

Mecanismos de acción de antifúngicos naturales como sustitutos de aditivos sintéticos en la elaboración de embutidos curado-madurados

**MICAELA ÁLVAREZ, MARÍA JESÚS ANDRADE,
FÉLIX NÚÑEZ**

Higiene y Seguridad Alimentaria, Instituto
Universitario de la Carne y Productos Cárnicos,
Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura

**salud pública
y medio ambiente**

Introducción

En Europa, la fabricación de embutidos se remonta a la Grecia Clásica ya que la manera de preservar la carne tras el sacrificio de los animales se realizaba mediante el secado y la fermentación. Los romanos sazonaban y condimentaban la carne picada que embutían en tripas que después secaban. Estos productos considerados estables sirvieron de provisiones para viajeros y soldados facilitando expediciones y campañas militares. A lo largo de los siglos, sus ingredientes principales siguen siendo los mismos: carne picada, grasa, sal y especias. Así, la legislación española actual define los embutidos curado-madurados como aquellos derivados cárnicos elaborados mediante carnes troceadas o picadas y grasa no identificables anatómicamente que, con carácter general y no limitativo, se han sometido a un proceso de picado más o menos intenso, mezclados con especias, ingredientes, condimentos y aditivos, embutidos en tripas naturales o envolturas artificiales, y sometidos a un proceso de salazón seguido de curado-maduración, acompañado o no de fermentación, suficiente para conferirles las características organolépticas propias y su estabilidad a temperatura ambiente. El procesado de los embutidos curado-madurados se recoge en el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1.

La población microbiana de los embutidos incluye una amplia variedad de especies de bacterias, levaduras y mohos. Estos últimos colonizan la superficie de los embutidos, perteneciendo la mayoría a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En algunos embutidos el desarrollo de mohos es deseable ya que se les atribuyen diferentes

efectos beneficiosos como favorecer un secado homogéneo, reducir la oxidación lipídica previniendo la rancidez y contribuir a la producción de compuestos volátiles creando aromas específicos. Sin embargo, algunos mohos ocasionan efectos indeseables, como los pertenecientes al género *Mucor*, que producen un secado heterogéneo y olor a amoníaco, *Cladosporium* que pueden producir manchas negras en la superficie de los embutidos y originar alergias e infecciones fúngicas en el. Algunas especies de *Penicillium* pueden producir rinitis alérgica, asma y angioedemas (Bermúdez et al., 2019). Sin embargo, el principal problema relacionado con la población de mohos es la capacidad de algunas especies de producir toxinas en el alimento.

Las micotoxinas suponen un peligro para la salud de los animales y los humanos al contaminar la cadena alimentaria desde los cultivos vegetales hasta los alimentos de origen animal. Algunas

micotoxicosis son conocidas desde hace siglos como el ergotismo o Fuego de San Antonio descrito en la Edad Media por el consumo de pan de centeno contaminado por alcaloides de *Claviceps purpurea*, produciendo gangrena y sensación de quemazón en las extremidades.

La ocratoxina A (OTA) es la principal micotoxina encontrada en los derivados cárnicos curado-madurados siendo *Penicillium nordicum* la especie ocratoxigénica aislada con mayor frecuencia en estos productos, aunque existen otras especies como *Aspergillus westerdijkiae*, descrita más recientemente como productora de OTA en derivados cárnicos curado-madurados. La OTA es una molécula muy estable a la acidez y altas temperaturas por lo que una vez que contamina un alimento es difícil eliminarla y se excreta del organismo muy lentamente por lo que tiene capacidad de bioacumulación. Es nefrotóxica, inmunotóxica, neurotóxica, genotóxica, teratógena y ha sido clasificada como posiblemente carcinógena para los humanos, incluyéndose en el grupo 2B por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer. Estudios recientes sugieren que podría reclasificarse en el grupo 2A como probable carcinógeno para humanos al provocar tumores en animales.

