



**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
Facultad de Veterinaria**

**SELECCIÓN DE *Penicillium* PRODUCTORES DE
PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS PARA SU UTILIZACIÓN
EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

Raquel Acosta Guerrero
Cáceres, 2006

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
Facultad de Veterinaria

**SELECCIÓN DE *Penicillium* PRODUCTORES DE
PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS PARA SU UTILIZACIÓN
EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

Memoria presentada por la
Licenciada Raquel Acosta Guerrero
para optar al grado de Doctor.

Miguel Ángel Asensio Pérez, catedrático de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Zootecnia de la Universidad de Extremadura, informa:

Que el trabajo presentado por Doña Raquel Acosta Guerrero “*Selección de Penicillium productores de péptidos antifúngicos para su utilización en productos cárnicos madurados*” ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Zootecnia de esta Universidad. Habiéndose concluido, y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 12 de Mayo de 2006.

Fdo. Miguel Ángel Asensio Pérez



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA

HIGIENE DE LOS ALIMENTOS

Avda. Universidad s/n
E-10071-Cáceres (Spain)
Teléfono: +34 927 257 100
Fax: +34 927 257 110
<http://veterinaria.unex.es>

Félix Núñez Breña, profesor titular de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Zootecnia de la Universidad de Extremadura, informa:

Que el trabajo presentado por Doña Raquel Acosta Guerrero “*Selección de Penicillium productores de péptidos antifúngicos para su utilización en productos cárnicos madurados*” ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Zootecnia de esta Universidad. Habiéndose concluido, y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 12 de Mayo de 2006.

Fdo. Félix Núñez Breña

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas las personas y entidades que de alguna forma u otra han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis directores, Dr. Miguel Ángel Asensio y Dr. Félix Núñez, por el asesoramiento y la labor de dirección desempeñada.

A los Dres. Juan José Córdoba, Elena Bermúdez y María del Mar Rodríguez, por el apoyo y la ayuda prestada a lo largo de todos estos años.

A los Dres. María José Benito, Alberto Martín y Gregori Valencia, por la valiosa aportación de sus conocimientos para la caracterización tanto de la glicoproteína purificada como del moho productor.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador para la realización de esta tesis doctoral y por la subvención concedida al proyecto AGL2001-0521.

A los fondos FEDER, con los que se adquirió el equipo Biolog utilizado para la caracterización de mohos.

A las empresas Navidul (Grupo Campofrío), Resti S.A., Cardisán S.L, Delagón S.L., y a las Industrias de Productos Cárnicos Francisco Alonso S.L., Pedro Nieto S.L, Sánchez Nieto S.L. y Francisco Martín SL., por su colaboración desinteresada.

A todos los compañeros de las Unidades de Higiene y Tecnología de los Alimentos, por hacer más fácil y agradable el trabajo diario.

A mis padres y hermano, por vuestro apoyo incondicional.

A Jorge, porque siempre estás.

A todos vosotros, GRACIAS.

*A mis padres y hermano
A Jorge*

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	POBLACIÓN FÚNGICA EN ALIMENTOS.....	1
I.2.	POBLACIÓN MICROBIANA EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.4	4
	I.2.1. Embutidos Crudos Curados.	5
	I.2.2. JAMÓN CURADO.	7
I.3.	CONSECUENCIAS DEL DESARROLLO DE MOHOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.....	12
	I.3.1. EFECTOS BENEFICIOSOS.....	13
	I.3.1.1. Actividad Antioxidante y Protectora frente a la Desecación.....	13
	I.3.1.2. Actividad Lipolítica.....	14
	I.3.1.3. Actividad Proteolítica.....	15
	I.3.1.4. Efecto en el Sabor y Aroma.	15
	I.3.1.5. Actividad Antimicrobiana.	16
	I.3.2. EFECTOS PERJUDICIALES.	17
	I.3.2.1. Alteración de Origen Fúngico.	17
	I.3.2.2. Producción de Micotoxinas.	17
I.4.	CONTROL DE MOHOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS	20
	I.4.1. PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS.	21
I.5.	SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	25
	I.5.1. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	26
	I.5.2. CARACTERIZACIÓN FÚNGICA.....	27
	I.5.3. DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.....	29
	I.5.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.	30
I.6.	OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	31
	I.6.1. OBTENCIÓN.....	31
	I.6.2. PURIFICACIÓN.....	32
	I.6.2.1. Separación por Precipitación.....	32
	I.6.2.2. Separación por Adsorción.	33
	I.6.2.3. Separación por Tamaño.....	34
	I.6.2.4. Separación por Electroforesis.....	35
	I.6.3. CARACTERIZACIÓN.....	36
	I.6.3.1. Determinación de las Condiciones de Actividad Antifúngica.....	36
	I.6.3.2. Determinación de la Sensibilidad a Tratamientos Térmicos y Enzimáticos.	37
	I.6.3.3. Determinación de los Genes Relacionados con la Síntesis de la Proteína.	37
I.7.	OBJETIVOS.....	41

II.	MATERIAL Y MÉTODOS	43
II.1.	MATERIAL	43
II.1.1.	PRODUCTOS QUÍMICOS Y MEDIOS DE CULTIVO.	43
II.1.2.	APARATOS.....	43
II.1.3.	MATERIAL BIOLÓGICO.	48
II.1.4.	PATRONES.	49
II.2.	MÉTODOS	50
II.2.1.	OBTENCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.	50
II.2.1.1.	Toma de Muestras y Aislamiento de Mohos.	50
II.2.1.2.	Selección Mediante el Ensayo de Inhibición Radial en Medio Sólido.	51
II.2.1.3.	Caracterización Preliminar de los Aislados con Actividad Antifúngica.	52
II.2.1.4.	Ensayos de Inhibición en Placas Multipocillo.....	53
II.2.1.5.	Caracterización de los Aislados Mediante el Análisis del Perfil de Metabolitos Secundarios.	58
II.2.1.6.	Detección de Micotoxinas.	58
II.2.1.7.	Caracterización Bioquímica.....	61
II.2.2.	OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.	62
II.2.2.1.	Fraccionamiento por Cromatografía de Intercambio Iónico.....	62
II.2.2.2.	Purificación por Cromatografía de Filtración en Gel.....	63
II.2.2.3.	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	64
II.2.3.	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DEL PÉPTIDO ANTIFÚNGICO.....	65
II.2.3.1.	Producción en Función del Tiempo.....	65
II.2.3.2.	Influencia de la Temperatura, pH y Actividad del Agua.....	66
II.2.3.3.	Cuantificación del Nitrógeno.....	67
II.2.4.	CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO ANTIFÚNGICO.....	67
II.2.4.1.	Análisis por Electroforesis Capilar en Zona.	68
II.2.4.2.	Análisis por Electroforesis Capilar de Isoelectroenfoco.....	68
II.2.4.3.	Análisis Mediante HPLC-UV.....	69
II.2.4.4.	Análisis por Espectrometría de Masas.....	69
II.2.4.5.	Determinación del Espectro de Inhibición.....	71
II.2.4.6.	Ensayo de Inhibición Radial con el Péptido Purificado.....	72
II.2.4.7.	Determinación de la Sensibilidad al Tratamiento con Diferentes Enzimas.	72

