron productoras de CPA y la mayor producción de la micotoxina se produjo en valores de 0,96 de a_w y 30°C de temperatura ambiente, condiciones que se reproducen durante la etapa de estufaje del jamón. Así, dada la elevada frecuencia de aislamiento de *P. commune* detectada en este trabajo (32,43% del total de aislados) y en múltiples estudios realizados en jamón y otros productos cárnicos (Bailly y col., 2005; López-Díaz y col., 2001; Moldes-Anaya y col., 2009; Núñez y col., 2007; Soriano del Castillo, 2007), estos resultados parecen indicar la existencia de un riesgo potencial de contaminación por CPA en dichos alimentos.

Aunque con menor número de cepas productoras que *P. commune*, otros aislados pertenecientes a las especies *P. polonicum*, *P. verrucosum*, *P. echinulatum*, *P. solitum* y *P. atramentosum* produjeron CPA con valores medios de 1818,81, 123,46, 66,31, 23,56 y 15,6 µg/g de medio de cultivo, respectivamente. En este sentido, no se han encontrado estudios en los que se describan estas especies como productoras. Entre las micotoxinas que pueden producir sí está demostrado que producen se encuentran: verrucosidina (*P. polonicum*), ocratoxina A (*P. verrucosum*), arisugacina A (*P. echinulatum*), viridicatol (*P. solitum*) y roquefortina C (*P. atramentosum*) (Frisvad y Filtenborg, 1983; Larsen y col., 2001; Núñez y col., 2000 y 2007). Del mismo modo, el 30,77% de los aislados de *P. chrysogenum* resultaron también ser productores de CPA en este estudio. En este sentido, El-Banna y col. (1987a y

1987b) relataron la capacidad de producir CPA por parte de *P. chrysogenum*. Sin embargo, posteriormente los estudios realizados por Cole y Scheweikert (2003) y Frisvad y col. (2004) concluyeron que la capacidad de producir CPA había sido asignada erróneamente a *P. chrysogenum* en dichos trabajos. En este sentido, la taxonomía del género *Penicillium* subgénero *Penicillium* se considera especialmente difícil y puede haber dado a errores en la identificación. Por ello, los trabajos que evalúan la capacidad toxigénica de especies pertenecientes a dicho subgénero pueden dar lugar también a resultados contradictorios. Así, dado que determinadas cepas de *P. chrysogenum* se emplean como cultivos iniciadores en diversos productos cárnicos, es necesario unificar y estandarizar las técnicas de identificación fúngica así como de extracción y determinación de micotoxinas. Por ello, aunque en este trabajo el nivel de producción de CPA fue relativamente bajo (3,8 µg/g de medio de cultivo), sería necesario profundizar en la identificación taxonómica de las cepas de *P. chrysogenum* productoras con el fin de confirmar la capacidad toxigénica.

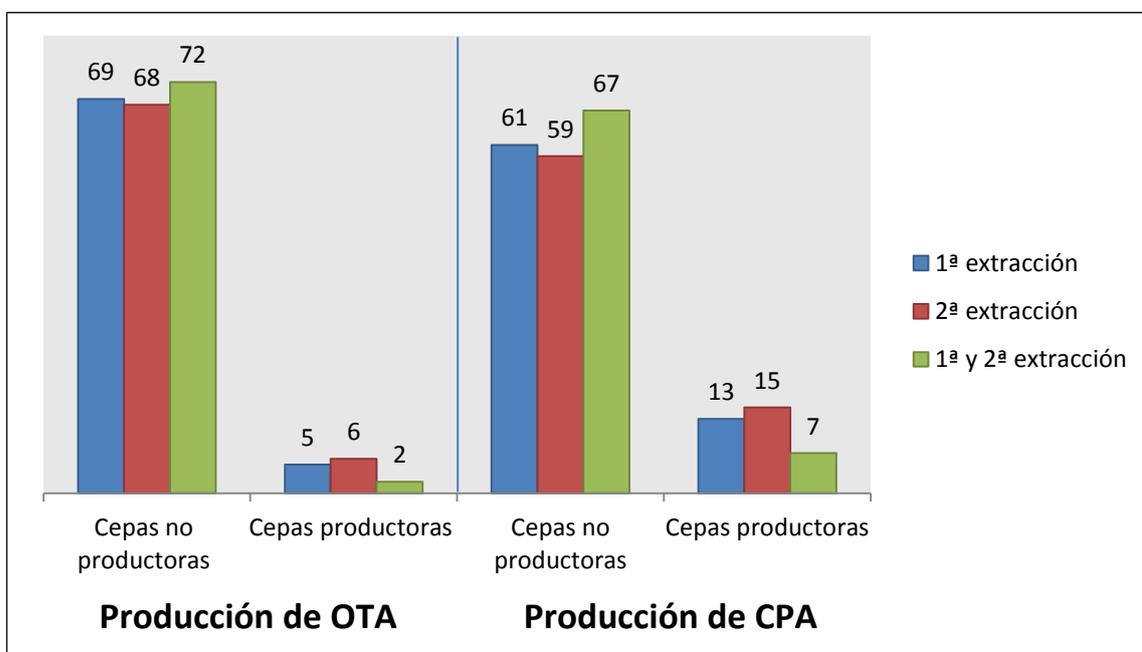


Figura 32. Cepas productoras de OTA y CPA entre las cepas representantes con 25 °C de incubación. Para la producción de OTA la 1ª y 2ª extracción corresponden con el 7º y 14º día de incubación, respectivamente, y para el CPA corresponden con el 14º y 21º día de incubación, respectivamente.

II.3.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OTA *IN VITRO*

En la Figura 33 se muestra el cromatograma completo y los espectros de fluorescencia y ultravioleta de una muestra positiva de OTA. Tal y como se puede observar en el cromatograma de fluorescencia, el pico de OTA apareció a un tiempo de retención de 4,392 minutos. Por otra parte, se puede observar espectro de ultravioleta característico de la OTA que presenta dos picos máximos de absorción a 231,6 nm y 332,3 nm. La detección mediante ultravioleta es menos sensible que la detección por fluorescencia, pero nos aporta la seguridad que el pico que estamos observando se corresponde con la sustancia analizada. Mediante este tipo de comprobación se pueden verificar aquellos picos de fluorescencia que pudieran presentar dudas y confirmar que se trata de OTA y no de otra sustancia que también produce fluorescencia a la misma longitud de onda.

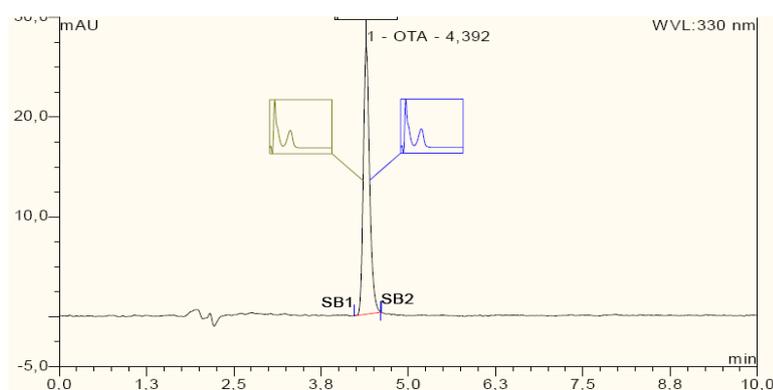


Figura 33. Cromatograma de una de las muestras inyectadas. Se observa un pico de OTA a 4,392 minutos. Se observan espectros de absorción característicos (longitud de onda de 330 nm), lo que confirma que dicho pico corresponde con la OTA.

Respecto a la producción de OTA, de las 74 cepas analizadas un 14,86% (11 cepas) resultaron productoras de OTA, de las cuales 6 (54,54%) lo hicieron a los 14 días de incubación, 5 (45,45%) a los 7 días, y 2 cepas (18,18%) producían OTA indistintamente a los 7 y 14 días de incubación, perteneciendo todas las cepas productoras de OTA al género *Penicillium* (Figura 32). Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Xinghong y col. (2006) en los que un

porcentaje de cepas ligeramente superior resultaron ser ocratoxigenicas . La identificación de cepas productoras de OTA en jamón y otros productos cárnicos también se ha descrito en otros trabajos (El-Kady y col., 1994; Núñez y col., 1996; Sosa y col., 2002; Spotti y col., 2001a; Wu y col., 1974). En relación al tiempo necesario para producir OTA, se detectó una variabilidad similar a la observada en la producción de CPA. Así, se dio el caso que algunas cepas produjeron OTA en el día 7, pero después el análisis de OTA a los 14 días dio negativo, lo que sugiere una posible degradación de la molécula de OTA a otros compuestos. Esto no ocurrió en otras cepas y la OTA se detectó tanto a los 7 días como a los 14. Finalmente, también se dio el caso de otras cepas en las que se detectó la OTA solamente a los 14 días y no a los 7 días. Con estos resultados se muestra la variabilidad existente entre las diferentes cepas en relación al tiempo necesario para que produzcan la micotoxina. Estos resultados no se correlacionan con lo observado por Battilani y col. (2007), donde la producción de OTA *in vitro* se produjo siempre a los 7 días de incubación. Es necesario añadir que, excepto una cepa productora de OTA (H09-72, *P. commune*) que procedía de ambiente, el resto de cepas ocratoxigénicas se aislaron a partir de las muestras de jamón. Por último, cabe destacar que el 81,81% (9 cepas) de los aislados productores de OTA procedía de S2.

Tal como se observa en la Tabla 18, los hongos capaces de producir OTA pertenecen a las especies *P. verrucosum*, *P. commune*, *P. polonicum* y *P. chrysogenum*, con valores medios de producción de 3,76, 3,71, 0,09 y 0,01 $\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo, respectivamente. Por ello, *P. verrucosum* fue la especie con mayor capacidad de producir OTA en este estudio, al detectar dicha capacidad en el 100% de las cepas aisladas, con un valor máximo de producción de 7,50 $\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo. No obstante, hay que añadir que la frecuencia de aislamiento de *P. verrucosum* no es muy elevada (4,05%). Numerosos estudios demuestran dicha capacidad por parte de cepas de esta especie aisladas a partir de jamón y otros productos cárnicos (Bogs y col., 2006; Rodríguez y col., 2012). Así, en el estudio realizado por Iacumin y col. (2009) se aisló *P. verrucosum* en el 87,5% de salchichas contaminadas con OTA (en niveles superiores a 1

$\mu\text{g}/\text{kg}$). Del mismo modo, Larsen y col. (2001) y Pitt y col. (1987) demostraron que *P. verrucosum* y *P. nordicum* eran las principales especies responsables de la producción de OTA en carnes.

Por otro lado, uno de los resultados más interesantes de este análisis cromatográfico es la detección de cepas de *P. commune* productoras de OTA (20,83%), ya que la capacidad de producir OTA por esta especie es todavía incierta en la actualidad. En este sentido, el trabajo realizado por Skrinjar y col. (1992) mostró la producción de OTA por parte de cepas de *P. commune* aisladas en piensos. Sin embargo, no realizaron ningún estudio sobre el potencial ocratoxigénico de las cepas sino que, por el contrario, dicho resultado se basó en la obtención de elevadas frecuencias de aislamiento de *P. commune* a partir de muestras de piensos contaminadas con OTA. Del mismo modo, Varga y col. (2001) consideraron también a esta especie como productora de OTA. Sin embargo, dicho hallazgo fue discutido posteriormente en diferentes estudios (Cole y Schwikert, 2003a y 2003b). Del mismo modo, *P. commune* no se consideró productor de OTA en la lista de especies productoras de micotoxinas elaborada por Frisvad y col. (2004) para el género *Penicillium* subgénero *Penicillium*. Por todo ello, aunque este hallazgo podría sugerir la existencia de cepas de *P. commune* ocratoxigénicas, cuya capacidad de producir dicha micotoxina en este estudio alcanzó niveles de hasta 20,40 μg de OTA/g de medio de cultivo y con una producción media de 3,71 $\mu\text{g}/\text{g}$ de medio de cultivo. En este sentido, sería necesario realizar estudios morfológicos adicionales así como secuenciar otros genes con el fin de confirmar que estas cepas ocratoxigénicas pertenecen a *P. commune*.

Otra especie que resultó productora de OTA en un 40% de sus cepas (2 cepas) fue *P. polonicum*, con un nivel medio de 0,09 $\mu\text{g}/\text{g}$ de medio de cultivo. Se trata de un resultado sorprendente ya que, a pesar de haberse aislado en alguna ocasión cepas de esta especie productoras de OTA, no existen estudios previos que hayan aislado cepas ocratoxigénicas de dicha especie a partir de carnes o productos cárnicos (Chen y col., 2011; Stoev y col., 2010). Por otro lado, 1 cepa de *P. chrysogenum* resultó ser ocratoxigénica (7,69% del total de esta

especie). Es necesario indicar que, a pesar de que los trabajos realizados por Mills y Abramson (1982) y Mills y col. (1989) relataron la existencia de cepas de *P. chrysogenum* productoras de esta micotoxina, dichos hallazgos fueron cuestionados posteriormente por Iacumin y col. (2009) y Samson y Frisvad (2004). Sin embargo, recientemente el estudio de Chen y col. (2011) identificó, mediante secuenciación del gen que codifica la β -tubulina, una cepa de *P. chrysogenum* ocratoxigénica. Asimismo, Czerwiecki (2001) sugirió que esta especie podría ser productora de OTA, por lo que es otro claro ejemplo de la divergencia existente al respecto entre los investigadores. No obstante, la cepa productora en nuestro estudio presentó un valor medio de producción de 0,01 $\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo, siendo éste el más bajo.

Tabla 18. Concentración de OTA y CPA ($\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo) de las cepas productoras.

Especie	Nº Cepas (%)	Cepas productoras CPA (%)	Producción de CPA ($\mu\text{g/g}$)		Cepas productoras OTA (%)	Producción de OTA ($\mu\text{g/g}$)		Cepas productoras de CPA y OTA (%)
			Rango	Media		Rango	Media	
<i>Penicillium commune</i>	24 (32,43)	15 (62,50)	0,30 - 5206,10	1168,28	5 (20,83)	0,01 - 20,40	3,71	4 (16,66)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	13 (17,56)	4 (30,77)	0,40 - 13,61	3,8	1 (7,69)	0,01 - 0,01	0,01	0 (0)
<i>Penicillium polonicum</i>	5 (6,75)	2 (40)	970,90 - 2039,81	1818,81	2 (40)	0,06 - 0,12	0,09	2 (40)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3 (4,05)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium nalgiovense</i>	3 (4,05)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium verrucosum</i>	3 (4,05)	1 (33,33)	38,07 - 186,72	123,46	3 (100)	0,026 - 7,50	3,76	1 (33,33)
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	2 (2,70)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Alternaria alternata</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Alternaria tenuissima</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Aspergillus ruber</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Aspergillus niveoglaucum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Aspergillus repens</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Engyodontium album</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium atramentosum</i>	1 (1,35)	1 (100)	15,60 - 15,60	15,6	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium atrovenetum</i>	1 (1,35)	1 (100)	1,65 - 1,65	1,65	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium carneum</i>	1 (1,35)	1 (100)	0,11 - 0,35	0,28	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium echinulatum</i>	1 (1,35)	1 (100)	66,31 - 66,31	66,31	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium expansum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium glabrum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium italicum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium lanosum</i>	1 (1,35)	1 (100)	1,75 - 1,75	1,75	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium solitum</i>	1 (1,35)	1 (100)	23,56 - 23,56	23,56	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Penicillium sumatrense</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Pleospora herbarum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Trichoderma citrinoviridae</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1 (1,35)	0 (0)	0	0	0 (0)	0	0	0 (0)
Cepas totales	74 (100)	28 (37,84)			11 (14,86)			7 (9,46)

Cabe señalar que un total de 7 cepas mostraron capacidad para producir ambas micotoxinas, concretamente pertenecientes a las especies *P. commune* (4 cepas), *P. polonicum* (2 cepas) y *P. verrucosum* (1 cepa), y todas ellas se aislaron a partir de muestras de jamón. A este respecto, esta es la primera vez que se relata la capacidad de producir OTA y CPA simultáneamente en una misma cepa perteneciente a dichas especies. Finalmente, es necesario indicar que el hecho de haber aislado cepas productoras de OTA y CPA *in vitro* a partir de muestras de jamón, no necesariamente implica que esta micotoxina esté presente en el jamón. Las diferentes condiciones ambientales del jamón como la temperatura, humedad relativa y actividad de agua, pueden influir en la producción de micotoxinas. Por ello, es necesario analizar si existe contaminación de los jamones por micotoxinas producidas por los hongos que participan en la maduración, como por ejemplo OTA y CPA. De este modo, se podría confirmar si a lo largo del proceso de elaboración del jamón se dan las condiciones óptimas para la producción de micotoxinas por parte de la población fúngica micotoxigénica.