Debido al peligro sanitario que presenta es necesario controlar la presencia de los mohos toxigénicos o al menos reducir la síntesis de micotoxinas.



Figura 1. Diagrama de flujo del procesado de los embutidos curado-madurados



Figura 2. Representación de la ruta biosintética de ocratoxina A. Adaptado de Gallo et al. (2017).

Las medidas higiénicas para prevenir la contaminación durante la elaboración se ven desbordadas en los secaderos y bodegas, donde no es factible eliminar totalmente la contaminación ambiental. Por lo tanto, pueden aplicarse diferentes métodos químicos o biológicos disponibles, con diferente efectividad. La industria cárnica emplea comúnmente preparados químicos para limitar el desarrollo de la población fúngica en embutidos curado-madurados. La legislación europea permite el uso de ácido sórbico, sorbato potásico, benzoatos y natamicina en la superficie de los embutidos curado-madurados. Sin embargo, estos compuestos afectan a toda la población fúngica, incluyendo a los mohos beneficiosos. Por otra parte, la aplicación incorrecta del producto a dosis subinhibitorias puede favorecer la aparición de resistencias e incluso estimular la producción de OTA. Además, estudios recientes han mostrado la toxicidad de algunos de estos fungicidas y el desarrollo de alergias. Por último, existe una demanda creciente por parte de los consumidores de alimentos libres

de aditivos, especialmente de conservantes, y de utilización de sustancias más naturales.

Como alternativa, se están desarrollando diversas estrategias aplicables durante el secado-maduración de los embutidos curado-madurados sin la utilización de compuestos sintéticos entre las que se encuentran las basadas en microorganismos y plantas, o sustancias derivadas de éstas, como agentes de biocontrol (BCAs). La eficacia de cada BCA para el control de mohos toxigénicos deriva de su modo de acción. El conocimiento de estos mecanismos proporciona una importante información que contribuye a optimizar el método de aplicación de los BCAs durante el procesado de los alimentos y permite realizar combinaciones más eficaces debido al posible efecto sinérgico entre ellos.

La utilización de técnicas moleculares ha permitido avanzar en el conocimiento de los procesos fisiológicos de mohos toxigénicos y su relación con la producción de micotoxinas. Debido a que la producción de OTA está regulada y relacionada con distintos genes, puede conocerse el efecto de los BCAs en la biosíntesis de OTA (Figura 2) a nivel del transcriptoma empleando técnicas de expresión génica. Por otro lado, la proteómica aborda el estudio del proteoma o conjunto de proteínas presentes en un organismo en unas condiciones específicas. La transcriptómica permite conocer la expresión génica, pero un mismo gen puede dar lugar a diferentes formas proteicas. Por ello, la proteómica puede ayudar a entender los cam-

bios producidos por los BCAs a través del aumento o la disminución de proteínas y sus efectos en el estado fisiológico de mohos toxigénicos. Finalmente, el análisis de metabolitos y otros compuestos como el ergosterol, el principal esteroide de la membrana fúngica, puede ayudar a identificar las dianas de acción de los BCAs.

En este artículo se recogen los principales modos de acción antifúngica de dos BCAs capaces de reducir la OTA producida por *P. nordicum* durante la elaboración de los embutidos: el romero, una hierba que puede ser añadida como ingrediente y la levadura *Debaryomyces hansenii* FHSCC 253H, aislada de derivados cárnicos curado-madurados por el Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura. Este trabajo forma parte de la tesis doctoral titulada “Efecto de agentes para el biocontrol de mohos ocratoxigénicos en embutidos curado-madurados” defendida el pasado mes de diciembre en la Universidad de Extremadura por la veterinaria María Micaela Álvarez.