II.2.4.8.	Determinación de Grupos Glicídicos en el Péptido.....	75
II.2.4.9.	Determinación de la Secuencia de Aminoácidos N-Terminal del Péptido Purificado.	75
II.2.5.	BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DEL PÉPTIDO.	76
II.2.5.1.	Extracción del ADN.	77
II.2.5.2.	Desarrollo de la PCR.....	78
II.2.5.3.	Purificación de los Productos de PCR.....	81
II.2.5.4.	Ligación de los Fragmentos de ADN en el Vector pCR 2.1.....	82
II.2.5.5.	Transformación en Células Competentes.....	83
II.2.5.6.	Comprobación de la Presencia de Plásmidos con el Inserto en las Células Seleccionadas.	84
II.2.5.7.	Secuenciación de los Plásmidos con Insertos.....	85
II.2.6.	ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	85
III.	RESULTADOS.....	87
III.1.	SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	87
III.1.1.	TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE MOHOS.	87
III.1.2.	ENSAYO DE INHIBICIÓN RADIAL EN MEDIO SÓLIDO.	88
III.1.3.	CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS AISLADOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.	91
III.1.4.	ENSAYOS DE INHIBICIÓN EN PLACAS MULTIPOCILLO.	94
III.1.5.	DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.....	108
III.1.6.	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR HPLC-Uv.	114
III.1.7.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.	116
III.2.	OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.....	118
III.2.1.	FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.	118
III.2.2.	SELECCIÓN DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.	119
III.2.3.	PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.	124
III.2.4.	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	132
III.3.	INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE <i>P. OLSONII</i> RP42C EN LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA.....	133
III.3.1.	PRODUCCIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.	133
III.3.2.	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PH Y ACTIVIDAD DEL AGUA.	135

III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDA POR <i>P. OLSONII</i> Rp42C	137
III.4.1. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA	137
III.4.2. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ISOELECTROENFOQUE	138
III.4.3. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE HPLC-UV	139
III.4.4. ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	140
III.4.4.1. Análisis por MALDI-TOF	140
III.4.4.2. Análisis por SELDI-TOF	141
III.4.5. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA	142
III.4.6. CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA EN PLACAS MULTIPOCILLO	143
III.4.7. CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA EN MEDIO SÓLIDO	147
III.4.8. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PROTEÍNA AL TRATAMIENTO CON DIFERENTES ENZIMAS	148
III.5. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA	155
IV. DISCUSIÓN	161
IV.1. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	161
IV.1.1. OBTENCIÓN DE MOHOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS SOLUBLES	161
IV.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN	171
IV.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS ACTIVOS	177
IV.1.3.1. Producción de Micotoxinas	184
IV.2. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN	190
IV.3. UTILIZACIÓN DE <i>P. OLSONII</i> Rp42C COMO CULTIVO PROTECTOR	203
IV.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	207
IV.4.1.1. Espectro de Inhibición	211
IV.4.1.2. Sensibilidad al Tratamiento con Enzimas de Distinta Naturaleza	218
IV.5. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	224

V. CONCLUSIONES	231
VI. BIBLIOGRAFÍA	233
VII. RESUMEN	285

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. POBLACIÓN FÚNGICA EN ALIMENTOS.

Los mohos poseen la capacidad de adaptarse y desarrollarse en sustratos muy diversos, entre los que se encuentran algunos alimentos. Las especies de mohos aisladas con mayor frecuencia en alimentos pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Eurotium*, aunque las características intrínsecas de cada tipo de producto condicionan el desarrollo de unas especies u otras (Filtenborg y col., 1996).

Las frutas y verduras frescas pueden alterarse durante su almacenamiento por *Penicillium expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum*, *P. digitatum* o *P. italicum* (Filtenborg y col., 1996), de hecho se han detectado micotoxinas como patulina o citrinina en frutas y zumos (Brian y col., 1956; Ciegler y col., 1977; McKinley y Carlton, 1991; Viñas y col., 1993).

Los cereales almacenados también pueden ser colonizados por *Penicillium polonicum*, *P. verrucosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, etc. (Filtenborg y col., 1996), que pueden producir micotoxinas como ocratoxina A o citrinina (Pohland y col., 1992; Mantle y McHugh, 1993; Abarca y col., 1994, 1997; Wolff, 2000), que podrían permanecer estables en el alimento incluso una vez procesado (Molinié y col., 2005).

En productos cárnicos madurados y quesos es frecuente el desarrollo una población fúngica superficial durante la maduración, que puede tener efectos deseables ya que contribuyen en gran medida a la formación del sabor, aroma o textura del producto acabado (Kinsella y Hwang, 1976; Bruna y col., 2001b; Gaborit y col., 2001; Martín y col., 2004a, 2006), e incluso puede ejercer un efecto protector frente a otros microorganismos no deseados (Geisen y col., 1992; Leistner, 1994; Singh y Dincho, 1994; Berwal y Dincho, 1995; Molimard y col.,

1995; Decker y Nielsen, 2005). Por ello, en quesos es frecuente el uso de determinadas cepas de mohos como *Penicillium roqueforti* o *P. camemberti* como cultivos iniciadores (Nielsen y col., 1998), y se ha propuesto la elaboración de cultivos iniciadores para su utilización en productos cárnicos madurados a partir de cepas no toxigénicas de *Penicillium chrysogenum* (Martín y col., 2002; Alonso, 2004), *Penicillium olsonii* (López-Díaz y col., 2001, 2002) o *Penicillium camemberti* (Bruna y col., 2003).