III.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA Y OTA EN JAMÓN

En este apartado se ha fijado como objetivo principal detectar y cuantificar la contaminación de CPA y OTA en 10 muestras comerciales de jamón procedentes de los dos secaderos incluidos en el estudio (S1 y S2) (véase apartados II.2.2. y II.9.2. de Material y Métodos). La Tabla 19 muestra los resultados de la detección y cuantificación de CPA y OTA de cada una de las muestras de jamón analizadas. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de producto. Dicha tabla indica también la procedencia de las muestras así como las especies productoras de OTA y/o CPA aisladas de cada jamón muestreado.

III.4.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CPA EN JAMÓN

Tal y como puede observarse en la Tabla 19, se detectó CPA en 8 de las 10 muestras analizadas, con valores comprendidos entre 0,0362 y 2,4955 $\mu\text{g/g}$ de jamón. Dichos resultados

coinciden con los obtenidos en diversos trabajos en los que también describieron la presencia de CPA en jamón curado y otros productos cárnicos. En este sentido, Bailly y col. (2005) detectaron muestras de jamón curado contaminadas con dicha micotoxina, alcanzado un nivel máximo de contaminación de 50 mg/kg. Del mismo modo, el trabajo realizado por Ostrý y Polster (1989) también obtuvo resultados similares. Así, detectaron dicha micotoxina en 6 productos alimenticios comerciales diferentes, entre los cuales se encontraba el salami, con una concentración máxima de 0,5 µg/kg. Por otro lado, es necesario indicar que, en todas las muestras positivas a CPA de nuestro estudio se habían aislado cepas productoras de esta micotoxina *in vitro* durante la elaboración de dichos perniles (Tabla 19). En concreto, la cepa productora de CPA *P. atramentosum* H09-86 se aisló durante la fase de maduración de M1, cuyo nivel de contaminación con CPA fue de 1,1175 µg/g. Del mismo modo, los aislados productores de CPA *in vitro* *P. chrysogenum* H09-100 y *P. commune* H09-99 se obtuvieron durante la maduración de M2, muestra en la que posteriormente se cuantificó el nivel de contaminación de CPA en 0,4345 µg/g. También, las cepas *P. commune* H09-39 y H09-90, las cuales mostraron capacidad de producir CPA *in vitro*, se aislaron durante la maduración de M4 y M5, respectivamente, en las que el nivel de contaminación de CPA alcanzó valores de 1,6431 y 0,9732 µg/g, respectivamente. Asimismo, durante el secado y maduración de la muestra M6, la cual presentó el mayor nivel de contaminación de CPA observado en el estudio (2,4955 µg/g), se aislaron las cepas productoras de dicha micotoxina *P. commune* H09-103 y H09-93. También, la cepa *P. polonicum* H09-98, con capacidad de producir CPA *in vitro*, se aisló durante la maduración de M7, siendo dicha muestra positiva a CPA con un nivel de contaminación de 1,3654 µg/g. Del mismo modo, los aislados productores de CPA *P. commune* H09-27 y *P. echinulatum* H09-34 se obtuvieron durante la fase de maduración de M9 y M10, respectivamente, siendo jamones en los que posteriormente se detectó dicha micotoxina en concentraciones de 0,6858 y 0,0362 µg/g, respectivamente. Por todo ello, estos resultados podrían indicar que la contaminación de CPA observada en las muestras de jamón fue

consecuencia de la presencia de biota fúngica productora de dicha micotoxina durante su elaboración. Así, este hecho coincidiría con el estudio realizado por Bailly y col. (2005) en el que atribuyeron la presencia de CPA, detectada en diversas muestras de jamón curado, al crecimiento de cepas toxigénicas de *Penicillium* sobre la superficie de las mismas. Por ello, el elevado porcentaje de muestras de jamón contaminadas con CPA era un resultado esperado ya que un elevado porcentaje de las cepas aisladas durante el proceso de elaboración, concretamente un 37,84%, mostró capacidad de producir CPA *in vitro*. Asimismo, la elevada frecuencia de aislamiento observada para *P. commune* (32,43% del total) y el elevado porcentaje de las cepas de dicha especie que resultaron ser productoras de CPA (62,50%) justificaría la contaminación observada en las muestras. En este sentido, cabe señalar que el 62,5% de las muestras de jamón contaminadas procedía de S2. Así, dicho hallazgo podría justificarse por los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad de producir CPA *in vitro* realizada sobre las cepas aisladas, ya que el 78,57% de los aislados productores de CPA procedía de S2. Así, estos resultados pondrían de manifiesto que las condiciones de procesado del jamón son favorables para que los hongos potencialmente productores de CPA produzcan dicha micotoxina. A este respecto, cabe mencionar que tan solo una de las cepas productoras de CPA se aisló de una muestra no contaminada, en concreto, únicamente la cepa *P. chrysogenum* H09-35, aislada durante la etapa de secado de M3, no fue capaz de desarrollar su potencial toxigénico durante la elaboración del mismo.

Tabla 19. Detección y cuantificación de OTA y CPA en muestras de jamón.

Código muestra	Procedencia	OTA (µg/g)	CPA (µg/g)	Especies toxigénicas identificadas ¹
M1	S2	0,0116	1,1175	<i>P. atramentosum</i> (H09-86); <i>P. verrucosum</i> (H09-121)
M2	S2	0,0087	0,4345	<i>P. chrysogenum</i> (H09-100); <i>P. commune</i> (H09-99)
M3	S1	<LD ²	<LD ²	<i>P. chrysogenum</i> (H09-35)
M4	S1	0,0043	1,6431	<i>P. commune</i> (H09-39)
M5	S2	0,0100	0,9732	<i>P. commune</i> (H09-90)
M6	S2	0,0077	2,4955	<i>P. commune</i> (H09-103); <i>P. commune</i> (H09-93)
M7	S2	0,0088	1,3654	<i>P. polonicum</i> (H09-98)
M8	S1	<LD ²	<LD ²	ND ³
M9	S1	0,0021	0,6858	<i>P. commune</i> (H09-27)
M10	S1	<LD ²	0,0362	<i>P. echinulatum</i> (H09-34)

¹Las cepas resaltadas en rojo fueron productoras de OTA, las resultadas en azul fueron productoras de CPA y las resaltadas en verde fueron productoras de OTA y CPA.

²Límite de Detección OTA: 0,00125 µg/g; Límite de Detección CPA: 0,00015 µg/g

³No detectada

III.4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OTA EN JAMÓN

En relación a la detección y cuantificación de OTA, se detectó dicha micotoxina en 7 de las 10 muestras analizadas, con valores comprendidos entre 0,0021 y 0,0116 µg/g de jamón (Tabla 19). Asimismo, es necesario señalar que todas las muestras contaminadas con OTA superarían el límite máximo que estaba establecido en 1µg/kg para productos cárnicos en la legislación italiana (no vigente en la actualidad). Estos resultados coinciden con los obtenidos en diversos trabajos en los también detectaron OTA en un elevado porcentaje de las muestras analizadas de jamón curado y otros productos cárnicos, algunas de ellas superando concentraciones de 1µg/kg (Escher y col., 1973; Gareis y Scheuer, 2000; Jiménez y col., 2001; Pietri y col., 2006 y 2011; Sharman y col., 1992). En este sentido, Toscani y col. (2007) investigaron la presencia de OTA en muestras comerciales de jamón curado y jamón ahumado, detectando la presencia de dicha micotoxina en el 50% de los productos muestreados. Asimismo, los niveles de contaminación de OTA obtenidos en dicho estudio estaban comprendidos entre 0,11 y 7,28 µg/kg. También, Chiavaro y col. (2002) estudiaron la presencia de OTA en 42 muestras de jamón curado, 21 de ellas obtenidas tras 6 meses de maduración y las 21 restantes obtenidas tras una maduración de 12 meses. En este caso, detectaron OTA en

el 66,66% de las muestras de jamón con 6 meses de maduración y en el 57,14% de las muestras de jamón con 12 meses de maduración, de las cuales el 57,69% presentó un nivel de contaminación superior a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Del mismo modo, otro trabajo que demostró la contaminación de OTA en productos cárnicos es el realizado por Monaci y col. (2005), en el cual el 46,66% del total de muestras de salami analizadas (30 muestras) presentaron contaminación con niveles comprendidos entre 60 y 400 pg/g . Igualmente, Zanotti y col. (2001) obtuvieron resultados similares tras estudiar el nivel de contaminación de OTA en dicho producto cárnico. Asimismo, Iacumin y col. (2009) investigaron la presencia de OTA en “salchichas secas” producidas de forma artesanal e industrial en el norte de Italia, cuya principal diferencia radicaba en el empleo o no de cultivos iniciadores durante su maduración. Así, el 37% de los productos elaborados artesanalmente, es decir, sin cultivos iniciadores, estaba contaminado con OTA mientras que el 58,3% de los productos elaborados de forma industrial resultó positivo a la presencia de OTA, alcanzando niveles de contaminación comprendidos entre 3 y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Además, cabe mencionar que en dicho estudio únicamente se detectó la OTA en la superficie de las salchichas, lo que indicaría una baja capacidad de difusión de la micotoxina hacia el interior de la pieza. Por otro lado, al igual que lo observado durante el estudio de la contaminación por CPA, en 6 de las 7 muestras contaminadas en nuestro estudio se habían aislado cepas que mostraron capacidad de producir OTA *in vitro* en este trabajo (Tabla 19). Concretamente, la cepa ocratoxigénica *P. verrucosum* H09-121 se aisló durante la maduración de M1, cuyo nivel de contaminación fue el más elevado observado en el estudio (0,0116 $\mu\text{g}/\text{g}$). También, las cepas de *P. commune* H09-99, H09-39 y H09-90, que resultaron productoras de OTA *in vitro*, se aislaron durante la etapa de maduración de M2, M4 y M5, respectivamente, en las cuales se detectó OTA con concentraciones de 0,0087, 0,0043 y 0,0100 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente. De igual forma, la cepa ocratoxigénica *P. polonicum* H09-98 se aisló durante la maduración de M7, que presentó un nivel de contaminación de OTA de 0,0088 $\mu\text{g}/\text{g}$. Por todo ello, estos hallazgos podrían sugerir que la contaminación de OTA observada en

las muestras de jamón fue consecuencia de la presencia de biota fúngica ocratoxigénica durante su elaboración. Así, este hecho coincidiría con los resultados obtenidos en diversos estudios en los que también atribuyeron la contaminación con OTA detectada en diversos productos cárnicos a los hongos con potencial ocratoxigénico aislados en los mismos (Iacumin y col., 2009; Larsen y col., 2001; Pitt y col., 1987). Del mismo modo, cabe señalar que el 71,43% de las muestras positivas procedía de S2. En este sentido, dicho hallazgo podría justificarse por los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad ocratoxigénica realizada en este estudio, ya que el 81,81% de los aislados productores de OTA procedía de S2. Sin embargo, es necesario mencionar que aunque las muestras M6 y M9 presentaron un nivel de contaminación de 0,0077 $\mu\text{g/g}$ y 0,0021 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, no se aislaron cepas productoras de OTA a partir de dichas muestras. A este respecto, diversos trabajos han justificado la contaminación de OTA observada en carnes y productos cárnicos a la alimentación del ganado con piensos contaminados (Lusky y col., 1995; Pleadin y col., 2013). Sin embargo en dichos estudios la OTA se detectó principalmente en vísceras y en el interior de la pieza del producto cárnico.

Finalmente, cabe señalar que la contaminación observada en este estudio podría sugerir que el jamón curado es otra fuente de exposición del hombre para la OTA y el CPA. Sin embargo, esta fuente de exposición, descrita también en diversos estudios, no fue contemplada para establecer la ingesta tolerable semanal de la OTA, fijada en 120 ng/kg de peso corporal, ni para establecer la ingesta diaria admisible del CPA, fijada en 10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (Burdock y Flamm, 2000; Reglamento (CE) Nº 1881/2006). Por ello, dado el posible riesgo existente para la salud del consumidor, y puesto que en la actualidad son pocos los estudios que han investigado la presencia de estas micotoxinas en el jamón curado, sería necesario profundizar el estudio de la contaminación de OTA y CPA en este producto. Asimismo, dado que en la actualidad no existen métodos de descontaminación eficaces, la caracterización toxigénica de la biota fúngica presente durante la maduración podría ser una

medida de control para eliminar o reducir a un nivel aceptable la contaminación de OTA y CPA del jamón. Por ello, es necesario evaluar el potencial micotoxigénico de la biota fúngica desarrollada durante su procesado, cuya característica parece estar relacionada con la contaminación observada en el producto terminado.

III.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA Y PROTEOLÍTICA DE LAS CEPAS

En este capítulo se estudió la actividad lipolítica y proteolítica *in vitro* de las 74 cepas de hongos previamente identificadas en los capítulos anteriores (véase apartado II.10 de Material y Métodos).

III.5.1 ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Tal y como se observa en la Figura 34, la actividad lipolítica se detectó por la aparición de un precipitado alrededor de los micelios fúngicos correspondiente a la precipitación de los ácidos grasos libres con las sales del medio de cultivo. Por su actividad lipolítica, se utilizaron como cepas control *P.camemberti* CECT 2267 y *P. roqueforti* CECT 2905 (Bruna y col., 2003; Fernández-Bodega y col., 2009). Los resultados del estudio de la capacidad lipolítica de las cepas se indican en la Tabla 20. Tal y como puede observarse en la tabla, dicha capacidad se clasificó en alta, media o baja en función del tamaño del halo de precipitado observado (> 10 mm: alta; 10-3 mm: media; < 3 mm: baja).

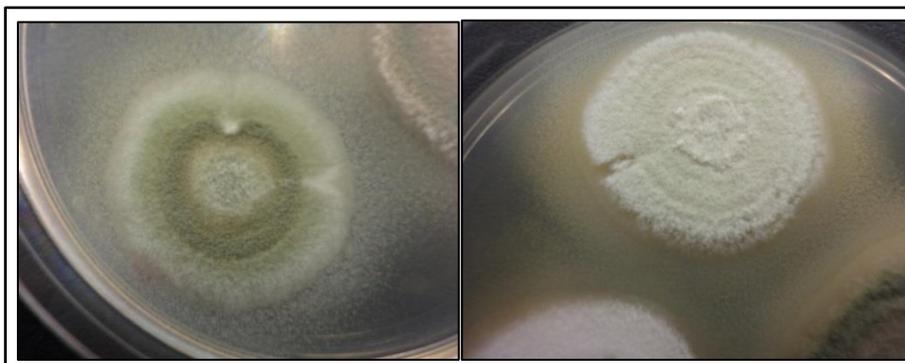


Figura 34. Cepas de *Penicillium* con actividad lipolítica alta (> 10mm tamaño halo) frente al ácido láurico tras su incubación a 28°C durante 15 días en medio de cultivo Tween-80.