Modos de acción antifúngica del romero

La adición de hojas picadas de romero a la masa cárnica durante la elaboración de salchichones permite reducir la OTA producida por *P. nordicum* en un 50 %. Además, la maceración de las tripas en agua con romero durante el día previo a la fabricación de los embutidos disminuye la micotoxina por debajo del límite de cuantificación de la técnica empleada. Por lo tanto, el efecto antiocratotóxico del romero depende del modo de aplicación. Dado que el proceso de maceración conlleva una mejor disolución de los compuestos fenólicos en agua, éstos podrían ser los responsables de su mayor efecto antiocratotóxico. Los compuestos fenólicos de otras especias como el fenogreco han mostrado la capacidad de reducir la OTA producida por *Aspergillus carbonarius*, y el extracto de anís, principalmente compuesto por ácido rosmarínico, uno de los componentes mayoritarios del romero, reduce la producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* y zearalenona en *Fusarium culmorum*.

A nivel genómico las hojas de romero inhiben los genes *otapks* y *otanrps* que intervienen en la síntesis de OTA en *P. nordicum* (Figura 2). Por lo tanto, la producción de la micotoxina puede estar influida por numerosas señales iniciadas por compuestos presentes en el romero que provocan efectos inhibitorios dentro de los sistemas de regulación génica.

En cuanto al proteoma de *P. nordicum*, en los lotes con el macerado en romero disminuyeron proteínas como la pefenato deshidratasa y la corismato sintasa (Figura 3), relacionadas con la ruta biosintética de la OTA desde el ácido shikímico hasta la formación de fenilalanina (Figura 2). Esto indicaría que la ruta de biosíntesis de la micotoxina se ve afectada en diversos puntos por la acción del romero. Además, disminuyó la abundancia de proteínas de la ruta de integridad de la pared celular como la F-actin-capping subunit beta, relacionada con la organización de la actina en el citoesqueleto y la NADPH-citocromo P450 reductasa que interviene directamente en la biosíntesis de ergosterol (Figura 3). Esto fue corroborado con el análisis del contenido en ergosterol de *P. nordicum* en presencia de romero, el cuál disminuyó en más de un 75 %. El ergosterol se considera la diana en la acción de diversos compuestos antifúngicos, tanto en la industria alimentaria como en medicina. Por ejemplo, se conoce que la natamicina se une directamente al ergosterol impidiendo

do el desarrollo fúngico y que el ergosterol es también la diana de medicamentos empleados para tratar infecciones fúngicas como los azoles. Además, la producción de ergosterol ha sido correlacionada con la producción de OTA en otros mohos. La alteración de la pared celular debido al romero también se reflejó en la estimulación del gen *rho1*, que se relaciona con estímulos que dañan la pared celular e inicia los procesos necesarios para reparar el daño (Figura 3).

Modos de acción antifúngica de *D. hansenii*

La cepa de *D. hansenii* estudiada es capaz de disminuir la producción de OTA por *P. nordicum* por debajo del límite de cuantificación cuando se inocula tanto en el interior de los embutidos como en la superficie de éstos. Esta levadura ha sido descrita como la especie predominante en los embutidos elaborados en distintos países. Por otra parte, algunas cepas de *D. hansenii* se comercializan como cultivos iniciadores debido a que facilitan el proceso de secado e influyen en el desarrollo del aroma y sabor.

Aunque se considera que la competición por nutrientes y espacio es el modo de acción más común de las levaduras, no puede afirmarse que sea el principal factor al que se debe la capacidad inhibidora de la cepa de *D. hansenii* empleada ya que *P. nordicum* domina nutricionalmente sobre la levadura en la mayoría de condiciones de temperatura y actividad de agua (*aw*) que se alcanzan durante la maduración de los embutidos. Por lo tanto, debe haber otros factores involucrados, como la producción de compuestos antifúngicos solubles y volátiles y