No obstante, en quesos se han descrito cepas de *Penicillium commune* y *P. nalgiovense* como alterantes (Filtenborg y col., 1996). El desarrollo de mohos no deseables en quesos puede conducir tanto a un deterioro en las características sensoriales como a la producción de micotoxinas (Marth y Yousef, 1991), muchas de las cuales han sido detectadas en estos productos (Lafont y col., 1979; Le Bars, 1979; Northolt y col., 1980; Jarvis, 1983; Siemens y Zawistowski, 1993). De manera similar, en productos cárnicos madurados, donde la población microbiana superficial está constituida fundamentalmente por mohos, se han detectado numerosas micotoxinas (Bullerman y col., 1969; Escher y col., 1973; Halls y Ayres, 1973; Wu y col., 1974a; Leistner, 1984). También se ha identificado a *P. commune* como responsable del *defecto del ácido fénico*, caracterizado por conferir un fuerte olor a fenol (Spotti y col., 1988).

Los mohos presentes en los alimentos pueden transformarlos, alterarlos y formar metabolitos secundarios tóxicos. El deterioro en las características sensoriales se debe normalmente a la producción de exoenzimas durante su desarrollo. 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 respecto del desarrollo una población fúngica en alimentos es su capacidad para producir micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos que al ser introducidos en el organismo en pequeñas cantidades, pueden ocasionar diferentes patologías relacionadas con inmunosupresión, carcinogénesis, neurotoxicidad, etc. (Samson y col., 1995). Existen micotoxinas que sólo son producidas por un grupo reducido de mohos, y otras generadas por especies muy variables incluso de géneros diferentes (Frisvad y Thrane, 1995). En este sentido, se han descrito especies como *Penicillium griseofulvum* capaces de producir gran variedad de micotoxinas (Frisvad y Filtenborg, 1990). No obstante, el perfil y la concentración de micotoxinas que puede producir un moho así como la posterior difusión al interior del alimento no sólo dependen de la naturaleza del microorganismo sino también de la composición del alimento y del procesado al que esté sometido. Además, estos metabolitos son muy resistentes a los tratamientos físicos y químicos, por lo que una vez que las micotoxinas están en el alimento pueden permanecer en él incluso después del procesado (Osborne y col., 1996; Castellá y col., 1998a,b; Katta y col., 1999). Muchos mohos colonizadores de alimentos son capaces además de producir antibióticos como la penicilina (Andersen y Frisvad, 1994), lo que supone un riesgo para los consumidores con alergia a este antibiótico (Bremmelgaard, 1998).

Debido a la capacidad de los mohos de generar micotoxinas y de producir alteraciones resulta necesario controlar su desarrollo en alimentos. Para ello pueden utilizarse sistemas de descontaminación físicos o químicos. No obstante, la poca efectividad real, así como en el caso de ser efectivos la inespecificidad de estos métodos, evitaría la contribución beneficiosa que estos microorganismos ejercen en determinados alimentos como los productos cárnicos madurados o los quesos.

I.2. POBLACIÓN MICROBIANA EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.

Los productos cárnicos madurados se obtienen mediante procesos combinados de salazón-fermentación-dsecación-maduración. Los distintos métodos de elaboración determinan una evolución de las características ecológicas de los productos que condiciona el desarrollo de diferentes tipos de microorganismos. Así, la adición de azúcares y sales de curado al inicio de la fermentación en embutidos, hace que se seleccione una población microbiana constituida fundamentalmente por micrococáceas y bacterias lácticas en el interior del producto, y por mohos y levaduras en la superficie (Figura I.1.).

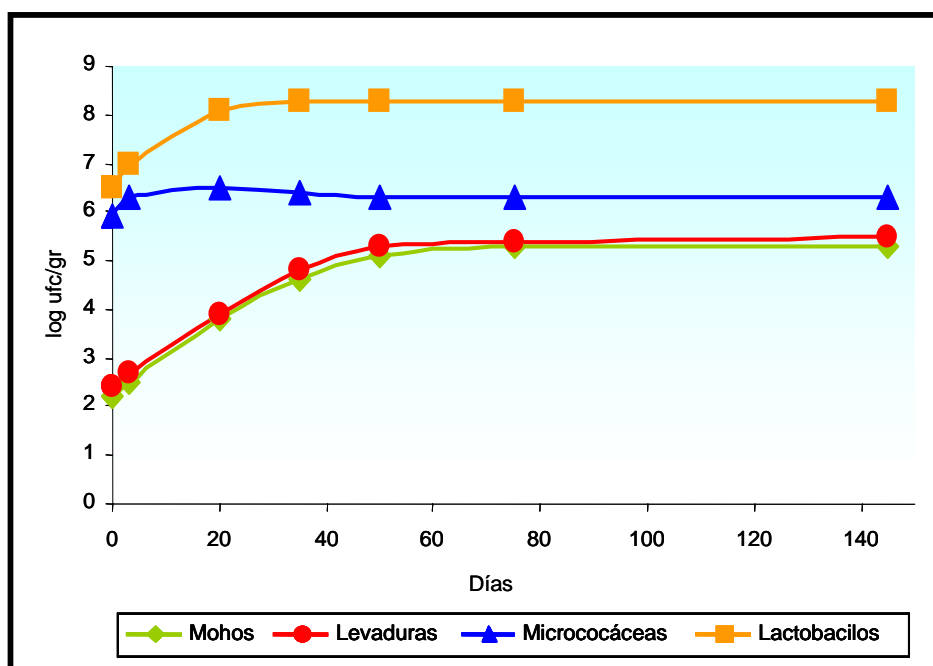


Figura I.1. Evolución de la población microbiana en superficie y profundidad durante la elaboración de embutidos curados (Ordóñez y col., 1999; Encinas y col., 2000).

En productos donde no suelen añadirse azúcares y la adición de nitratos si se realiza es de forma superficial, como el jamón curado, la evolución de la población microbiana está condicionada por las bajas temperaturas en las primeras

fases del procesado, y posteriormente por la reducción gradual de la actividad del agua (a_w) que se produce debido a la difusión de la sal al interior de las piezas. Como consecuencia se va seleccionando en la superficie del producto una microbiota constituida fundamentalmente por mohos y levaduras (Figura I.2).