El 94,59% del total de aislados (70 cepas) presentó actividad lipolítica frente al menos uno de los ácidos grasos testados en el estudio: ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico y/o ácido oleico. En este sentido, la mayoría de las cepas lipolíticas mostraron esta capacidad frente al ácido láurico y el ácido oleico, con 68 (91,89%) y 52 cepas (70,27%), respectivamente. Sin embargo, la actividad lipolítica que presentaron las cepas frente al ácido palmítico y esteárico fue más moderada, con 29 y 8 cepas positivas, respectivamente. A este respecto, cabe señalar que el principal ácido graso en la carne de porcino es el ácido oleico (759 mg/g), seguido de ácido palmítico (526 mg/g), ácido esteárico (278 mg/g) y ácido láurico (6 mg/g) (Enser y col., 1996). Por ello, los resultados obtenidos podrían sugerir que la microbiota presente durante la elaboración del jamón desempeña un papel importante en la formación del sabor y aroma característico, ya que como consecuencia de la hidrólisis de estos ácidos grasos, principalmente el ácido oleico, se liberarían numerosos compuestos volátiles que podrían influir en estos atributos sensoriales. En este sentido, Selgas y col. (1999) y Toledo y col. (1996) probaron que las lipasas producidas por la microbiota desarrollada en superficie de embutidos curados y otros productos cárnicos incrementaban los niveles de ácidos grasos libres en el producto. Asimismo, numerosos autores han estudiado la evolución de las características organolépticas durante la elaboración del jamón, concluyendo que los cambios lipídicos que experimenta el producto durante su procesado, lipólisis y oxidación de los ácidos grasos, tienen un gran impacto en la calidad sensorial del producto (Buscaillon y col., 1994a y 1994b; Cava y col., 1997; Flores y col., 1997; López y col., 1992; Marusic y col., 2011; Ordóñez y col., 1996).

En relación a la identificación de las cepas lipolíticas, el 81,43% de ellas pertenecía al género *Penicillium*. En este sentido, diversos trabajos han atribuido la capacidad lipolítica a dicho género (Alonso, 2004; Seitz, 1990). Así, Núñez (1995) y Trigueros y col. (1995) aislaron cepas de *Penicillium* con actividad lipolítica a partir de jamón y embutido. Por ello, este

hallazgo podría justificar el empleo actual de cepas de *Penicillium* como cultivos iniciadores en numerosos productos cárnicos, entre los que destacan el jamón ahumado y los embutidos crudo-curados (Mintzlaff y Christ, 1973; Mintzlaff y Leistner, 1972; Leistner y col., 1980; Leistner, 1986; Kunz y col., 1982; Racovita y Racovita, 1971). En este trabajo, un total de 14 especies de *Penicillium* resultaron ser lipolíticas: *P. atramentosum*, *P. atrovireneum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. nalgiovense*, *P. polonicum*, *P. solitum*, *P. sumatrense* y *P. verrucosum*. Entre ellas *P. commune* y *P. chrysogenum* fueron las que mostraron mayor actividad lipolítica. A este respecto, todas las cepas de *P. commune* aisladas (24 cepas) presentaron actividad lipolítica frente a alguno de los ácidos grasos testados. Concretamente, la cepa H09-72 produjo lipólisis en todos los ácidos grasos incluidos en el estudio (ácido láurico, palmítico, esteárico y oleico) y la cepa H09-127 produjo lipólisis en el ácido oleico, palmítico y láurico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Huerta y col. (1988), Molina y Toldrá (1992) y Núñez (1995) en los que también aislaron cepas de *P. commune* con actividad lipolítica en la superficie del jamón curado. Asimismo, la actividad de la lipasa producida por cepas de *P. commune* aisladas en jamón ha sido clasificada como actividad media en diversos trabajos (Núñez, 1995; Núñez y col., 1996). En relación a *P. chrysogenum*, todas las cepas aisladas resultaron ser lipolíticas frente a alguno de los ácidos grasos incluidos en el estudio. En concreto, cabe destacar la cepa H09-22 que presentó actividad lipolítica frente todos los ácidos grasos testados. Diversos trabajos han descrito la capacidad lipolítica de esta especie con anterioridad (Chander y col., 1980; Galvalisi y col., 2012; Sunesen y Stahnke, 2003). A este respecto, Martín y col. (2006) detectaron un aumento significativo del nivel de compuestos volátiles, generados por la hidrólisis y oxidación de los ácidos grasos, a partir de muestras de jamón inoculadas con cepas de *P. chrysogenum*. Del mismo modo, Galvalisi y col. (2012) estudiaron *in vitro* la producción de enzimas extracelulares con capacidad lipolítica por parte de cepas de *P. chrysogenum* aisladas en salami. En dicho estudio se concluyó que las cepas producían enzimas lipolíticas si

la temperatura de incubación era de 25°C mientras que carecían de esta capacidad si la temperatura de incubación era de 14°C.

Otras cepas que presentaron actividad lipolítica fueron *P. polonicum*, *P. nalgiovense*, *P. verrucosum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Byssochlamys spectabilis* con 5, 3, 3, 2 y 2 aislados con capacidad lipolítica, respectivamente. En relación a *P. polonicum*, esta es la primera vez en la que se detecta dicha actividad en cepas de esta especie. Sin embargo, Polizzi y col. (2012) aislaron a partir de ambiente cepas de *P. polonicum* que incrementaron el nivel de compuestos volátiles orgánicos *in vitro*, por lo que dicho hallazgo podría sugerir la capacidad lipolítica por parte de estas cepas. Con respecto a *P. nalgiovense*, cabe destacar en este trabajo la cepa H09-54, ya que presentó actividad lipolítica frente a todos los ácidos grasos estudiados. En este sentido, dicho resultado era el esperado ya que diversos trabajos han aislado cepas de *P. nalgiovense* con capacidad de producir reacciones lipolíticas en productos cárnicos curados y fermentados (Andersen, 1995; Asefa y col., 2009; Galvalisi y col., 2012). Por todo ello, al igual que *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense* también se emplea como cultivo iniciador durante la elaboración de diversos productos cárnicos, tanto por su marcada actividad lipolítica, la cual contribuye al desarrollo del aroma y sabor del producto, como por la formación de una capa blanca protectora sobre la superficie del mismo (Leistner, 1990; Sunesen y Stahnke, 2003). En relación a *P. verrucosum*, diversos estudios describieron la capacidad lipolítica de esta especie. Así, Glenza y Ben Jaballah (1985) y Pinto-Kempka y col. (2008) demostraron dicha capacidad *in vitro*. Sin embargo, dado que la capacidad toxigénica de determinadas cepas de *P. verrucosum* ha sido evidenciada en múltiples trabajos, la presencia de esta especie en los alimentos se considera indeseable (Cabañes y col., 2010; Comi y col., 2004; Gareis y Scheuer, 2000; Pietri y col., 2006; Rodríguez y col., 2012; Schmidt-Heydt y col., 2012). Finalmente, respecto a *C. cladosporioides* y *B. spectabilis*, su capacidad para producir lipólisis es incierta. A este respecto, Chinaglia y col. (2012), Dabirian (2005) y Venkatesagowda y col. (2012) aislaron cepas con actividad lipolítica de *C. cladosporioides* y otras especies de *Cladosporium* procedentes de

semillas oleaginosas, leche y otras fuentes no alimentarias. Sin embargo, estos hallazgos difieren de los obtenidos por Oliveira y col. (2010) ya que en dicho trabajo no se detectó actividad lipolítica en cepas de *Cladosporium* aisladas del ambiente. Del mismo modo, no existen estudios que hayan descrito la actividad lipolítica de *B. spectabilis*.

En menor medida, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niveoglaucum*, *Aspergillus repens*, *Aspergillus ruber*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Engyodontium album*, *P. atramentosum*, *P. atroveneteum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. solitum*, *Pleospora herbarum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *P. sumatrense* resultaron lipolíticos con 1 aislado productor cada uno. En este sentido, diversos autores han detectado la producción de lipasas *in vitro*, frente al ácido láurico, por cepas de *A. alternata*, *P. brevicompactum* y *P. expansum* (Galvalisi y col., 2012; Magan y col., 1993; Mohamed y col., 1988). Asimismo, cabe destacar la cepa H09-2, *P. atroveneteum*, ya que mostró actividad lipolítica frente a todos los ácidos grasos testados.

Tabla 20. Actividad lipolítica y proteolítica de las cepas identificadas sobre medio de cultivo Tween y PDA-Caseína.

Especie	Cepas	Cepas con actividad lipolítica (%) ¹	Actividad lipolítica ²				Cepas con actividad proteolítica (%) ¹	Actividad proteolítica ²
			Ácido láurico	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico		
<i>Penicillium commune</i>	H09-1		+++			++		+
	H09-6		+			++		
	H09-27		++	+				+
	H09-28		+++			++		
	H09-37		+++			+++		+
	H09-38		+++			+++		+
	H09-39		+++			+++		
	H09-72		+++	++	++	+++		
	H09-73		++			++		
	H09-80		++			++		
	H09-83		+++			++		
	H09-89		+++			+		+++
	H09-90		+++			+		
	H09-92		+++			+		
	H09-93		+++			+		+
	H09-97		++	++				+
	H09-99		++	++				
	H09-101		+++			+++		+
	H09-102		+++			+++		+
	H09-103		++	+				+
	H09-104		+			++		
	H09-118		+++			++		+
	H09-122		++					+
	H09-127		+++	+		+++		+
		24 (100)					13 (54,16)	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	H09-13		+++			++		+
	H09-16		++	+		+++		+
	H09-22		++	+	+	++		

Especie	Cepas	Cepas con actividad lipolítica (%) ¹	Actividad lipolítica ²				Cepas con actividad proteolítica (%) ¹	Actividad proteolítica ²
			Ácido láurico	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico		
<i>Penicillium polonicum</i>	H09-24			+	+	++		
	H09-25		+			+		
	H09-35		++	++		+++	+	
	H09-52		+++	++				
	H09-82		++			++		
	H09-100		+++			++		
	H09-107		++			++		
	H09-109		++			+	+	
	H09-114		+			++	+	
	H09-116		++	++			+	
			13 (100)				6 (46,15)	
	H09-33		+++	+			+	
	H09-88		++	++		+		
H09-91		+++	+	+		+		
H09-98		++	++			+		
H09-112		+++		+				
		5 (100)				3 (60)		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	H09-5						+++	
	H09-128		+++	++		+++		
	H09-131		+++			+++	+	
		2 (66,66)				2 (66,66)		
<i>Penicillium nalgiovense</i>	H09-30		+++	+	+		+	
	H09-54		+++	++	++	+	+	
	H09-76		+++	++		++	+	
		3 (100)				3 (100)		
<i>Penicillium verrucosum</i>	H09-120		+++			+	+	
	H09-121		++					
	H09-126		+++			+		
		3 (100)				1 (33,33)		
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	H09-8		++	+		+++	+	

Especie	Cepas	Cepas con actividad lipolítica (%) ¹	Actividad lipolítica ²				Cepas con actividad proteolítica (%) ¹	Actividad proteolítica ²
			Ácido láurico	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico		
	H09-43		+			++		
		2 (100)					1 (50)	
<i>Alternaria alternata</i>	H09-10	1 (100)	+++			+++	+	
<i>Alternaria tenuissima</i>	H09-9	1 (100)	++	+			++	
<i>Aspergillus ruber</i>	H09-29	1 (100)	+++	++		++	0 (0)	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	H09-130	1 (100)	+++	+		++	0 (0)	
<i>Engyodontium álbum</i>	H09-77	1 (100)	+++	+++		++	0 (0)	
<i>Aspergillus niveoglaucum</i>	H09-47	1 (100)	+			++	0 (0)	
<i>Aspergillus repens</i>	H09-78	1 (100)	+++	+++		++	0 (0)	
<i>Penicillium atramentosum</i>	H09-86	1 (100)	++				1 (100)	
<i>Penicillium atrovenetum</i>	H09-2	1 (100)	+++	++	+	++	1 (100)	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	H09-75	1 (100)	++			++	1 (100)	
<i>Penicillium carneum</i>	H09-106	1 (100)	++			+++	1 (100)	
<i>Penicillium echinulatum</i>	H09-34	1 (100)	++			+++	1 (100)	
<i>Penicillium expansum</i>	H09-87	1 (100)		+++			1 (100)	
<i>Penicillium italicum</i>	H09-129	1 (100)	+++			+++	0 (0)	
<i>Penicillium solitum</i>	H09-113	1 (100)	++			++	0 (0)	
<i>Pleospora herbarum</i>	H09-7	1 (100)	++			+++	1 (100)	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	H09-95	1 (100)	+++				0 (0)	
<i>Penicillium sumatrense</i>	H09-59	1 (100)	+++	+++			0 (0)	
<i>Penicillium lanosum</i>	H09-74	0 (0)					1 (100)	
<i>Penicillium glabrum</i>	H09-36	0 (0)					0 (0)	
<i>Trichoderma citrinoviridae</i>	H09-105	0 (0)					0 (0)	
Total cepas (%) ³		70 (94,59)	68 (91,89)	29 (30,19)	8 (10,81)	52 (70,27)	39 (52,70)	

¹Porcentaje calculado sobre el número de aislados de cada especie fúngica.

²Tamaño del halo: (+++) > 10 mm, (++) 3 – 10 mm, (+) < 3 mm.

³Porcentaje calculado sobre el total de aislados (74 cepas).

III.5.2 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica de un total de 74 cepas se evaluó empleando como sustrato el medio de cultivo PDA-Caseína durante 15 días a 28°C. Tal y como se observa en la Figura 35, la actividad proteolítica se detectó por la aparición de un halo transparente alrededor de los micelios fúngicos correspondiente a la hidrólisis proteica de la caseína presente en el medio de cultivo. La capacidad proteolítica de las cepas se clasificó en alta, media o baja en función del tamaño del halo de aclaramiento (> 10 mm: alta; 10-3 mm: media; < 3 mm: baja).

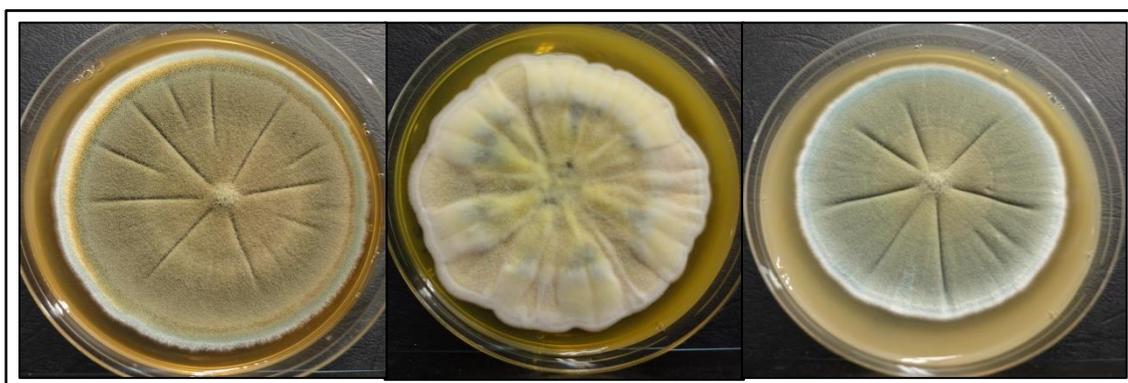


Figura 35. Cepas de *Penicillium* con actividad proteolítica alta (> 10mm tamaño halo) tras su incubación a 28°C durante 15 días en medio de cultivo PDA-Caseína.