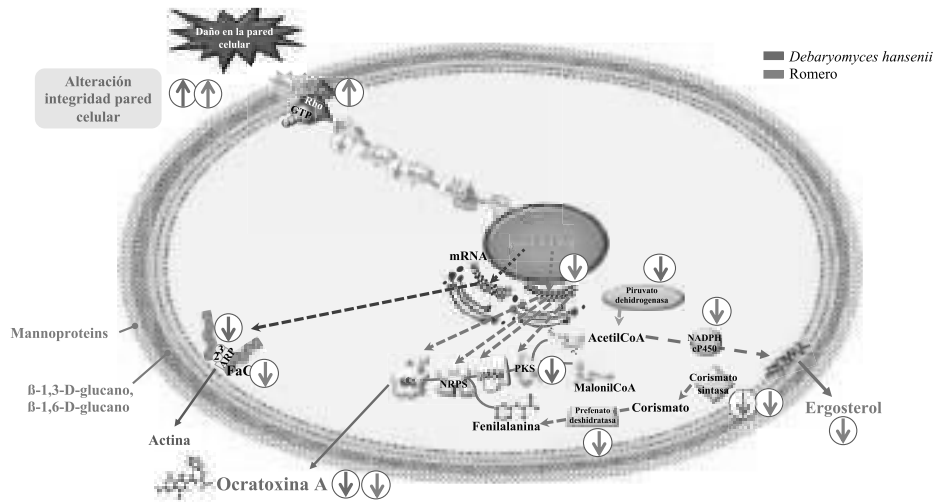


Figura 3. Modos de acción del romero (en verde) y de la levadura (en rojo) frente a *Penicillium nordicum*. Las flechas indican la inhibición o estimulación de las dianas de acción. FaC: F-actin capping protein subunit beta; HAL: Halogenasa; NRPS: Péptido sintetasa no ribosomal; p450: citocromo P450; PKs: Policétido sintasa; NADPHc P450: citocromo NADPH P450.

proteínas killer que pueden afectar al desarrollo estructural del moho, a la germinación y a la producción de la micotoxina. En este sentido, la cepa de *D. hansenii* inoculada en los embutidos produce compuestos volátiles como el 3-metil-1-butanol que ha mostrado tener capacidad para reducir el crecimiento de mohos productores de OTA.

A nivel del genoma, se ha descrito que la cepa de *D. hansenii* empleada altera la ruta biosintética de la OTA mediante la disminución en la expresión del gen *otapks* en *P. nordicum* cuando se inocula en jamón curado.

En cuanto al efecto sobre el proteoma, *D. hansenii* provoca en *P. nordicum* una reducción de la abundancia de proteínas relacionadas directamente con la biosíntesis de OTA (Figura 3). Entre ellas, la corismato sintasa interviene en la síntesis de corismato, un precursor de la fenilalanina, indispensable para formar la estructura molecular de la OTA (Figura 2). Las proteínas piruvato deshidrogenasa E1 subunidad Alpha y la probable acetate kina-

se están relacionadas con la formación del Acetil CoA, necesario para la síntesis de ochratoxina y del ergosterol (Figura 3). Además, disminuyó la abundancia de numerosas proteínas pertenecientes al dominio PKS ER, relacionado con la síntesis de micotoxinas como la OTA en otras especies productoras o las fumonisinas de *Fusarium spp.*

En presencia de *D. hansenii* también se reduce la abundancia de algunas proteínas relacionadas con la ruta de la integridad de la pared celular (Figura 3). Estas proteínas son esenciales para el desarrollo normal de las hifas a través de la unión de la actina y de la organización de la pared celular.

Conclusiones

Tanto el romero como la levadura *D. hansenii* alteran la integridad de la pared celular del moho ocratoxigénico y la biosíntesis de la OTA, aunque como consecuencia de diferentes modos de acción. Teniendo en cuenta los efectos descritos sobre *P. nordicum* y sus usos habituales en la elaboración de algunos embutidos, estos agentes pueden ser recomendados para su utilización para el biocontrol de la producción de OTA.

Para más información:

En el Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, se podrá consultar la bibliografía completa correspondiente a este artículo para todos aquellos interesados.