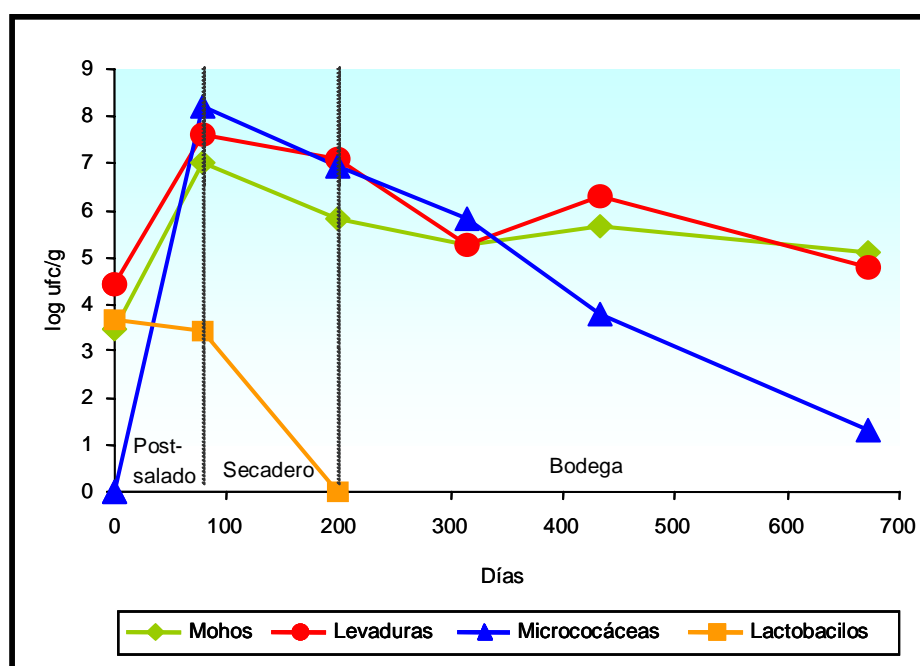


Figura I.2. Evolución de la población microbiana superficial durante el proceso de elaboración del jamón ibérico (Núñez, 1995; Rodríguez, 1995).

I.2.1. EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS.

La carga microbiana inicial en embutidos elaborados sin adición de cultivos iniciadores se sitúa en torno a 10^5 - 10^6 u.f.c/g (Ordóñez y col., 1999) y está compuesta por microorganismos similares a los que pueden encontrarse en carne fresca: lactobacilos, micrococáceas, enterobacterias, pseudomonas, etc. (Ordóñez y col., 1999).

Una de las primeras operaciones que se efectúa para la elaboración de los embutidos es la mezcla de los ingredientes. Posteriormente el producto se mantiene a temperatura baja el tiempo necesario para evitar el peligro de

alteración microbiana. Las condiciones de maduración dirigirán la evolución de la población microbiana y los cambios que se originan.

Durante la elaboración de la masa del embutido se produce un descenso en la a_w hasta valores de 0,96 debido a la adición de azúcares y sales de curado. El pH de los productos fermentados sufre un descenso inicial desde valores iniciales de 5,8-6,2 hasta cifras próximas a 5,0 e inferiores, que será más rápido cuanto más activo sea el cultivo iniciador y cuanto mayor sea la disponibilidad de azúcares (Fernández-Salguero, 1993). Estas condiciones seleccionan una microbiota constituida fundamentalmente por micrococáceas y bacterias lácticas (Ordóñez y col., 1999). Posteriormente, durante la maduración la a_w desciende paulatinamente hasta valores inferiores a 0,90 (Ordóñez y de la Hoz, 2001).

La evolución de las micrococáceas en embutidos depende de las características del producto. Aunque suelen ser los microorganismos predominantes durante los primeros días del procesado, posteriormente pueden mantenerse o iniciar un descenso progresivo debido a su sensibilidad a la acidificación (Ordóñez y col., 1999). Sólo llegan a ser el grupo microbiano predominante en embutidos elaborados con un bajo nivel de hidratos de carbono (Ordóñez y col., 1999), siendo las especies más abundantes *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* y *Micrococcus varians* (Fischer y Schleifer, 1980). En los elaborados con una alta proporción de hidratos de carbono son los lactobacilos los que conforman la población microbiana dominante fundamentalmente *Lactobacillus sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilacti* (Ordóñez y col., 1999).

Durante la etapa de secado, si la humedad relativa del ambiente no es demasiado baja, puede aparecer una población microbiana superficial compuesta por mohos y levaduras (Geisen, y col., 1992), microorganismos que toleran valores de pH y de a_w bajos.

Las levaduras alcanzan sus recuentos máximos al final de la fermentación inicial (Encinas y col., 2000), aunque son valores bajos en comparación con las bacterias lácticas y las micrococáceas (Ordóñez y col., 1999). En embutidos típicos españoles como el chorizo, el salchichón o la longaniza, la levadura predominante es *Debaryomyces hansenii*, aunque también se aíslan otras como *Trichosporon ovoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Citeromyces matritensis* y algunas especies del género *Candida* (Encinas y col., 2000).

En los embutidos crudos curados se desarrolla una abundante población superficial de mohos pertenecientes en su mayoría a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, aunque también pueden aislarse a veces otras especies de los géneros *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Alternaria* y *Rhizopus* (Petska, 1986). Entre las especies predominantes descritas en el *chorizo de Cantimpalos* se encuentran *Penicillium commune* y *P. olsonii* (López-Díaz y col., 2001).

En otras variedades de productos cárnicos fermentados como el salami, los mohos del género *Penicillium* componen la microbiota superficial predominante (Dragoni y col., 1991; Kivanc y col., 1992; Mutti y col., 1992; Andersen, 1995), siendo las especies más frecuentes *P. chrysogenum* y *P. nalgiovense* (Grazia y col., 1986; Andersen, 1995).

I.2.2. JAMÓN CURADO.

Los microorganismos que colonizan los perniles frescos provienen de la piel del animal, del contenido intestinal, de la sal, especias y otros ingredientes, así como del material de procesado (cuchillos, tanques de escaldado, etc.). Se han descrito recuentos iniciales que oscilan entre 10^2 y 10^5 u.f.c/g de carne (Carrascosa y col., 1988; Cornejo y col., 1988).