Los resultados del estudio de la capacidad proteolítica de las cepas se indican en la Tabla 20. Tal y como puede observarse en dicha tabla, un total de 39 cepas (52,70% del total) presentaron actividad proteolítica, entre las cuales el 84,61% pertenecía al género *Penicillium*. En este sentido, múltiples autores han atribuido capacidad proteolítica a dicho género (Núñez, 1995; Rodríguez y col., 1998; Toledano y col., 2011; Venkatesagowda y col., 2012). Así, tal y como se ha mencionado anteriormente, este hecho podría ser una de las principales razones por las que el género *Penicillium* se emplea en la industria alimentaria como cultivo iniciador en diversos productos cárnicos (Leistner, 1986; Leistner y col., 1980; Mintzlaff y Leistner, 1972; Mintzlaff y Christ, 1973; Racovita y Racovita, 1971; Kunz y col., 1982). En el presente trabajo, las especies que presentaron un mayor número de aislados proteolíticos fueron *P. commune* y *P. chrysogenum*, con 13 y 6 aislados productores de proteólisis, respectivamente. A este

respecto, diversos estudios han descrito la capacidad de cepas de *P. commune* para producir reacciones proteolíticas en productos cárnicos (Núñez, 1995; Núñez y col., 1996). Así, Rodríguez y col. (1998) probaron que cepas de *P. commune* aisladas de la superficie del jamón eran capaces de hidrolizar proteínas del tejido muscular, concretamente sarcoplásmicas y miofibrilares. En este trabajo, cabe destacar especialmente la cepa H09-89 de *P. commune*, ya que presentó una actividad proteolítica alta al producir un halo de aclaramiento superior a 10mm. En relación a *P. chrysogenum*, su actividad proteolítica es ampliamente conocida y ha sido descrita en múltiples cepas aisladas de diversos sustratos. Así, Toledano y col. (2011) evidenciaron la capacidad proteolítica de una cepa comercial de *P. chrysogenum* empleando como sustrato miosina del tejido muscular porcino. Del mismo modo, Trigueros y col. (1995) detectaron que diversas cepas de *P. chrysogenum*, aisladas en salchichón, eran capaces de producir proteasas si se empleaban medios de cultivo compuestos por proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas procedentes de porcino, siendo dicha producción máxima con valores de pH 7,0 y 22°C de incubación. Asimismo, Toledo y col. (1997) detectaron un incremento significativo de compuestos procedentes de reacciones proteolíticas, como nitrógeno soluble en agua, nitrógeno no proteico, ácido fosfotúngstico soluble en nitrógeno, aminoácidos libres y nitrógeno volátil total, en muestras de salchichón inoculadas con *P. chrysogenum* respecto a muestras no inoculadas. También, en dicho estudio detectaron mayor intensidad proteolítica en los productos embutidos en tripa natural que en los elaborados con tripa sintética. Del mismo modo, Céspedes-Sánchez y col. (2001) compararon el nivel de aminoácidos libres y amonio producidos en jamones inoculados con *P. chrysogenum* respecto a los no inoculados, concluyendo que el nivel de productos derivados de la actividad proteolítica era superior en los productos inoculados. Cabe añadir que múltiples autores han descrito una actividad proteolítica elevada frente a proteínas del tejido muscular porcino de la cepa Pg222 de *P. chrysogenum* y que diversos trabajos han purificado y caracterizado su proteasa extracelular frente diferentes proteínas de origen animal (Benito y col., 2002 y 2003; Chrzanowska y col.,

1993; Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2001a). Sin embargo, a pesar de los múltiples trabajos que han puesto de manifiesto la elevada capacidad proteolítica de *P. chrysogenum*, en este trabajo todas las cepas mostraron una baja actividad ya que el halo de aclaramiento producido era inferior a 3 mm.

Otras especies proteolíticas fueron *P. polonicum*, *P. nalgiovense* y *C. cladosporioides*, con 3, 3, y 2 aislados productores de proteólisis, respectivamente. En relación a *P. polonicum*, aunque nunca se ha descrito su capacidad de producir proteasas, Polizzi y col. (2012) concluyeron que diversas cepas de *P. polonicum* estaban involucradas en la formación de compuestos orgánicos volátiles, lo que podría sugerir la capacidad de realizar reacciones proteolíticas de dichas cepas. Por otra parte, múltiples trabajos han demostrado la capacidad proteolítica de *P. nalgiovense*. En este sentido, Toledano y col. (2011) evaluaron la actividad proteolítica de cepas de *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum* concluyendo que ambas especies mostraban una actividad proteolítica similar frente a la miosina porcina. También, Galvalisi y col. (2012) detectaron la producción de proteasas extracelulares por dos cepas de *P. nalgiovense* aisladas en salami. Respecto a *C. cladosporioides*, su capacidad proteolítica nunca ha sido descrita en cepas aisladas de alimentos. A este respecto, Iakovleva y Kozel'tsev (1994) probaron su capacidad de hidrolizar colágeno *in vitro* y Espinel-Ingroff y col. (1988) estudiaron su capacidad proteolítica *in vitro* empleando 26 sustratos diferentes compuestos por gelatina, leche, caseína y el medio de cultivo Loeffler, elaborado con caldo de ternera y suero de buey.

En menor medida, *P. verrucosum*, *B. spectabilis*, *A. alternata*, *Alternaria tenuissima*, *P. atramentosum*, *P. atroveneteum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. lanosum* y *P. herbarum* presentaron actividad proteolítica con 1 aislado productor cada uno. En relación a *P. brevicompactum* y *P. expansum*, Galvalisi y col. (2012) detectaron la producción de proteasas por cepas pertenecientes a dichas especies aisladas en salami. Asimismo, Rodríguez y col. (1998) describieron la actividad proteolítica de *P.*

echinulatum empleando como sustrato caldo de miosina. Respecto a *A. alternata*, cabe señalar que aunque esta es la primera vez en la que se detecta actividad proteolítica en cepas aisladas en alimentos, sí se ha descrito dicha actividad en cepas fitopatógenas (Dunaevskii y col., 2006). Del mismo modo, diversos trabajos han mostrado actividad proteolítica en cepas de *A. tenuissima* aisladas en productos lácteos. Múltiples investigadores estudiaron los factores que influyen en la producción de proteasas por cepas de dicha especie, concluyendo que la producción es máxima en sustratos alcalinos compuestos por caseína (Jönson, 1967, 1969a y 1969b; North, 1982). En relación a *P. carneum*, su actividad proteolítica no se ha descrito nunca. Sin embargo, se trata de una especie estrechamente relacionada con *Penicillium roqueforti*, el cual es ampliamente conocido por su capacidad proteolítica (Boysen y col., 1996; Fernández-Bodega y col., 2009; Nielsen y col., 2006).

La actividad proteolítica de las cepas que mostraron una proteólisis clasificada como alta o media frente al medio de cultivo PDA-Caseína se evaluó empleando como sustrato la miosina porcina. Así, un total de 6 cepas, concretamente *A. tenuissima* (H09-9), *C. cladosporioides* (H09-5), *P. atramentosum* (H09-86), *P. atroveneteum* (H09-2), *P. carneum* (H09-106) y *P. commune* (H09-89), se incubaron con caldo de miosina y se estudió su capacidad de hidrolizar dicha proteína. Por su actividad proteolítica, se incluyó en el estudio *P. camemberti* (CECT 2267) como cepa de referencia. Los resultados de dicho estudio se muestran en la Figura 36. Tal y como puede observarse en dicha figura, el análisis electroforético de la actividad proteolítica de las cepas estudiadas reveló la aparición de múltiples bandas con un tamaño que oscilaba entre 6 y 180 kDa. Así, el análisis electroforético confirmó que las cepas que presentaron una mayor actividad proteolítica frente a la caseína, *C. cladosporioides* (H09-5) y *P. commune* (H09-89), mostraron también una mayor hidrólisis de la miosina porcina que *A. tenuissima* (H09-9), *P. atramentosum* (H09-86) y *P. atroveneteum* (H09-2). Sin embargo, en el caso de *P. carneum* (H09-106), aunque su capacidad de hidrolizar la caseína se consideró moderada, dicha cepa mostró una elevada actividad proteolítica frente

a la miosina porcina, la cual fue similar a la detectada en las cepas *C. cladosporioides* (H09-5) y *P. commune* (H09-89). Por último, cabe destacar que todas las cepas estudiadas mostraron una actividad proteolítica mayor que la cepa control incluida en el estudio *Penicillium camemberti* (CECT 2267). En este sentido, diversos trabajos han relacionado la aparición de bandas de 80 y 92 kDa procedentes de la hidrólisis de proteínas miofibrilares con el crecimiento microbiano en la carne de cerdo (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2002). Del mismo modo, Toldrá (1998) atribuyó la hidrólisis progresiva de la miosina y troponinas que experimentan todos los tipos de jamón curado con la aparición de fragmentos proteicos de 16, 95 y 150 kDa. Asimismo, Verplaetse y col. (1992) estudiaron los cambios proteolíticos que experimentan los embutidos seco-curados encontrando que la hidrólisis de la miosina y actina dio lugar a péptidos de tamaño variable, principalmente de 130 a 145 y 38 kDa, lo que se atribuyó a las proteasas musculares endógenas.

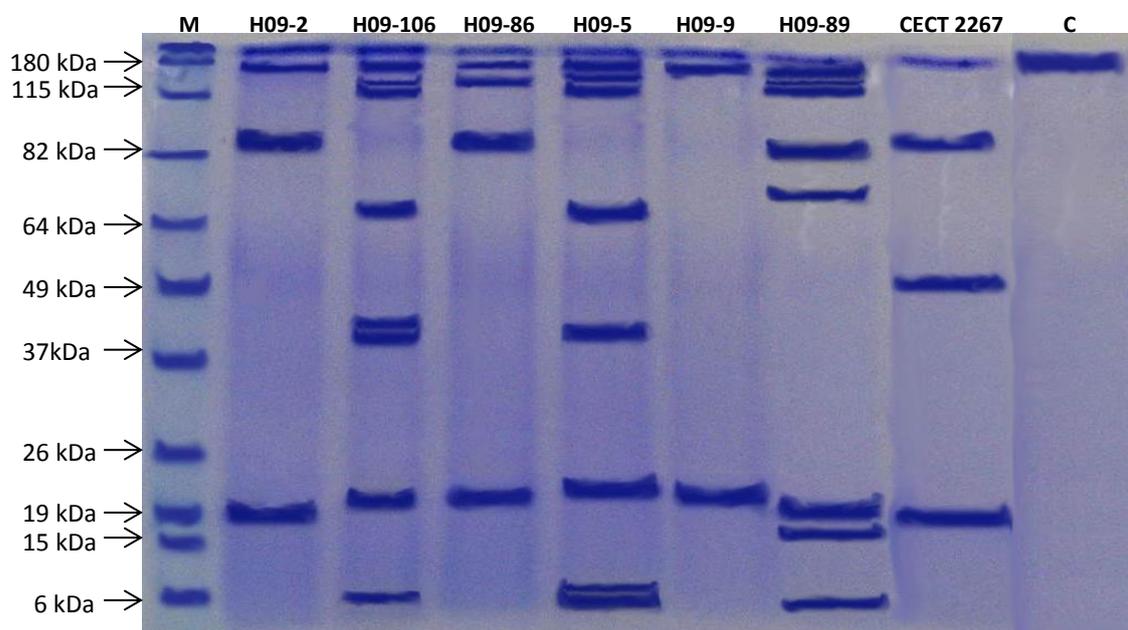


Figura 36. SDS-PAGE de la hidrólisis de la miosina producida por diferentes cepas. **M** : Marcador Sigma M3788; **H09-2**: *P. atroveteum*; **H09-106**: *P. carneum*; **H09-86**: *P. atramentosum*; **H09-5**: *C. cladosporioides*; **H09-9**: *A. tenuissima*; **H09-89**: *P. commune*; **CECT 2267**: *P. camemberti*; **C**: Control negativo.

Finalmente, en relación a la procedencia de las cepas que mostraron actividad lipolítica y proteolítica, el 77,14% de las cepas lipolíticas (54 cepas) y el 61,54% de las cepas proteolíticas (24 cepas) se aislaron de la superficie del jamón (Figura 37). Asimismo, en ambos tipos de muestras (jamón y ambiente) las cepas que presentaban actividad enzimática procedían de las últimas etapas de elaboración: secado y maduración. En este sentido, el 35,71% y el 60% del total de cepas lipolíticas y el 30,77% y 56,41% del total de cepas proteolíticas se aislaron durante el secado y la maduración, respectivamente. Estos resultados podrían apoyar a los obtenidos en otros estudios en los que concluyen que la proteólisis y oxidación de lípidos del jamón se produce principalmente en las etapas de secado y maduración (Buscaillon y col., 1993, 1994a y 1994b; Countron-Gambotti y col., 1999; Flores y col., 1997; Toldrá y col., 1996). Por el contrario, Núñez y col. (1996) atribuyen los cambios proteolíticos que experimenta el producto durante la etapa de salado a las enzimas endógenas del tejido muscular.

Asimismo, cabe señalar que las cepas *P. commune* (H09-89) y *C. cladosporioides* (H09-5) presentaron una importante actividad lipolítica y proteolítica en este trabajo. Por ello, dado que dichas cepas no mostraron capacidad de producir CPA y OTA *in vitro*, estos dos aislados podrían ser los más adecuados para utilizar como cultivos iniciadores durante la elaboración del jamón. No obstante, previamente sería necesario estudiar en profundidad la capacidad toxigénica de dichas cepas para garantizar que no producen otras micotoxinas.

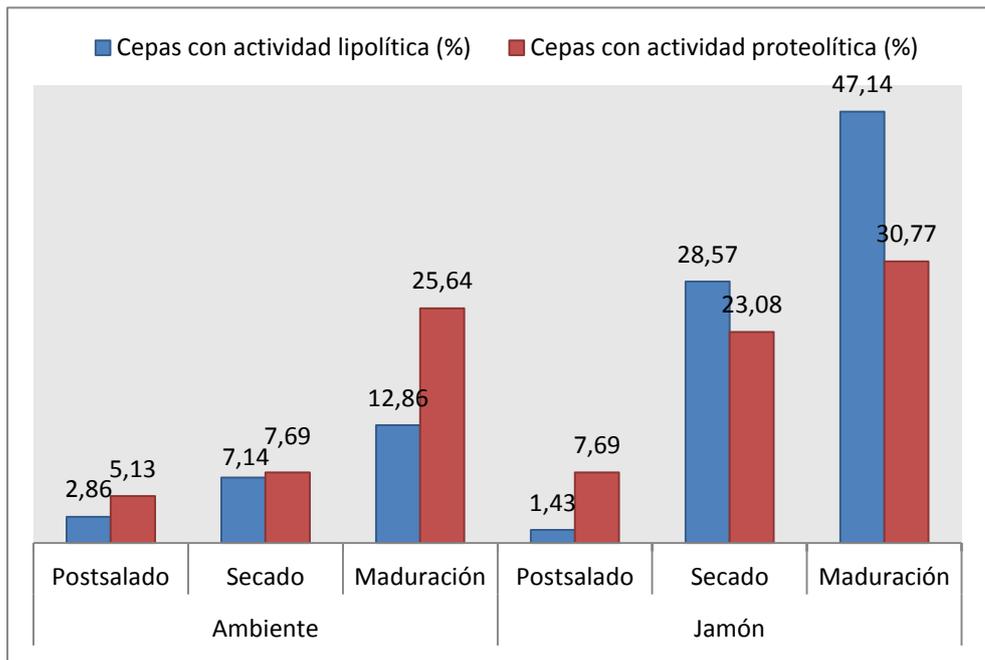


Figura 37. Procedencia de las cepas con actividad lipolítica y proteolítica identificadas en el estudio. Los resultados están expresados sobre el total de cepas lipolíticas (70 cepas) y sobre el total de cepas proteolíticas (39 cepas), respectivamente.