En el jamón la evolución de la población microbiana está condicionada fundamentalmente por las bajas temperaturas en las primeras fases del procesado,

y posteriormente por la reducción de la a_w , que alcanza al final del proceso de elaboración valores en torno a 0,85 (Córdoba y col., 1991; Ventanas y col., 1992; Rodríguez y col., 1994). La humedad experimenta un descenso hasta valores finales próximos al 40% en jamones ibéricos (Córdoba, 1990; Melger y col., 1993). En el producto final la concentración de sal suele ser del 3 al 5%. El pH no tiene un papel relevante ya que apenas existen variaciones durante el proceso de elaboración, encontrándose los valores en torno a 5,7-6,0 en jamones de cerdo blanco (Flores y col., 1985; Carrascosa y col., 1988, 1989a; Cornejo y col., 1988), italianos (Giolitti y col., 1971a,b; Raczynski y col., 1978; Bellati y col., 1983), americanos (Kemp y col., 1978) e ibéricos (Antequera, 1990; Córdoba y col., 1991). Estas condiciones ecológicas favorecen el desarrollo de una microbiota constituida fundamentalmente por micrococáceas, mohos y levaduras.

El salado de los perniles hace que se seleccionen microorganismos halotolerantes como las micrococáceas (Lücke, 1986), que además pueden llegar al jamón a través de la sal (Cornejo y col., 1992; Rodríguez y col., 1994; Cordero y Zumalacárregui, 2001).

La temperatura de las cámaras de salado y postsalado se mantiene por debajo de los 5°C, hecho que provoca una disminución del desarrollo microbiano (Frazier, 1967), principalmente de bacterias mesófilas, entre las que se encuentran algunas patógenas como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* o *Clostridium botulinum*; y alterantes como *Clostridium putrefaciens* (Rosset, 1982). La presencia de nitratos y nitritos inhibe eficazmente a los clostridios y también puede inhibir a *Staphylococcus aureus* en determinadas condiciones (Buchanan y Solberg, 1972; Fang y col., 1985).

Durante la fase de postsalado la a_w baja y el incremento de la temperatura favorecen a las micrococáceas, que predominan en los distintos tipos de jamón (Baldini y Raczynsky, 1978; Francisco y col., 1981; Kemp y col., 1982; Silla y col., 1989; Carrascosa y col., 1992; Marín y col., 1993; Rodríguez y col., 1994).

La mayoría de los aislados de jamón identificados como micrococáceas pertenecen al género *Staphylococcus* (Francisco y col., 1981; Molina y col., 1990; Rodríguez y col., 1994, 1996), habiéndose descrito en jamón ibérico *Staphylococcus xylosus*, *S. saprophyticus* y *S. equorum* (Rodríguez y col., 1994, 1996), y *S. xylosus*, *S. sciuri* y *S. capitis* en jamón de cerdo blanco (Carrascosa y col., 1988; Molina y col., 1990; Carrascosa y Cornejo, 1991; Cornejo y Carrascosa, 1991).

También pueden detectarse en los jamones bacterias ácido lácticas (Langlois y Kemp, 1974; Francisco y col., 1981; Silla y col., 1985; Huerta y col., 1988, Sosa, 1995), fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Molina y col., 1990), pero a un nivel muy inferior al de las micrococáceas (Carrascosa y col., 1988, 1989a y b; Molina y col., 1990; Marín y col., 1993).

Durante las etapas de salado y postsalado se han aislado levaduras de los géneros *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula* en jamón ibérico (Núñez y col., 1996a); *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces* en jamón de cerdo blanco (Huerta y col., 1988); y *Toluopsis*, *Trichosporon* y *Geotrichum* en jamón de Parma (Comi y Cantoni, 1983), aunque con recuentos bajos (Figura I.2).

En las etapas de secadero y bodega la a_w es el principal factor condicionante de la población microbiana, tanto en superficie como en profundidad, inhibiendo las bacterias Gram negativas (Christian, 1980) y provocando la reducción posterior en los recuentos de las micrococáceas (Francisco y col., 1981; Rodríguez y col., 1994). El aumento de la temperatura durante el secadero favorece la multiplicación de las levaduras, aunque la posterior reducción de la a_w en bodega provoca un descenso en cuanto a recuentos y variedad. La especie predominante al final del proceso de maduración es *Debaryomyces hansenii*, tanto en jamón ibérico (Núñez y col., 1996a) como en jamón blanco serrano (Huerta y col., 1988) o en jamón de Parma (Comi y Cantoni, 1983). También se han descrito

otras especies como *Debaryomyces marama* en jamón ibérico (Monte y col., 1986), mientras que en jamones blancos de maduración más corta y actividades de agua más elevadas, se aíslan otros géneros como *Rhodotorula*, *Hansenula* y *Cryptococcus* (Molina y col., 1990).

Las condiciones ecológicas alcanzadas durante la maduración en secadero y bodega favorecen el desarrollo de los mohos (Tabla I.1), que se convierten en la población dominante aumentando su diversidad a lo largo del procesado (Huerta y col., 1987; Núñez y col., 1996b).

Por lo general, en todos los tipos de jamón, los mohos aislados con mayor frecuencia hasta la mitad de bodega son del género *Penicillium*, mientras que al final del procesado predominan mohos de los géneros *Eurotium* y *Aspergillus* (Tabla I.1), con mayor capacidad para crecer a a_w baja (Leistner y Rödel, 1975; Pitt y Hocking, 1997). Aunque con menor frecuencia, también se han aislado otras especies fúngicas de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aurobasidium*, *Syncephalastrum*, *Paecylomyces* y *Curvularia* en jamón ibérico (Monte y col., 1986; Núñez y col., 1996b) y *Mucor* y *Fusarium* en jamones elaborados en Croacia (Comi y col., 2004).

Tabla I.1. Mohos aislados de diferentes tipos de jamones.

Tipo de jamón	Géneros Detectados	Especies Mayoritarias	Referencia
Ibérico	<i>Penicillium</i>	<i>P. commune</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>	Monte y col., 1986
	<i>Eurotium</i>	<i>E. repens</i> , <i>E. herbariorum</i>	Núñez y col., 1996b
Blanco serrano	<i>Penicillium</i>	<i>P. purpurogenum</i>	Huerta y col., 1987
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>	Rojas y col., 1991
Americanos <i>Country Style</i>	<i>Penicillium</i>	-	Sutic y col., 1972
	<i>Aspergillus</i>		Lacey, 1989
Italianos <i>De Parma</i> <i>San Danielle</i>	<i>Penicillium</i>	<i>P. commune</i> , <i>P. verrucosum</i>	Spotti y col., 1989
	<i>Eurotium</i>	<i>E. repens</i>	
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. caespitosus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i>	Dragoni y col., 1980
<i>Speck</i>	<i>Penicillium</i>	<i>P. solitum</i>	Peintner y col., 2000
	<i>Eurotium</i>	<i>E. rubrum</i>	
Croatas	<i>Penicillium</i>	<i>P. frequentans</i> , <i>P. lanoso-</i> <i>coeruleum</i> , <i>P. lanoso-griseum</i>	Comi y col., 2004
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. repens</i> , <i>A. ochraceus</i>	
	<i>Eurotium</i>	<i>E. repens</i>	

- no especificado.

La variedad de la población fúngica parece estar relacionada con la localización geográfica de las instalaciones de procesado y con el tipo de elaboración (Leistner y Ayres, 1968; Peintner y col., 2000; Comi y col., 2004). En un trabajo sobre la microbiota típica del *speck* en función de los diferentes tipos

de producción y procedencia geográfica, se concluyó que la diversidad de la población fúngica descendía cuanto más industrializado era el proceso de elaboración y era mayor en una zona concreta del sur del Tirol (Peintner y col., 2000). Asimismo en un estudio sobre los mohos desarrollados en la superficie de un tipo de jamón producido en Croacia, las especies identificadas fueron similares en las diferentes fases de procesado, lo que podría indicar que la población fúngica superficial proviene del aire y de las cámaras de maduración más que de la carne cruda (Comi y col., 2004).

I.3. CONSECUENCIAS DEL DESARROLLO DE MOHOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.

En embutidos madurados está bien establecido el papel que pueden desempeñar los microorganismos (Grazia y col., 1986; Toledo y col., 1997). No obstante, la participación de la población microbiana durante la maduración del jamón, se ha considerado poco importante como consecuencia de los bajos recuentos detectados en el interior de las piezas (Francisco y col. 1981). Sin embargo, los microorganismos presentes pueden ejercer su efecto durante los largos periodos de tiempo que requiere la maduración. Por ello la población microbiana, particularmente los mohos, puede influir en las características del producto acabado (Figura I.3) ya sea tanto positiva como negativamente (Hechelmann, 1986; Lücke y Hechelmann, 1987).

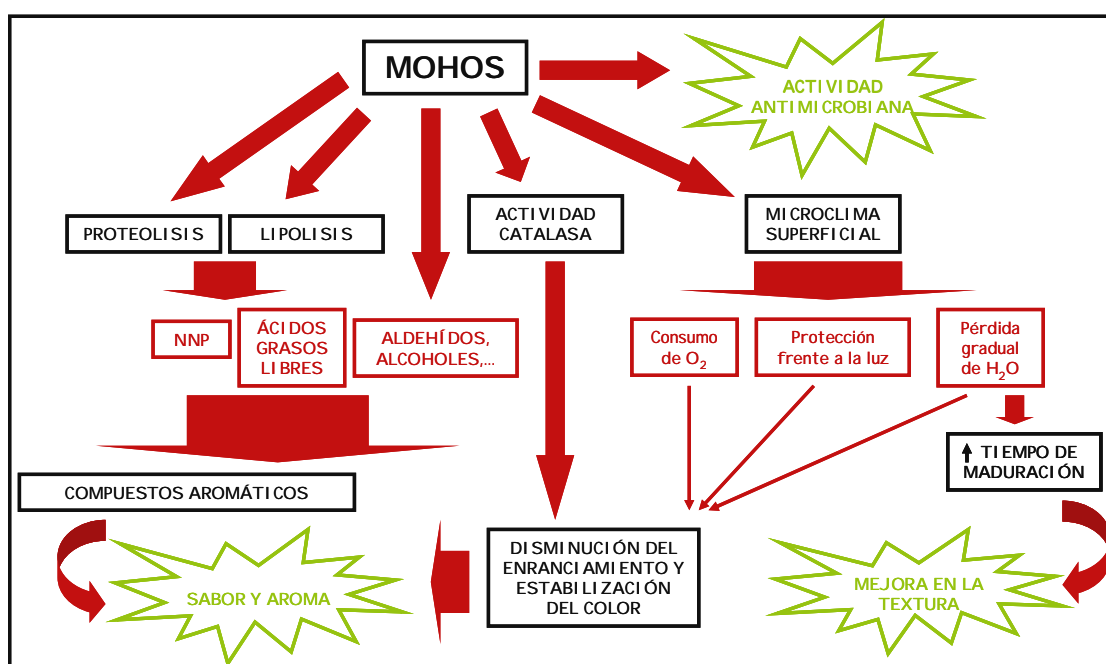


Figura I.3. Efectos beneficiosos por el desarrollo de mohos durante la maduración del jamón (Núñez, 1995).

I.3.1. EFECTOS BENEFICIOSOS.

La población fúngica que coloniza los productos cárnicos madurados presenta diversas actividades metabólicas que pueden mejorar las características sensoriales del producto.

I.3.1.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROTECTORA FRENTE A LA DESECACIÓN.

La mayoría de las cepas de mohos aisladas de jamón poseen una actividad catalasa moderada (Núñez, 1995), destruyen peróxidos y reducen las reacciones oxidativas y la formación de compuestos como biliverdina, bilirrubina, urobilina y estercolina (Burgos, 1981). Como consecuencia disminuyen el enranciamiento y estabilizan el color del producto (Liepe, 1982; Smith y Palumbo, 1983; Lücke y Hechelmann, 1987; Geisen, 1993). Además, muchos mohos producen compuestos con acción antioxidante (Ludemann y col., 2004). Por otra parte, los mohos

también pueden tener influencia en la textura del producto acabado, ya que regulan, en parte, el descenso de la humedad. La población fúngica superficial crea un microclima en la zona más externa del producto que hace que la pérdida de humedad durante el procesado se produzca de forma gradual (Lücke, 1997), y que no llegue a secarse excesivamente la pieza. Por otra parte, la concentración de algunos compuestos derivados de la oxidación lipídica es menor en embutidos y lomo de cerdo inoculados con mohos (Bruna y col., 2001a,b; Martín y col., 2002), posiblemente debido a su actividad antioxidante.

I.3.1.2. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.

Numerosas especies de mohos pertenecientes al género *Penicillium* poseen exoenzimas con actividad lipolítica (Seitz, 1990; Núñez, 1995; Alonso, 2004), que pueden incrementar la concentración de ácidos grasos libres y compuestos volátiles en jamón (Huerta y col., 1987; Molina y col., 1991) y embutidos (Toledo y col., 1996), contribuyendo así al desarrollo del sabor y aroma del producto. Las lipasas de los mohos son activas a valores de actividad del agua de 0,95-0,85 y a temperaturas entre 15 y 25°C (Magan y col., 1993), por lo que pueden actuar en diversas fases del procesado.