IV. CONCLUSIONES

PRIMERA

Los recuentos de los hongos aislados en jamón y ambiente fueron máximos en las fases finales del procesado, secado y secado natural, con valores máximos de 200 ufc/cm² para las muestras de jamón y 11 ufc/cm² para las muestras de ambiente. No se encontraron diferencias significativas para los recuentos de hongos obtenidos en los dos secaderos muestreados.

SEGUNDA

La mayor parte de los aislamientos correspondieron a hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium* (65,45%), *Aspergillus* (15,89%) y *Cladosporium* (13,81%). Los porcentajes de aislamiento de estos géneros en las muestras de jamón y de ambiente fueron similares, lo que sugiere que la microbiota que se desarrolla en la superficie de los jamones podría estar determinada por los hongos presentes en el ambiente de las cámaras.

TERCERA

La caracterización de los hongos mediante ap-PCR dio como resultado un gran número de patrones moleculares diferentes. El dendrograma resultante del análisis de los patrones de bandas puso de manifiesto una gran diversidad genética entre las especies de hongos aisladas. La técnica presentó un nivel de resolución muy elevado permitiendo caracterizar los hongos aislados a nivel de especie.

CUARTA

La secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal de un total de 74 cepas representativas, seleccionadas en base a criterios morfológicos y moleculares, permitió llevar a cabo la identificación de estas cepas a nivel de especie. Dentro del género *Penicillium*, el

género con mayor número de cepas secuenciadas, se identificaron un total de 16 especies. De ellas, *Penicillium commune* (32,43%) y *Penicillium chrysogenum* (17,57%) fueron las más numerosas.

QUINTA

El árbol filogenético resultante del análisis de secuencias mostró una pequeña variabilidad genética de las secuencias ITS de las cepas de *Penicillium* analizadas, obteniendo agrupamientos con bajos niveles de significación. La gran variabilidad genética observada con los patrones de ap-PCR no se correlacionó con la variabilidad de las secuencias ITS. Estos resultados podrían indicar que, para poder establecer relaciones filogenéticas consistentes entre las especies de *Penicillium* identificadas en este estudio, sería necesario analizar otras secuencias filogenéticamente informativas y que presentasen mayor variabilidad.

SEXTA

El estudio de la producción de ácido ciclopiazónico (CPA) *in vitro* mostró que, de las 74 cepas previamente identificadas molecularmente, el 37,84% (28 cepas) fueron capaces de producir la micotoxina en medio de cultivo Czapeck. El mayor porcentaje de cepas productoras de CPA correspondió a la especie *P. commune* (62,5%), con un valor promedio de producción de 1168,28 µg/g de medio de cultivo y un valor máximo de 5206,10 µg/g de medio de cultivo. Del total de cepas de *P. commune* productoras de CPA, 6 cepas presentaron una gran capacidad de producir la micotoxina. Las cepas de *P. polonicum* mostraron igualmente una elevada producción de CPA.

SÉPTIMA

De las 74 cepas estudiadas para la producción de ocratoxina A (OTA) *in vitro*, el 14,86% (11 cepas) fueron capaces de producir OTA en medio de cultivo Czapeck Yeast Agar, presentando una capacidad ocratoxigénica, en general, moderada. Se detectaron cepas productoras de OTA pertenecientes a las especies *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. polonicum* y *P. verrucosum*. De ellas, las cepas de *P. verrucosum* fueron las que presentaron mayor capacidad de producción, con un valor medio de 3,76 µg/g de medio de cultivo.

OCTAVA

Un total de 7 cepas pertenecientes a las especies *P. commune*, *P. polonicum* y *P. verrucosum* mostraron capacidad para producir al mismo tiempo CPA y OTA, habiéndose aislado todas ellas a partir de muestras de jamón.

NOVENA

El estudio de la presencia de micotoxinas (CPA y OTA) en 10 muestras comerciales de jamón reveló la existencia de CPA y OTA en 8 y 7 muestras, respectivamente. Los niveles de contaminación fueron bajos, con valores comprendidos entre 0,0362 y 2,4955 µg/g de jamón para el CPA, y entre 0,0021 y 0,0116 µg/g de jamón para la OTA. En estas muestras contaminadas con CPA y OTA se había detectado previamente una proporción elevada de cepas de *Penicillium* productoras de dichas micotoxinas, lo que indica que la contaminación de los jamones podría deberse a la presencia de los hongos toxigénicos en la superficie del jamón.

DÉCIMA

El análisis de la capacidad lipolítica de los hongos aislados mostró que la mayoría de ellos (94,59%) presentaban actividad lipolítica frente a al menos uno de los ácidos grasos

testados. La mayor actividad lipolítica se observó frente a los ácidos láurico y oleico. Del total de cepas que mostraron actividad lipolítica, la mayoría (81,43%) pertenecían al género *Penicillium*, destacando las especies *P. commune* y *P. chrysogenum*.

UNDÉCIMA

El análisis de la capacidad proteolítica reveló que el 52,70% del total de hongos estudiados presentaban actividad proteolítica frente a la caseína. La mayoría de estos hongos (84,61%) pertenecían al género *Penicillium*, siendo las especies *P. commune* y *P. chrysogenum* las que mayor número de cepas con actividad proteolítica presentaron, con 13 y 6 aislados proteolíticos, respectivamente.

DUODÉCIMA

El análisis electroforético de los fragmentos resultantes de la hidrólisis de la miosina porcina mostró que las cepas que presentaron un mayor grado de hidrólisis coincidían con aquellas en las que se había detectado una mayor actividad proteolítica frente a la caseína, concretamente, *C. cladosporioides* (H09-5) y *P. commune* (H09-89).

DECIMOTERCERA

Se proponen como cultivos iniciadores en la elaboración del jamón 2 cepas pertenecientes a las especies *P. commune* (H09-89) y *C. cladosporioides* (H09-5), ya que presentaron una importante actividad proteolítica y lipolítica y además no fueron productoras de CPA y OTA *in vitro*, aunque sería necesario estudiar en profundidad la capacidad toxigénica de dichas cepas para garantizar que no son capaces de producir otras micotoxinas.

V. RESUMEN

En la elaboración del jamón curado los hongos que forman parte su biota superficial desempeñan un papel importante ya que, además de producir reacciones lipolíticas y proteolíticas, algunas especies pueden producir micotoxinas. Este hecho es de especial importancia en procesos de elaboración artesanal, como el del jamón D.O.P. de Teruel, en los que no se emplean cultivos iniciadores, pudiendo desarrollarse en superficie una población fúngica incontrolada que puede afectar a la salubridad y calidad sensorial del producto.

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar la biota fúngica del jamón D.O.P. de Teruel, prestando especial atención al estudio de su capacidad toxigénica y enzimática. El estudio se realizó en dos secaderos adscritos a la D.O.P. de Teruel, aislándose un total de 338 cultivos puros de la superficie del jamón y del ambiente de las cámaras de procesado, en 3 etapas de elaboración: postsalado, secado y envejecimiento. Los mayores recuentos fúngicos se obtuvieron en la etapa de envejecimiento, siendo el género mayoritario *Penicillium* (221 cepas). A continuación se realizó una caracterización molecular de las cepas de *Penicillium* mediante la técnica de ap-PCR, dando como resultado un gran número de patrones moleculares diferentes. El dendrograma resultante del análisis de los patrones de bandas puso de manifiesto una gran diversidad genética de las cepas de *Penicillium* aisladas del jamón.

También se seleccionaron 74 cepas representativas de la variabilidad morfológica y molecular, para su identificación a nivel de especie mediante la secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal. Dentro del género *Penicillium*, el género con mayor número de cepas secuenciadas, se identificaron un total de 16 especies. De ellas, *Penicillium commune* (32,43%) y *Penicillium chrysogenum* (17,57%) fueron las más abundantes. El árbol filogenético resultante del análisis de secuencias mostró una variabilidad genética muy pequeña en las secuencias ITS de las cepas de *Penicillium* analizadas, obteniendo agrupamientos con bajos niveles de significación.

Por otro lado, se estudió la capacidad de producción de ácido ciclopiazónico (CPA) y ocratoxina A (OTA) en medio de cultivo de las 74 cepas secuenciadas. Los análisis cromatográficos de dicho estudio indicaron que el 37,84% de las cepas fueron productoras de CPA, siendo *P. commune* la especie que presentó mayor capacidad de producción (62,5% de las cepas productoras). Respecto a los hongos productores de OTA, el 14,86% de las cepas mostró dicha capacidad aunque en niveles moderados. Las cepas productoras de OTA pertenecían a las siguientes especies: *Penicillium verrucosum*, *P. commune*, *Penicillium polonicum* y *P. chrysogenum*.

Asimismo, se estudió la contaminación por CPA y OTA en 10 muestras comerciales de jamón curado de los dos secaderos muestreados. Se detectó CPA y OTA en 8 y 7 muestras de jamón, respectivamente.

Finalmente, se estudió la actividad proteolítica y lipolítica de las 74 cepas secuenciadas, siendo las especies *P. commune*, *P. chrysogenum* y *Cladosporium cladosporioides* las que presentaron mayor capacidad enzimática.

VI. SUMMARY

Molds play a key role in dry-cured ham production because of their ability to produce mycotoxins and their ability to produce lipolytic and proteolytic activities. Dry-cured Teruel ham is not usually inoculated with starter cultures, so an unwanted fungal population could grow on the surface and reduce their hygienic-sanitary and sensory quality.

The aim of the present study was to characterize natural mycobiota occurring in dry-cured Teruel ham, paying special attention to the incidence of mycotoxin-producing fungi and enzymatic-producing fungi. A total of 338 fungal colonies were isolated from three stages of production including postsalting, drying and aging in two manufacturing plants. Fungi were isolated from both the surface of dry-cured hams and the environment of the chambers. The results show that fungi were more frequently isolated from the aging stage and the predominant filamentous fungal genus isolated was *Penicillium* (221 strains). Then, molecular characterization of *Penicillium* strains by ap-PCR technique was carried out, obtaining a large number of different molecular patterns. The dendrogram analysis of banding patterns revealed a high genetic diversity of strains of *Penicillium* isolated.

Also, a total of 74 out 338 fungal strains were selected, by morphological and molecular criteria, for identification at species level by ITS sequencing. Within *Penicillium*, the genus with the largest number of strains sequenced, sixteen *Penicillium* species were identified being *Penicillium commune* (32.43%) and *Penicillium chrysogenum* (17.57%) the most abundant.

On the other side, potential ability to produce cyclopiazonic acid (CPA) and ochratoxin A (OTA) in vitro was studied in 74 sequenced strains. Results indicated that 37.84% of fungal strains produced CPA, being *P. commune* the species that showed higher production ability (62.5% of the producing strains). With respect to OTA-producing fungi, a low percentage of fungal strains (14.86%) were able to produce OTA in moderate levels. OTA-producing fungi belonged to different *Penicillium* species including *Penicillium verrucosum*, *P. commune*, *Penicillium polonicum* and *P. chrysogenum*.

Otherwise, ten dry-cured ham samples belonged to the last stage of two manufacturing plants included in the study were analyzed allowing to assess the presence of CPA and OTA. CPA was detected in 8 of 10 ham samples and OTA was detected in 7 of 10 ham samples analyzed.

Finally, the same 74 strains identified at species level were tested for proteolytic and lipolytic activities. The strains which showed greatest proteolytic and/or lipolytic activity belong to the species *P. commune*, *P. chrysogenum* and *Cladosporium cladosporioides*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abouzied, M.M., Horvath, A.D., Podlesny, P.M., Regina, N.P., Metodiev, V.D., Kamenova-Tozeva, R.M., Niagolova, N.D., Stein, A.D., Petropoulos, E.A. y Ganev, V.S. (2002). Ochratoxin A concentrations in food and feed from region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants* 19, 755-764.
- Abramson, D., Richter, W., Rintelen, J., Sinha, R.N. y Scuster, M. (1992). Ochratoxin A production in bavarian cereal grains stored al 15 and 19% moisture content. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 259-265.
- Alonso, M. (2004). *Efecto de la utilización de cultivos iniciadores de Penicillium chrysogenum Pg222, Debaryomyces hansenii Dh345 y Staphylococcus xylosus Sx5EA en productos cárnicos*. Universidad de Extremadura, España: Tesis Doctoral.
- Alperden, I., Mintzloff, H.J., Tauchmann, F. y Leistner, L. (1973). Untersuchungen über die Bildung des Mycotoxins patulin in rohwurst. *Die Fleischwirtschaft*, 566-569.
- Andersen, S.J. (1995). Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection* 4, 352-454.
- Andrade, M., Rodríguez, M., Casado, E., Bermúdez, E., y 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 (6), 578-586.
- Andrade, M.J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J.J. y 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.
- Apostolov, K. y Spasic, P. (1975). Evidence of a viral aetiology in endemic (Balkan) nephropathy. *Lancet* 2, 1271-1273.
- Aresta, A., Cioffi, N., Palmisano, F. y Zambonin, C.G. (2003). Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5232-5237.
- Asefa, D., Glerde, R., Sidhu, M., Langsrud, S., Kure, C., Nesbakken, T. y Skaar, I. (2009). Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Microbiology* 128(3), 435-439.
- Ayres J.C., Mundt J.O. y Sandine W.E. (1980). *Microbiology of foods*. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M. y Moussa, L.A. (1998). Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical*

Bulletin Academia Sinica 39, 279-285.

- Bailly, J.D., Tabuc, C., Quérim, A. y 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.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M. and Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2389-2394.
- Barna-Vetró, I., Solti, L., Téren, J., Gyöngyösi, Á., Szabó, E. y Wölfling, A. (1996). Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 4071-4074.
- Battilani, P. y Pietri A. (2002). Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology* 108, 639-643.
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R. y Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* Populations in Dry-Cured Ham Manufacturing Plants. *Journal of Food Protection* 70, 975-980.
- Bello-Gutiérrez, J. (2008). *Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos: Perspectivas desde la Unión Europea*. Madrid: S.A. Ediciones Diaz de Santos.
- Benito, M.J., Rodríguez, M., Núñez, F., Asensio, M.A., Bermúdez, M.E. y Córdoba, J.J. (2002). Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7), 3532-3536.
- Benito, M.J., Córdoba, J.J., Alonso, M., Asensio, M.A. y Núñez, F. (2003). Hydrolytic activity of *Penicillium chrysogenum* Pg222 on pork myofibrillar proteins. *International Journal of Food Microbiology* 89, 155-161.
- Bennet, J.W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Berni, E., Degola, F., Cacchioli, C., Restivo, F. y Spotti, E. (2011). Polyphasic approach for differentiating *Penicillium nordicum* from *Penicillium verrucosum*. *Food Additives and Contaminants* 28(4), 477-484.
- Betina, V. (1993). Thin layer chromatography of mycotoxins. En: *Chromatography of mycotoxins. Techniques and applications*. Ed: Betina, V. Elsevier, Amsterdam. pp: 141-251.
- Blount, W.P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys* 9, 52-61.

- Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S. y Heller, K.J. (1999). Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture. *Systematic and Applied Microbiology* 22 (3), 479-485.
- Bogs, C., Battilani, P. y Greisen, 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.
- Bolzoni, L., Barbieri, G. y Virgili, R. (1996). Changes in volatile compounds of Parma ham during maturation. *Meat Science* 43, 301-310.
- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J. y Rossen, L. (1996). Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142, 541-549.
- Bràgulat, M.R., Bau, M., Abarca, M.L., Minguez, S., y Cabañez, F.J. (2006). Ochratoxina A producing fungi from spanish vineyards. En A. Hocking, R. Samson, J. Pitt, y Thrane U. *Advances in Food Mycology* (págs. 173-179). Springer US.
- Bridge, P.D. y Hawksworth, D.L. (1984). The API ZYM enzyme testing system as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. *Microbiology Science* 1, 232-234.
- Bridge, P.D., Hawksworth, D.L., Kozakiewicz, Z., Onions, A.H.S., Paterson, R.R.M. y Sackin, M.J. (1989). A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. II. *Identification Journal Genetic Microbiology* 135, 2967-2978.
- Bruna, J.M., Hierro, E.M., de la Hoz, L., Mottram, D.S., Fernández, M. y Ordóñez, J.A. (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 85 (1-2), 111-125.
- Bruns, T., y Shefferson, R. (2004). Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany* 82 (8), 1122-1132.
- Bullerman, L.B., Hartman, P.A. y Ayres, J.C. (1969). Aflatoxin production in meats. II. Aged dry salamis and aged country cured hams. *Journal of Applied Microbiology* 18, 718-722.
- Bullerman, L.B. (1997). Fusaria and toxigenic molds and other Aspergilli and Penicillia, 419-434, en: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington.

- Burdock, G.A. y Flamm, W.G. (2000). Review article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. *International Journal of Toxicology* 19, 195-218.
- Burgos, J. (1981). Las decoloraciones en los productos cárnicos. *Cárnica* 2000 abril, 49-56.
- Buscailhon, S., Berdagué, J.L. y Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63, 69-75.
- Buscailhon, S. y Monin, G. (1994a). Déterminisme des qualities sensorielles du jamon sec. *Viandes et produits Carnés*, 15 (1): 23-34; 15 (2): 39-48.
- Buscailhon, S. y Monin, G. (1994b). Factors affecting sensory quality of dry ham. *Viandes et Produits Carnes* 15 (1), 22-24.
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S. y Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* 79, 213-215.
- Cabañes, F.J., Bragulat, M.R. y Castella, G. (2010). Ochratoxin a producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins (Basel)* 2(5), 1111-120.
- Cairns-Fuller, V., Aldred, A. y 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(5), 1215-1221.
- Canela, R., Vialdrich, R., Velazquez, C., y Sanchis, V. (1994). A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. *Mycopathologia* 125, 29-32.
- Cantoni, C., D'Aubert, S. y Cattaneo, P. (1977). Le muffe e gli alimenti carnei. *Industria Alimentari* 16, 90-97.
- Carbone, I. y Kohn, L. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* 91, 415-427.
- Carrascosa, A.V. y Cornejo, I. (1991). Characterization of Micrococcaceae strains selected as potential strater cures to Spanish dry-cured ham processes. 2. Slow process. *Fleischwirtsch* 71, 1187-1188.
- Castella, G., Ostenfeld, L., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P. y Geisen, R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology* 25(1), 74-83.

- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J. y Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscle of the Iberian pigs. *Meat Science* 45(2), 263-270.
- Céspedes-Sánchez, F.J., Ortega-Mariscal, M.A., Martín-Serrano, A.M., Torres-Muñoz, M.C. y León-Crespo, F. (2001). Influence of temperature on proteolytic activity of indigenous Spanish molds in meat products. *Journal of Muscle Foods* 12, 263-273.
- Chander, H., Singh, J. y Khanna, A. (1980). Role of lipids on the growth and lipase production by *Penicillium chrysogenum*. *Milchwissenschaft* 35, 153-156.
- Chen, A.J., Huang, L.F., Wang, L.Z., Tang, D., Cai, F. y Gao, W.W. (2011). Occurrence of toxigenic fungi in ochratoxin A contaminated liquorice root. *Food Additives and Contaminants* 28, 1091-1097.
- Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., y Spotti, E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorometric method. *Food Additives and Contaminants* 19, 575-579.
- Chinaglia, S., Chiarelli, L.R., Valentini, G. y Picco, A.M. (2012). Selection of microfungi with high lipolytic activity and their lipase characterization. *Environmental Engineering and Management Journal* 11(3), Supplement S35-S52.
- Chrzanowska, J., Kolczkowska, M. y Polanowski, A. (1993). Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. *Enzyme and Microbial Technology* 15(2), 140-143.
- Ciegler, A., Fennell, D.I., Sansing, G.A., Detroy, R.W. y Bennett, G.A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Journal of Applied Microbiology* 26, 271-278.
- Ciegler, A., Lee, L.S. y Dunn, J.J. (1981). Production of naphthoquinone mycotoxins and taxonomy of *Penicillium viridicatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 42, 446-449.
- Cigic, I.K. y Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 62-115.
- Clarke, J.R., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. y Pitura, R.J. (1994). Quantification of ochratoxin A in swine kidneys by enzyme-linked immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure. *Journal of Food Protection* 57, 991-995.

- Cole, R.J. (1984). *Cyclopiazonic acid and related toxins*. Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification. V. Vetina, ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. Pgs: 404-414.
- Cole, R.J. y Scheweikert, M.A. (2003a). Handbook of secondary fungal metabolites. Vol. 1. Academic Press, New York.
- Cole, R.J. y Scheweikert, M.A. (2003b). Handbook of secondary fungal metabolites. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Cole, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R. y Iacumin, L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology* 96, 29-34.
- Colombo, F., Vallone, L., Giaretti, M. y Dragoni, I. (2003). Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Food Control* 14, 137-140.
- Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R. y Iacumin, L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Protection* 96, 29-34.
- Córdoba, J.J., Antequera, T. y Ventanas, J. (1994). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of iberian ham. *Meat science* 37, 217-227.
- Coutron-Gambotti, C., Gandemer, G. y Rousset, S. (1999). Reducing salt of dry-cured ham effect on lipid composition and sensory attributes. *Food Chemistry* 51, 215-219.
- Creppy, E.E., Baudrimont, I. y Betbeder, A.M. (1995). Ochratoxines et conséquences en toxicologie. *Cryptogamie Mycology* 16, 195-221.
- Creppy, E.E. (1999). Human ochratoxicosis. *Human ochratoxicosis*, 277-293.
- Cruickshank, R.H. y Pitt, J.I. (1987). Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia* 79, 614-620.
- Curran, J., Driver, F., Ballard, J.W.O. y Milner, R.J. (1994). Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of rissosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 98, 547-551.
- Curtui, V., Gareis, M., Usleber, E. y Märtilbauer, E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B and zearalenone. *Food Additives and Contaminants* 18, 730-738.
- Czerwiecki, L. (2001). Ochratoxin A and others mycotoxins in Polish cereals and foods. *Mycotoxins Research* 17, 125-128.

- Czerwiecki, L., Czajkowska, D. y Witkowska-Gwiazdowska, A. (2002). On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additives and Contaminants* 19, 470-477.
- Dabirian, S. (2005). Identification and isolation of fungi flora in raw milk in Tehran province, identification of their enzymogenicity and toxinogenicity and the effect of heat treatments on them. Ph.D. Thesis. University of Tehran-Faculty of Veterinary.
- Díaz, M.C. (1999). Caracterización de mohos toxigénicos aislados de jamón curado mediante técnicas de ácidos nucleicos, cromatográficas y electroforéticas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G.D., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (1997). Proteolysis in dry-fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Science* 46, 115-128.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Zlender, V., Cvjetković, B., Jurjević, Z., Topolovec-Pintarić, S. y Ivić, D. (2005). Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 43, 427-432.
- Dorner, J.W., Cole, R.J. y Diener, U.L. (1984). The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia* 87, 13-15.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., Erlington, D.J., Suksupath, S., McDowell, G.H. y Bryden, W.L. (1994). Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42, 1516-1518.
- Dragoni, I., Marino, C. y Cantoni, C. (1980). "Bresaole" and raw hams surface moulds. *Industria Alimentare* 19 (172), 405-407.
- Dunaevskii, IaE., Gruban, T.N., Beliakova, G.A. y Belozerskii, M.A. (2006). Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis. *Mikrobiologija* 75(6), 747-751.
- Eckardt, C., Ramming, G., Trapper, D. y Leistner, L. (1979). Vorkommen toxinogener *Penicillium*-Arten bei Lebens- und futtermitteln. *Jahresber. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach*, C. 24-25.
- El-Banna, A.A, Fink-Gremmels, J. y Leistner, L. (1987a). Investigation of *Penicillium chrysogenum* isolates for their suitability as starter cultures. *Mycotoxin Research* 3(2), 77-83.

- El-Banna, A.A., Pitt, J.I. y Leistner, L. (1987b). Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 42-46.
- El-Kady, I., El-Maraghi, S., y Zohri, A. (1994). Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiological Research* 149, 297-307.
- Enser, M., Hallett, K., Hewett, B., Fursey, G.A.J. y Wood, J.D. (1996). Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Science* 44, 443-458.
- Escher, F., Koehler, P. y Ayres, J. (1973). Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Journal of Applied Microbiology* 26, 27-30.
- Espinel-Ingroff, A., Goldson, P.R., McGinnis, R. y Kerkering, T.M. (1988). Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 26(2), 301-307.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*. 1995.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*. 1999.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain mycotoxins (Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*. 2002.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: *Evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*. 2007.
- Fernández-Bodega, M.A., Mauriz, E., Gómez, A. y Martín, J.F. (2009). Proteolytic activity, mycotoxins and andrastatin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 136(1), 18-25.
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A. y Franzetti, L. (1999). Production of cyclopiazonic acid by molds isolated from taleggio cheese. *Journal of Food Protection* 62, 1198-1202.
- Flores, M., Aristoy, M.C. y Spanier, A.M. (1997). Non-volatile components effects on quality of "serrano" dry-cured ham as related to processing time. *Journal of Food Science* 62, 1235-1239.

- Francisco, J.J., Gutiérrez, L.M., Menes, I., Garcia, M.L., Diez, V. y Moreno, B. (1981). Flora microbiana del jamón crudo curado. *Anales de Bromatología* 33, 257-272.
- Freeman, S. y Shabi, E. (1996). Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 395-404.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A. y Maymon, M. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110, 361-370.
- Frisvad, J.C. (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 568-579.
- Frisvad, J.C. (1985). Creatine-sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology* 1, 109-113.
- Frisvad, J.C. (1986). Taxonomic approaches to mycotoxin identification. pp. 415-157 En: *Modern methods in the analysis and structure elucidation of mycotoxins*. Cole, R.J. (ed.) *Academic Press, New York*.
- Frisvad, J.C. (1989). The connection between the Penicillia and Aspergilli and Mycotoxins with Special Emphasis on Misidentified Isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 452-467.
- Frisvad, J.C. (1993). Modifications on media based on creatine for use in *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. *Letters in Applied Microbiology* 16, 154-157.
- Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1983). Classification of Terverticillate Penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 46(6), 1301-1310.
- Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: Chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81, 837-861.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49, 201-241.
- Frisvad, J.C. y Thrane, U. (1996). Mycotoxin production by food-borne fungi. En: *Introduction to food-borne fungi*. 5 Ed. Ed: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. CBS, Baarn, Holanda, 251-260.

- Frisvad, J.C. y Thrane, U. (2002). Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (Eds.), *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 6 edn. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht* 321-331.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F. y Samson, R.A. (2000). The homogenous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. In: Samson, R.A., Pitt, J.J. Ed. *Integration of Modern Taxonomic Method for Penicillium and Aspergillus Classification*, 265-284. Harwood academic Publishers, Amsterdam.
- Frisvad, J.C., Smedgaard, J., Larsen, T.O. y Samson R.A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 49, 201-241.
- Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. y Clarke, J.R. (1997). Enzymatic and immunological approaches for the quantitation and confirmation of ochratoxin A in swine kidneys. *Journal of Food Protection* 60, 172-176.
- Galtier, P. y Le Bars, J. (1973). Toxins from *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. 1. Production of ochratoxins by strains isolated from dry forages, cultured on wheat. *Annals of Veterinary Research* 4, 487-497.
- Galvalisi, U., Lupo, S., Piccini, J. y Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Revista Argentina de Microbiología* 44, 36-42.
- Gareis, M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Additives and Contaminants* 13, 35-37.
- Gareis, M. y Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51, 102-104.
- Gareis, M. y Wolff, J. (2000). Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses* 43(1), 79-83.
- Geisen, R., Glenn, E. y Leistner, L. (1990). Two *Penicillium camemberti* mutants affected in the production of cyclopiazonic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 56(11), 3587-3590.
- Geisen, R., Luecke, F.K. y Kroeckel, L. (1992). Starter and protective cultures for meat products. *Fleischwirtsch* 72, 894-901.
- Gimeno, A. y Martins, M.L. (1982). Multimycotoxin method for analysis of 17 mycotoxins in raw materials, mixed feeds, food products and animal tissues by thin layer chromatography. Comunicación en: V International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Viena, Septiembre 1982. pp: 24-27.

- Giridhar, P. y Reddy, S.M. (1997). Incidence of mycotoxin producers on spices from Andhra Pradesh. *Journal of the Indian Botanical Society* 76, 161-164.
- Giridhar, P. y Reddy, S.M. (1998). Incidence of fungi in relation to mycotoxins on garlic and onion bulbs in Andhra Pradesh. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 28, 347-350.
- Giridhar, P. y Reddy, S.M. (2001). Mycobiota and potential mycotoxins of date fruit. *Journal of Food Science and Technology* 38, 418-420.
- Glenza, A. y Ben Jaballah, L. (1985). Study of the lipolytic system of *Penicillium verrucosum* var *cyclopium* (Westling). II. Conditions for the production of the lipase system. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 62(1-2), 69-89.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. y Gettinby, G. (1996). The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia* 136(2), 103-108.
- Halls, N.A. y Ayres, J.C. (1973). Potential production of sterigmatocystin on country cured ham. *Journal of Applied Microbiology* 26, 636-637.
- Hayashi, Y. y Yoshizawa, T. (2005). Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. *Food Chemistry* 93, 215-221.
- Hill, J.E., Lomax, L.G., Cole, R.J. y Dorner, J.W. (1986). Toxicologic and immunologic effects of sublethal doses of cyclopiazonic acid in rats. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1174-1177.
- Hills, D., y Bull, J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42, 182-192.
- Höhler, D. (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z Ernährungswiss* 37, 2-12.
- Holzapfel, C.W. (1968). The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* westling. *Tetrahedron* 24 (5), 2101-2119.
- Horn, B.W. y Dorner, W. (1999). Regional differences in production of aflatoxin B₁ and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4), 1444-1449.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. *Studies in Mycology* 70, 53-138.