Se ha observado actividad lipolítica en mohos del género *Penicillium* aislados de jamón ibérico (Núñez, 1995; Alonso, 2004) y de embutidos (Selgas y col., 1999; Ludemann y col., 2004), y se ha establecido la relación entre el crecimiento de los mismos y el aumento en la concentración de ácidos grasos libres en productos cárnicos curados (Toledo y col., 1996).

No obstante no es aconsejable un exceso de actividad lipolítica, ya que los ácidos grasos que ésta genera sufren una oxidación posterior, que a grandes niveles no es deseable especialmente en los productos cárnicos de larga maduración (Córdoba y col., 2002).

I.3.1.3. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Aunque la proteólisis en los productos cárnicos se ha asociado generalmente a la actividad de los enzimas presentes en el tejido muscular (Toldrá y col., 1992a; Sárraga y col., 1993), algunas cepas aisladas de jamón curado producen una intensa hidrólisis de proteínas miofibrilares y un gran incremento de aminoácidos libres cuando se inoculan en carne de cerdo estéril y productos cárnicos madurados (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2001, 2002, 2004). En este sentido, se ha demostrado una intensa actividad proteolítica de una cepa de *P. chrysogenum* (Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2001, 2002; Benito y col., 2003a; Alonso, 2004), a partir de la cual se ha purificado una proteasa muy activa en las condiciones de maduración de diferentes productos cárnicos (Benito y col., 2002). La actividad proteolítica de estos microorganismos se asocia tanto a su capacidad endopeptidasa como exopeptidasa (Benito y col., 2003a,b).

También se han aislado de embutidos mohos de los géneros *Mucor* y *Penicillium* con gran actividad proteolítica (Trigueros y col., 1995), capaces de incrementar la concentración de aminoácidos libres en estos productos (Bruna y col., 2001a).

I.3.1.4. EFECTO EN EL SABOR Y AROMA.

Los mohos pueden potenciar la formación del aroma característico de los productos curados por diversas vías. En primer lugar, los aminoácidos liberados, además de potenciar el sabor de los alimentos (Suyama y Shimuzu, 1982; Nishimura y Kato, 1988; Kato y col., 1989; Suzuki y col., 1994), pueden intervenir en reacciones de condensación de Maillard (Shahidi y col., 1986; Ventanas y col., 1992; Mottram y Whitfield, 1995) y de degradación de Strecker (Barbieri y col., 1992; Ventanas y col., 1992), en las que se pueden formar compuestos responsables del aroma del jamón curado (García y col., 1991; Ruíz y col., 1998; Whitfield, 1992).

Los mohos también pueden intervenir en reacciones de esterificación de ácidos carboxílicos y alcoholes (Gatfield y col., 1988) generando ésteres, compuestos con gran influencia en el sabor y aroma final de los embutidos (Mateo y Zumalacárregui, 1996).

Algunos aldehídos, como 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, pueden ser sintetizados por microorganismos a partir de valina, isoleucina y leucina (Hinrichsen y Pedersen, 1995). De hecho, la inoculación en carne o productos cárnicos de *P. aurantiogriseum* o *P. chrysogenum* origina un aumento en dichos compuestos (Bruna y col., 2001b; Martín y col., 2003; Alonso, 2004).

De manera similar, la inoculación con *P. chrysogenum* se correlaciona con aumentos en la concentración de pirazinas en lomos madurados (Martín y col., 2003; Alonso, 2004).

Por lo tanto, los mohos también contribuyen a la formación diversos compuestos que se asocian con un aroma deseable de los productos cárnicos madurados, como las pirazinas (Flores y col., 1997) y los aldehídos ramificados (Berdagué y col., 1993a; Hinrichsen y Pedersen, 1995; Ruiz y col., 1999).

I.3.1.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Los mohos pueden tener un efecto protector frente a microorganismos patógenos o alterantes (Lücke y Hechelmann, 1987; Geisen y col., 1992; Leistner, 1994; Singh y Dincho, 1994; Berwal y Dincho, 1995). Así, el 75% de los mohos aislados en jamón ibérico inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Núñez y col., 1996b). Asimismo, diversas especies no toxigénicas de mohos tienen la capacidad de inhibir la producción de micotoxinas e incluso de destruir las formadas por otras especies toxigénicas (Mislivec y col. 1988). No obstante, este efecto podría deberse a actividades tan poco deseables como la producción de

toxinas o de antibióticos, o bien a mecanismos más aceptables como a interferencias metabólicas o a péptidos antimicrobianos.

I.3.2. EFECTOS PERJUDICIALES.

Entre los efectos perjudiciales atribuibles al desarrollo de mohos en la superficie de las piezas, destacan la alteración del producto y la producción de micotoxinas.

I.3.2.1. ALTERACIÓN DE ORIGEN FÚNGICO.

Por lo general, la presencia de un micelio blanco uniforme en la superficie de la mayoría de los productos cárnicos madurados no representa un inconveniente serio para los consumidores. No obstante, el desarrollo de mohos de los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, favorecidos por una actividad del agua alta, puede provocar un aspecto no deseable al jamón o embutidos. De manera similar, *Cladosporium herbarum* produce manchas de color negro deteriorando el aspecto externo del jamón (Sanz, 1986).

Por otro lado, los mohos con gran capacidad lipolítica pueden ocasionar olores anómalos (Sanz, 1986). Se ha identificado a *Penicillium commune* como el responsable del *defecto del ácido fénico*, caracterizado por conferir al jamón un fuerte olor a fenol (Spotti y col., 1988).

I.3.2.2. PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

El potencial toxigénico de los mohos aislados de productos cárnicos se ha establecido basándose en distintas observaciones. Se ha comprobado que el 80% de 1481 aislamientos de cepas del género *Penicillium* son potencialmente toxigénicos (Eckardt y col., 1979). Más del 75% de los mohos aislados en jamón

ibérico muestran toxicidad o mutagenicidad en ensayos biológicos (Núñez y col., 1996b). Algunas de estas cepas muestran capacidad de producción de micotoxinas en medios de cultivo constituidos únicamente por extracto de carne y cloruro sódico (Rodríguez de Ledesma y col., 1996; Díaz, 1999; Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002). Las micotoxinas tremorgénicas producidas por mohos aislados de productos cárnicos madurados muestran efectos genotóxicos en ensayos *in vitro* (Sabater-Vilar y col., 2003). Todos los aislados de *P. commune* obtenidos de *chorizo de Cantimpalos* mostraron una alta toxicidad para larvas de *Artemia salina* (López-Díaz y col., 2001).