- Huerta, T., Sanchis, V., Hernández-Haba, J. y Hernández, E. (1987). Enzymatic activities and antimicrobial effects of *Aspergillus* and *Penicillium* strains isolated from Spanish dry-cured ham. *Microbiologie Aliments Nutrition* 5, 289-294.
- Huerta, T., Hernandez, J., Guamis, B. y Hernandez, E. (1988). Microbiological and physico-chemical aspects in dry-salted Spanish ham. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 143(6), 475-482.
- Hunter, P. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1903-1905.
- Hussein, H.S. y Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-134.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C. y Orlic, S. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology* 26, 65-70.
- Iacumin, L., Manzano, M. y Comi, G. (2012). Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and Ochratoxin A contamination of sausages using ozonated air. *Food Microbiology* 29(2), 229-232.
- Iakovleva, M.B. y Kozel'tsev, V.L. (1994). Proteolysis of collagen by several species of micromycetes and spore-forming bacteria. *Prikl Biokhim Mikrobioly* 30(1), 121-126.
- Incze, K., Mihalyi, V. y Frank, H.K. (1976). Beteht eine Mykotoxingefahr bei der ungarischen salami. III: Teil: Chemisch-analytische und biologische Untersuchungen an schnittfesten Salamipoben. *Die Fleischwirtschaft*, 1616-1618.
- International Agency for Research on Cancer: Some naturally occurring substances. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 1976, 10.
- International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 1993, 56.
- International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and Styrene. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 2002, 82.
- Janke, T., Schwaiger, K., Ege, M., Fahn, C., von Mutius, E., Bauer, J. y Mayer, M. (2013). Analysis of the fungal flora in environmental dust samples by PCR-SSCP method. *Current Microbiology* 67(2), 156-169.

- Jiménez, M., Sanchis, V., Mateo, R. y Hernández, E. (1986). *Penicillium* in pre-harvest corn in Valencia (Spain) II. Study of the enzymatic and toxigenic capacities of the species. *Mycopathologia* 96, 13-18.
- Jiménez, A.M., López de Cerain, A., González-Peás, E. y Bello, J. (2001). Determination of ochratoxin A in pig liver-derived patés by high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* 18, 559-563.
- Jönson, A.G. (1967). Pilot-plant production of protease by *Alternaria tenuissima*. *Journal of Applied Microbiology* 15(2), 319-324.
- Jönson, A.G. (1969a). Purification and some properties of a protease from *Alternaria tenuissima*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 129(1), 62-67.
- Jönson, A.G. (1969b). Some enzymic properties of a protease from *Alternaria tenuissima*. *Acta Chemica Scandinavica* 23(6), 1943-1950.
- Jurjevic, A., Solfrizzo, M., Cvjetkovic, B., Avantaggiato, G., Visconti, A. (1999). Ochratoxin A and fumonisins (B1 and B2) in maize from Balkan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia. *Mycotoxin Research* 15, 67-80.
- Kivanc, M., Sert, S. y Hasenekoglu, I. (1992). Production of aflatoxins in sausage, salami, sucuk and kavurma. *Nahrung-Food* 36, 293-298.
- Klich, M. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. (Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures).
- Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M. y Bridge, P.D. (1993). Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species- En: Occurrence and significance of mycotoxins. Ed: Scudamore, K.A. *Central Science Laboratory*, Londres. pp: 64-75.
- Kozlovsky, A.G., Zhelifonova, V.P., Antipova, T.V., Baskunov, B.P., Ivanushkina, N.E. y Ozerskaya, S.M. (2014). Exo-metabolites of mycelial fungi isolated in production premises of cheese-making and meat-processing plant. *Food Additives and Contaminants: Part A* 31(2), 300-306.
- Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R. y Marzin, D. (1987). Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid medium. *Journal of Microbiological Methods* 7, 29-36.
- Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Steiman, R. y Creppy, E.E. (1995). Fungal flora and ochratoxin A production in various food and feed in France. *Systematic and Applied Microbiology* 18, 455-459.

- Krogh, P. (1987). Ochratoxin in foods . In P. Krogh (ed.), *Mycotoxins in food*. Academic Press, London, United Kingdom., 97-110.
- Krska, R., Schubert-Ulrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., Macdonald, S. y Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants* 25, 152-163.
- Kuiper-Goodman, T. y Scott, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* 2, 179-248.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. y Nei, M. (2001). MEGA 2. Versión 2.0. Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.
- Kunz, B., Bluemel, W. y Winckler, U. (1982). Untersuchungen zu Anwendungsmöglichkeiten von Schimmelpilzkulturen fuer Gefluegelbruehwursterzeugnisse. *Fleischwirtsch* 36, 86-87.
- Land, C.J. y Hult, K. (1987). Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium* spp. *Letters in Applied Microbiology* 4, 41-44.
- Larsen, T., Svendsen, A. y Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3630-3635.
- 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.
- Lee, S. y Taylor, J. (1990). Isolation of ADN from fungal mycelia and single spores. En: M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky y T. White, *PCR Protocols. A Guide of Methods and Applications* (págs. 282-287). San Diego: Academic Press.
- Leistner, L. (1984). Toxigenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. *Food Technology Australia* 36, 404-406.
- Leistner, L. (1986). Mould-ripened foods. *Fleischwirtsch* 66, 1385-1388.
- Leistner, L. (1990). Mold fermented foods: Recent developments. *Food Biotechnology* 4, 433-441.
- Leistner, L. y Ayres, J.C. (1967). Mold fungi and meat products. *Fleischwirtsch* 47, 1320-1326.
- Leistner, L. y Ayres, J.C. (1968). Molds and meats. *Fleischwirtsch* 1, 62-65.

- Leistner, L. y Eckardt, C. (1979). Occurrence of toxigenic *Penicillia* in meat products. *Fleischwirtschaft* 59, 1892-1896.
- Leistner, L. y Eckardt, C. (1981). Schimmelpilze und mykotoxine in fleisch und fleischerzeugnissen. En *Mykotoxine in Lebensmittel*. In. Ed. Reiss Journal, 297-341.
- Leistner, L. y Pitt, J.I. (1977). Miscellaneous *Penicillium* toxins, 639-653, en: Rodricks, J.V., Hesselt, C.W. y Mehlman, M.A. ed. *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill.
- Leistner, L. y Rödel, W. (1975). The significance of water activity for microorganisms in meats. En *Water relations of foods*. Londres: R.B. Duckword, Academic Press.
- Leistner, L., Hechelmann, H. y Trapper, D. (1980). *Penicillium chrysogenum*, eine starterkultur für roh wurst, jahresber. *Bundesant. Fleischforsch. Kulmbach*. C22.
- Lillehoj, E.B. y Goranson, B. (1980). Occurrence of ochratoxin- and citrinin-producing fungi on developing danish barley grain. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B* 88, 133-137.
- LoBuglio, K. y Taylor, J. (1993). Phylogenic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* 85, 592-604.
- Logrieco, A., Peterson, S.W. y Wicklow, D.T. (1990). Ribosomal DNA comparisons among taxa of the terverticillate *Penicillia*. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson, R.A., Pitt, J.I. Plenum Press, Londres, 343-355.
- López, M.O., de la Hoz, L., Cambrero, M.I., Gallardo, E., Reglero, G. y Ordóñez J.A. (1992). Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Science* 31, 267-277.
- López-Díaz, T., Santos, J., García-López, M. y Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 68, 69-74.
- Losito, I., Monaci, L., Palmisano, F. y Tantillo, G. (2004). Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1965-1971.
- Lücke, F. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch* 66, 1505-1509.

- Lücke, F. y Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. *Fleischwirtschaft* 67, 307-314.
- Luderman, V., Pose, G., Pollio, L.M. y Segure, J. (2004). Determination of growth characteristics lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology* 96, 13-18.
- Lund, F. (1995). Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology* 20, 228-231.
- Lund, F. y Frisvad, J.C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95(5), 1117-1123.
- Luque, M.I., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gordillo, R., Rodríguez, M. y Córdoba, J.J. (2011). Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products. *Food Control* 22 (12), 1931-1838.
- Lusky, K., Tesch, D., Göbel, R. y Doberschütz, K-D. (1994). Ochratoxin A. Residue behavior in the pig and in food prepared from it. *Fleischwirtschaft* 74, 558-560.
- Magan, N., Jenkins, N.E. y Howarth, J. (1993). Lipolytic activity and degradation of rapeseed oil and rapeseed by spoilage fungi. *International Journal of Food Microbiology* 19(3), 217-227.
- Maksimovic, Z.J. (1991). Selenium deficiency and Balkan endemic nephropathy. *Kidney International Supplements* 34, 512-514.
- Mally, A., Hard, G.C., Dekant, W. (2007). Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2254-2260.
- Mansfield, M.A., Jones, A.D. y Kuldau, G.A. (2007). Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 98(3), 330-336.
- Mantle, P.G. (1991). Miscellaneous toxigenic fungi, 141-152, en: Smith, J.E., Henderson, R.S., eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón.
- Mantle, P.G. y McHugh, K.M. (1993). Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycology Research* 97, 205-212.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Rodríguez, M.M., Núñez, F. y Asensio, M.A. (2001a). Evaluation of microbial proteolysis in meat products by capillary electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology* 90, 163-171.

- Martín, L., Antequera, T., Ventanas, J., Benítez-Donoso, R. y Córdoba, J.J. (2001b). Free amino acids and other non-volatile compounds formed during processing of Iberian ham. *Meat Science* 59, 363-368.
- Martín, A., Asensio, M.A., Bermúdez, M.E., Córdoba, M.G., Aranda, E. y Córdoba, J.J. (2002). Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Science* 62, 129-137.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Benito, M.J., Aranda, E. y Asensio, M.A. (2003). Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *International Journal of Food Microbiology* 84, 327-338.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J. y Asensio, M.A. (2004a). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Microbiology* 94 (1), 55-66.
- Martín, A., Jurado, M., Rodríguez, M., Nuñez, F. y Córdoba, J.J. (2004b). Characterization of moulds from dry-cured meat products and their metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis and random amplified polymorphic DNA PCR. *Journal of Food Protection* 67, 2234-2239.
- 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(1), 8-18.
- Martínez-Culebras, P.V., Crespo-Sempere, A., Sánchez-Hervás, M., Elizaquivel, P., Aznar, R. y Ramón, D. (2009). Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine relation to taxonomy of *Aspergillus* section Nigri. *International Journal of Food Microbiology* 132(1), 33-41.
- Marusic, N., Petrovic, M., Vidacek, S., Petrak, T. y Medic, H. (2011). Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds. *Meat Science* 88(4), 786-790.
- Matrella, R., Monaci, L. Mililli, M.A., Palmisano, F. y Tantillo, M.G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 17, 114-117.
- Mills, J.T. y Abramson, D. (1982). Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapeseed and cereals in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4, 37-41.

- Mills, J.T., Abramson, D., Frohlich, A.A. y Manquardt, R.R. (1989). Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. from stored durum wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11, 357-360.
- Mintzlaff, H.J. y Leistner, L. (1972). Untersuchungen zur selektion eines technologisch geeigneten und toxikologisch unbedenklichen schimmelpilz-stammes für die rohwrstherstellung. *Zentralblatt für Veterinärmedizi Reihe B. 19*, 291-300.
- Mintzlaff, H.J. y Christ, W. (1973). *Penicillium nalgiovensis* als Starterkultur fuer Suedtiroler Bauernspeck. *Fleischwirtsch* 53, 864-867.
- Mintzlaff, H.J., Ciegler, A. y Leistner, L. (1972). Potential mycotoxin problems in mold-fermented sausage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 150, 133-137.
- Miraglia, M., Brera, C. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member States. *Reports on tasks for scientific cooperation, Task 3.2.7*, 69-86.
- Mislivec, P., Trucksess, M. y Stoloff, L. (1988). Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. *Journal of Food Protection* 51, 449-451.
- Mohamed, O., Mohamed, I.A.H. y Metwally, M. (1988). Lipolytic activity of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* and certain properties of their lipids. *Microbios letters* 39, 155-156.
- Moldes-Anaya, A., Asp, T., Eriksen, G., Skaar, I. y Rundberget, T. (2009). Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (18), 3812-3818.
- Molina, I., Silla, H., Flores, J. y Monzo, J.L. (1990). Study of the microbial flora in dry-cured ham. 2. *Micrococcaceae*. *Fleischwirtsch* 2, 47-48.
- Molina, T. y Toldrá, F. (1992). Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Science* 57(6), 1308-1310.
- Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R. y Tantillo, G. (2005). Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 1090, 184-187.
- Monte, E., Villanueva, J. y Domínguez, A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *International Journal of Food Microbiology* 3, 355-359.

- Moslem, M.A., Bahkali, A.H., Abd-Elsalam y Wit, P.J.G.M. (2010). An efficient method for DNA extraction from *Cladosporioides* fungi. *Genetics and Molecular Research* 9(4), 2283-2291.
- Moss, M.O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation, 37-56 en: Smith, J.F., Henderson, R.S., eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón.
- Mossel, D. (1983). Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. *Food Microbiology: Advances and Prospects*, 1-45.
- Motilva, M.J., Díaz-Borrás, M.A. y Vila-Aguilar, R. (1991). Fungal flora present on the surface of cured spanish ham. *Fleischwirtsch* 71 (11), 1300-1302.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontanta-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P. R. y Guiraud, J. P. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 121, 234-241.
- Neethling, D.C y McGrath, R.M. (1977). Metabolic development and mitochondrial changes during cyclopiazonic acid production in *Penicillium cyclopium*. *Canadian Journal of Microbiology* 23(7), 856-872.
- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C. y Miller, J.D. (2006). Production of metabolites from *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3756-3763.
- Nilsson, K. y Ehrenberg, M. (2008). A novel mechanism for activator-controlled initiation of DNA replication that resolves the auto-regulation sequestration paradox. *Lecture Notes in Physics* 752, 189-213.
- Nishi, K., Cole, R.J. y Dorner, J.W. (1985). Toxicity and neuropharmacology of cyclopiazonic acid. *Food and Chemical Toxicology* 23, 831-839.
- North, M.J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of Eucaryotic microorganisms. *Microbiological Reviews* 46(3), 308-340.
- Northolt, M.D., van Egmond, H.P. y Paulsch, W.E. (1979). Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection* 42, 476-484.
- Núñez, F. (1995). Flora fúngica en jamón ibérico y su importancia tecnológica y sanitaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura: Tesis Doctoral.

- Núñez, F., Rodríguez, M.M. y Córdoba, J.J. (1996). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* 32, 185-197.
- Núñez, F., Díaz, M.C., Rodríguez, M., Aranda, E., Martín, A. y Asensio, M.A. (2000). Effects of substrate, water activity and temperature on growth and verucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Protection* 63(2), 231-236.
- Núñez, F., Westphal, C., Bermúdez, E. y Asensio, M. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. *Jouranl of Food Protection* 70 (12), 2829-2836.
- O'Brien, E. y Dietrich, D.R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology* 35, 33-60.
- Oliveira, C.A., Rosmaninho, J. y Rosim, R. (2006). Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 23(2), 196-201.
- Oliveira, M., Amorim, M. I., Ferreira, E., Delgado, L., y Abreu, I. (2010). Main airborne Ascomycota spores: Characterization by culture, spore morphology, ribosomal DNA sequences and enzymatic analysis. *Applied Microbial Biotechnology* 86(4), 1171-1181.
- Ordóñez, J.A., López, M.O., Hierro, E., Gallardo, E., Cambrero, M.I. y de la Hoz, L. (1996). Efecto de la dieta de los cerdos ibéricos sobre la composición en ácidos grasos del tejido adiposo y muscular. *Food Science and Technology International* 2, 383-390.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E., Bruna, J.M. y de la Hoz, L. (1999). Changes in the compounds of dry-fermented sausages during ripening. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, 329-367.
- Ostrý, V. y Polster, M. (1989). Detection of cyclopiazonic acid and its producers in food. *Journal of Veterinary Medicine* 34(7), 421-430.
- Paterson, R.R.M., Bridge, P.D., Crosswaite, M.J. y Hawkaworth, D.L. (1989). A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. III An evaluation of pectinase and amylase isoenzymes for species characterization. *Journal of General Microbiology* 135, 2979-2991.
- Peintner, U., Geiger, J. y Pöder, R. (2000). The mycobiota of Speck, a traditional tyrolean smoked and cured ham. *Journal of Food Protection* 63, 1399-1403.
- Petzinger, E. y Ziegler, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23, 91-98.

- Petzinger, E. y Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76, 245-250.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M. (2002). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on a etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 19, 282-302.
- Pietri, A., Bertuzzi T, Gualla, A. y Piva, G. (2006). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. *Italian Journal of Food Science* 18, 1-8.
- Pietri, A., Gualla, A., Rastelli, S. y Bertuzzi, T. (2011). Enzyme-assisted extraction for the HPLC determination of ochratoxin A in pork and dry-cured ham. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 28(12), 1717-1723.
- Pinto-Kempka, A., Lamb-Lipke, N., Fontura-Pineiro, T.L., Menonsin, S., Treichel, H., Freire, D.M.G., Diluccio, M. y Oliveira, D. (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(2), 119-125.
- Pitt, J.I. (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65, 1135-1157.
- Pitt, J.I. (1979). The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. Londres, Gran Bretaña.
- Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (2), 266-269.
- Pitt, J.I. (1993). A modified creatine sucrose medium for differentiation of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 559-563.
- Pitt, J.I. (1997). Toxigenic *Penicillium* species. 406-418, en: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T-J., eds. Food Microbiology. *Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington.
- Pitt, J.I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56 (1), 184-192.
- Pitt, J.I. y Hocking, A. (1985). *Fungi and food spoilage*. Sidney: Academic Press.

- Pitt, J.I. y Hocking, A. (1997). *Fungi and food spoilaige*. Londres, Gran Bretaña: Blackie Academic and Pprofesional.
- Pitt, J.I., Cruickshank, R.H. y Leistner, L. (1986). *Penicillium commune, Penicillium camembertii*, the origin of white cheese moulds and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology* 3, 363-371.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire.-Toulouse*.
- Pleadin, J., Persi, N., Kovacevic, D., Vahcic, N., Scortichini, G. y Milone, S. (2013). Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produce from sub-chronic-exposed pigs. *Food Additives and Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 30(10), 1827-1836.
- Polizzi, V., Adams, A., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A. y De Kimpe, N. (2012). Influence of various growth parameters on fungal growth and volatile metabolite production by indoor molds. *Science of the Total Environment* 414, 277-286.
- Polonelli, L., Morace, G., Rosa, R., Castagnola, M. y Frisvad, J. (1987). Antigenic characterization of *Penicillium camemberti* and related common cheese contaminants. *Applied and Environmental Microbiology* 53(4), 872-878.
- Prasongsidh, C. (1998). Fate of the Neurotoxic Mycotoxin, Cyclopiazonic Acid in Dairy Products. Ed.: *University of Western Sydney, Hawkesbury theses*.
- Racovita, A. y Racovita, A. (1971). Untersuchungen ueber den Schimmelpilz *Penicillium expansum* Lk. Der zur Meimpfung der Hermannstaedter Dauerwurstsorte verwendet wird. *Fleischwirtsch* 51, 1224-1226.
- Rao, B.L. y Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing 'kodua poisoning' in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia* 89, 177-180.
- Resnik, S.L., González, H.H., Pacin, A.M., Viora, M., Caballero, G.M. y Gros, E.G. (1996). Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research* 12(2), 61-66.
- Riley, R.T. y Goeger, D.E. (1992). Cyclopiazonic acid: speculations on its function in fungi. In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Aroa, D.K. (Eds.), *Handbook of Applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems*, vol. 5. Marcel Dekker, New york, NY, p. 385-342.

- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus spp.* and *Micrococcus spp.* isolated from iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology* 24 (1-2), 32.
- Rodríguez, M., Núñez, F. y Córdoba, J.J. (1998). Evaluation of proteolytic activity of microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Applied Microbiology* 85, 905-912.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesen, A.F y Córdoba, J.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(3), 226-235.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J. y Córdoba, J.J. (2012). Presene 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 de Ledesma, A., Núñez, F., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1996). Verrucosidin production by *Penicillium aurantiogriseum* on different cultural conditions. *Food Micro'96*. Budapest.
- Rodríguez-Martín, A., Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M.J. y Asensio M.A. (2010). Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2), 519-528.
- Rohlf, F.J. (2002). NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.10. *Exeter Software, Setauket, NY*.
- Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F. y Pozo, R. (1991). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology* 13, 249-256.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4), 406-425.
- Samson, R.A. y Frisvad, J.C. (2004). *Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes, mycotoxins and others extrolites*. Wageningen: CBS.
- Samson, R.A. y Pitt, J.I. (2000). *Integration of modren taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus Clasification*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers .

- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. y Frisvad, J.C. (2004a). *Introduction to food and airborne fungi*. Wageningen: CBS.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P. y Frisvad, J.C. (2004b) Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology* 49, 175-200.
- Sánchez, B., Rodríguez, M., Casado, E.M., Martín, A. y Córdoba, J.J. (2008). Development of an efficient fungal DNA extraction method to be used in Random Amplified Polymorphic DNA-PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. *Journal of Food Protection* 71(12), 2497-2503.
- Sanchis, V., Viñas, I., Jiménez, M., Calvo, M.A. y Hernández, E. (1982). Mycotoxin-producing fungi isolated from bin-stored corn. *Mycopathologia* 80, 89-93.
- Sárraga, C., Gil, M. y García-Regueiro, J.A. (1993). Comparison of calpain and capthesin (B, L and D) activities during dry-cured ham processing from heavy and light large white pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 71-75.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F. y Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology* 17, 189-199.
- Schmidt-Heydt, M., Graf, E., Stoll, D. y Geisen, R. (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiology* 29(2), 233-241.
- Schwartz, G. (2002). Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer. *Cancer Causes and Control* 13, 91-100.
- Scolari, G., Sarra, P.G. y Baldini, P. (2003). Mikrobiologija suhega mesa. V: Mikrobiologija zibil zivalskega izvora. Bem, Az. Adamic, J., Zlender, B., Smole Mozina, S. y Gasperlin, L. (ur.). *Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo*, 351-362.
- Scott, P.M., van Walbeek, W., Kennedy, B. y Anyeti, D. (1972). Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and strigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 1103-1109.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Canela, R., Lombaert, G.A. y Bacler, S. (1991). Determination of ochratoxin A in meat by liquid chromatography. *Prehrambena-technologie Biotehnology* 29, 61-64.

- Seifert, K.A. y Louis-Seize, G. (2000). Phylogeny and species concepts in the *Penicillium aurantiogriseum* complex as inferred from partial B-tubulin gene DNA sequences. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson, R.A., Pitt, J.I. Harwood Publishers, Amsterdam, 129-138.
- Seitz, E. (1990). Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 73, 3664-3691.
- Selgas, M.D., Casas, C., Toledo, V.M. y García, M.L. (1999). Effect of selected mould strains on lipolysis in dry fermented sausages. *European Food Research and Technology* 209, 360-365.
- Sharman, M., MacDonald, S. y Gilbert, J. (1992). Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *Journal Chromatography A* 603, 285-289.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23(1), 15-22.
- Skaug, M. A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 16, 75-78.
- Skrinjar, M. y Horvar-Skenderovic, T. (1989). Contamination of dry sausage with moulds, aflatoxins, ochratoxin and zearalenona. *Tehnologija Mesa* 30, 53-59.
- Skrinjar, M., Stubblefield, R.D. y Vujicic, I.F. (1992). Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds. *Acta Veterinaria Hungarica* 40, 185-190.
- Skrinjar, M., Danev, M. y Dimic, G. (1995). Interactive effects of propionic acid and temperature on growth and ochratoxin A production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Folia Microbiologica* 40, 253-256.
- Slack, G.J., Puniani, E., Frisvad, J.C., Samson, R.A. y Miller, J.D. (2009). Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycology Research* 113, 480-490.
- Slayne, M.A. (2001). Ochratoxin A in food in the UK. En: Mycotoxins and phycotoxins in perspective of the turn millenium. Ed: Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. Wageningen, Holanda, 143-149.
- Solti, L., Pécsi, T., Barna-Vetró, I., Szász, J.R., Biró, K. y Szabó, E. (1999). Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Animal Reproduction Science* 56, 123-132.

- Sonjak, S., Licen, M., Frisvad, J.C. y Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from slovenia. *Food Microbiology* 28(3), 373-376.
- Sørensen, L.M., Jacobsen, T., Nielsen, P.V., Frisvad, J.C. y Koch, A.G. (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology* 124, 58-64.
- Soriano del Castillo, JM. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos. Madrid.
- Sosa, M., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (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.
- Spotti, E., Mutti, P. y Campanini, M. (1988). Indagine microbiologica sul difetto dell'acido fenico del prosciutto durante la stagionatura. *Industria Conserve* 63, 343-346.
- Spotti, E., Mutti, P. y Campanini, M. (1989). Occurrence of moulds on hams during preripening and ripening: Contamination of the environment and growth on the muscle portion of hams. *Industria Conserve* 64, 110-113.
- Spotti, E., Cacchiolo, C., Colla, F., Beatrisotti, M. y Zanardi, S. (1999). Growth of *Penicillium verrucosum* in model systems based on raw ripened meat products: Ochratoxin A determination and control. *Industria Conserve* 74, 113-124.
- Spotti, E., Chiavaro, E., Pari, E. y Busolli, C. (2001a). Growth of *Penicillium verrucosum* in model systems based on raw ripened meat products. Part 2: Ochratoxin A determination and comparison between a rapid immunofluorometric method and the traditional RP-HPLC technique. *Industria Conserve* 76, 167-183.
- Spotti, E., Chiavaro, E., Lepiani, A. y Colla F. (2001b). Mould and Ochratoxin A contamination of pre-ripened and fully ripened hams. *Industria Conserve* 76, 341-354.
- Stoev, S.D., Dutton, M.F., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S. y Steenkamp, P.A. (2010). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. *Food Additives and Contaminants* 27(1), 72-88.
- Strzelecki, E., Lillard, H.S. y Ayres, J.C. (1969). Country cured ham as a possible source of aflatoxin. *Journal of Applied Microbiology* 18, 938-939.
- Strzelecki, E.L. y Badura, L. (1972). Occurrence of aflatoxigenic molds on dry cracower sausage. *Acta Microbiologica Polonica Series B-Microbiologia Applicata* 4, 233-239.

- Sunesen, L.O. y Stahnke, L.H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Science* 65(3), 935-948.
- Sutic, M., Ayres, J.C. y Koehler, P. (1972). Identification and aflatoxin production of moulds isolated from country cured hams. *Journal of Applied Microbiology* 23, 656-658.
- Tabuc, C., Bailly, J.D., Bailly, S., Querin, A. y Guerre, P. (2004). Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue de Médecine Vétérinaire* 155(5), 287-291.
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I. y Fleet G.H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 68, 125-133.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A. y Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 173-179.
- Toldrá, F., Flores, M. y Aristoy, M.C. (1996). Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 124-128.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science* 49, 101-110.
- Toledano, A., Jordano, R., López, C. y Medina, L.M. (2011). Proteolytic activity of lactic acid bacteria strains and fungal biota for potential use as starter cultures in dry-cured ham. *Journal of Food Protection* 74(5), 826-829.
- Toledo, V., Selgas, M., Casas, C., Fernández, M. y García, M. (1996). *Cambios en la fracción de ácidos grasos libres en embutidos con mohos*. Valencia pp. 97.
- Toledo, V.M., Selgas, M.D., Casas, M.C., Ordóñez, J.A. y García M.L. (1997). Effect of selected mold strains on proteolysis in dry fermented sausages. *European Food Research and Technology* 204(5), 385-390.
- Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Asta, C.D., Simoncini, N. y Virgili, R. (2007). Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by HPLC-FLD quantitative method. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 855, 242-248.
- Trigueros, G., García, M.L., Casas, C., Ordóñez, J.A. y Selgas, M.D. (1995). Proteolytic and lipolytic activities of mould strains isolated from Spanish dry fermented sausages. *Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 201, 298-302.

- Trucksess, M.W., Mislivec, P.B., Young, K., Bruce, V.R. y Page, S.W. (1987). Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni and pecans. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 70, 123-126.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. y Piletsky, S.A. (2009). Analytical method for determination of mycotoxins. A review. *Analytica Chimica Acta* 632, 168-180.
- Ueno, Y., Kawamura, O., Sugiura, Y., Horiguchi, K., Nakajima, M., Yamamoto, K. y Sato, S. (1991). Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. En: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Ed: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H. IARC, Lyon. pp: 71-75.
- Ueno, Y., Maki, S., Lin, J., Furuya, M., Sugiura, Y. y Kawamura, O. (1998). A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food and Chemical Toxicology* 36, 445-449.
- Urano, T., Trucksess, M.W., Matusik, J. y Dorner, J.W. (1992). Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *Journal of AOAC International* 75, 319-322.
- Van Egmond, H.P. y Speijers, G.J.A. (1994). Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *Journal of Natural Toxins* 3, 125-144.
- Van Walbeek, W., Scott, P.M., Harwig, J. y Lawrence, J.W. (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology* 15, 1281-1285.
- Varga, J., Rigó, K., Réren, J. y Mesterházy, Á. (2001). Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Research Communications* 29, 85-92.
- Vazquez-Belda, B., Fente-Sampayo, C.A., Quinto-Fernandez, E., Franco-Abuin, C., Rodríguez-Otero, J.L. y Cepeda-Saez, A. (1995). Incidencia de hongos toxigénicos en queserías en la zona de arzua (La Coruña). *Food Science and Technology International* 1, 91-95.
- Verplaetse, A., Demeyer, D., Gerard, S. y Buys, E. (1992). Endogenous and bacterial proteolysis in dry sausage fermentation. *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand*.

- Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa, A.M. y Dekker, R.F. (2012). Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(1), 71-80.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S. y Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contribution to Nham characteristics. *Meat Science* 66 (3), 579-588.
- Wang, X., Ma, P., Jiang, D., Peng, Q. y Yang, H. (2006). The natural microflora of Xuanwei ham and the no-mouldy ham production. *Journal of Food Engineering* 77, 103-111.
- Weber, K. y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 244(16), 4406-4412.
- Wedeen, R. (1991). Environmental renal disease: lead, cadmium and Balkan endemic nephropathy. *Kidney International Supplement* 34, 54-58.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics . En J. Sninski, y W. TJ, *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications* (págs. 315-322). San Diego: Gelfand, D.H.
- Wilson, D.M., Sydenham, E.W., Lombaert, G.A., Trucksses, M.W., Abramson, D. y Bennett, G.A. (1998). Mycotoxin analytical techniques. En: Mycotoxins in agriculture and food safety. Ed: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. Marcel Dekker, Nueva York. pp: 135-182.
- Wu, M.T., Ayres, J.C. y Koehler, P.E. (1974). Toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* isolated from aged cured meats. *Journal of Applied Microbiology* 28, 1094-1096.
- Zanotti, M., Malagutti, L., Sciaraffa, F. y Corti, M. (2001). Indagine preliminare sul contenuto di Ocratossina in salumi provenienti dalla grande distribuzione. *atti del 36º Simposio Internazionale di Zootecnia*, (pág. 78). 27 de abril del 2001.
- Zapelena, M.J., Astiasarán, I. y Bello, J. (1999). Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or strater culture. *Meat Science* 52, 403-409.
- Zöllner, P. y Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136, 123-169.

ANEXO



Figura 27. Dendrograma de las cepas de *Penicillium* obtenido por el método UPGMA. En el dendrograma se incluyen las secuencias pertenecientes a las cepas utilizadas como referencia, así como las secuencias de las cepas de *Penicillium* aisladas a partir de las muestras de jamón y ambiente. Las cepas resaltadas en rojo son productoras de OTA, resaltadas en azul productoras de CPA y resaltadas en verde son productoras de OTA y CPA.