Numerosos estudios han constatado la producción de metabolitos tóxicos por parte de mohos aislados de diferentes productos cárnicos madurados (Tabla I.2). Se ha comprobado la presencia en embutidos y jamones curados de micotoxinas como citrinina, patulina, rugulosina, ocratoxina A, ácido ciclopiazónico, citreoviridina, breviamida A, fumitremorgina B, griseofulvina y verruculógeno TR₁ (Leistner, 1984). Además, las micotoxinas pueden difundir al interior del jamón, donde pueden mantenerse incluso cuando el micelio se ha eliminado (Leistner y Eckardt, 1979; Leistner, 1984).

Por todo esto, resulta preocupante el crecimiento incontrolado de mohos potencialmente toxigénicos o mutagénicos en la superficie de los productos cárnicos madurados (Núñez y col., 1996b; Sabater-Vilar y col., 2003) y sería recomendable la utilización de cultivos iniciadores no toxigénicos.

Tabla I.2. Micotoxinas producidas por mohos aislados de productos cárnicos madurados.

Producto	Moho	Micotoxina	Referencia
Jamón americano	<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxinas	Bullerman y col., 1969
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	ocratoxinas A y B	Escher y col., 1973
	<i>Aspergillus versicolor</i>	esterigmatocistina	Halls y Ayres, 1973
	<i>Penicillium viridicatum</i>	citrinina	Wu y col., 1974a
Embutidos	-	ocratoxina A	Skrinjar y Horvat-Skenderovic, 1989
Salami	-	ocratoxina A	Cantoni y col., 1982
Chorizo	<i>Penicillium commune</i>	ácido ciclopiazónico	López-Díaz y col., 2001
Jamón y embutidos franceses	<i>Penicillium cyclopium</i>	ocratoxina A	Tabuc y col., 2004
	<i>Penicillium viridicatum</i>	ácido ciclopiazónico	
Jamón curado español	<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxinas	Rojas y col., 1991
Jamón ibérico	<i>Penicillium polonicum</i>	verrucosidina	Núñez y col., 2000;
	<i>Penicillium oxalicum</i>	griseofulvina	Díaz, 1999;
	<i>Penicillium commune</i>		Sosa y col., 2002
Productos cárnicos	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Eurotium spp.</i>	aflatoxinas	El-Kady y col., 1994
Jamón italiano	<i>Penicillium verrucosum</i>	ocratoxina A	Spotti y col., 2001a, b

- no especificado

I.4. CONTROL DE MOHOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS.

Existen numerosos mecanismos para controlar el desarrollo microbiano en distintos tipos de alimentos. Entre los métodos físicos de control se encuentra la utilización de tratamientos térmicos, radiaciones ionizantes o ultravioleta, altas presiones, pulsos eléctricos, o campos magnéticos. También puede utilizarse el envasado en atmósferas controladas o modificadas, y algunos agentes químicos como ácidos orgánicos, aceites esenciales, peróxido de hidrógeno, etc. Por otra parte, recientemente se ha descrito la gran actividad antifúngica y antimicrobiana de los alpechines (Tuck y Hayball, 2002; Del Río y col., 2003; Caturla y col., 2005), residuos de la molturación de las aceitunas para la producción del aceite de oliva. Los compuestos activos son unos polifenoles, entre los que destaca la oleuropeína. Estos tratamientos resultan efectivos para evitar el desarrollo de mohos en determinados alimentos, como frutas, verduras, pan, etc.

Por el contrario, en los productos cárnicos madurados no está permitida la aplicación directa de fungicidas. Además, las medidas higiénicas para prevenir la contaminación durante la elaboración se ven desbordadas en los secaderos y bodegas, donde resulta muy difícil eliminar totalmente la contaminación ambiental. Por otra parte, la inespecificidad de estos tratamientos evitaría la posible contribución beneficiosa de los mohos a la maduración de estos productos.

Para controlar a la población fúngica que se desarrolla en la superficie de los productos cárnicos madurados podrían utilizarse cultivos protectores que integren cepas de mohos capaces de inhibir por competición a los mohos no deseables, contando con que no sean toxigénicos y muestren una actividad metabólica adecuada. No obstante, esta opción se ve limitada por la evolución de las condiciones ecológicas durante la maduración, resultando muy poco probable que los mohos seleccionados superen a todas las especies habituales en la amplísima gama de temperaturas y de a_w durante la maduración (Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002). La única posibilidad radicaría en contar con mohos que dispusieran de

algún elemento adicional que favoreciese su desarrollo, como la producción de antibióticos. Lógicamente, esta opción se ha descartado por posibles reacciones alérgicas en el consumidor o la inducción de resistencia en otros microorganismos como consecuencia de su empleo continuado. Sin embargo, la reciente descripción de péptidos naturales elaborados por mohos y que poseen un efecto antifúngico abre nuevas perspectivas en este sentido.

I.4.1. PÉPTIDOS ANTIFÚNGICOS.

La investigación de nuevos agentes antifúngicos ha mostrado un notable avance en los últimos años como consecuencia del incremento de las micosis en pacientes inmunodeprimidos por el SIDA o por tratamientos anticancerígenos, especialmente en las infecciones por *Candida spp.* o en aspergilosis invasivas (Odds y col., 2003), así como en la lucha contra los mohos en plantas, concretamente mediante la caracterización de nuevas proteínas con actividad antifúngica (Wang y Ng, 2001a,b, 2002, 2003; Wang y col., 2002) y la posterior expresión en plantas transgénicas (Jach y col., 1995; Oldach y col., 2001; Gao y col., 2000).

Los mecanismos de acción de los compuestos con actividad antifúngica se basan en la alteración de la estructura de la célula o de su fisiología. Algunos compuestos antifúngicos pueden interferir en la síntesis de ADN, ARN, o de proteínas, por lo que pueden provocar efectos tóxicos en las células de animales o plantas. Por otra parte, los que afectan a la cubierta externa suelen originar menos problemas de resistencias, pues es difícil que se produzcan mutaciones que afecten a toda la estructura de la cubierta celular (Tkacz y DiDomenico, 2001), por lo que la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos se orienta en este sentido (Thomma y col., 2003). Además, la membrana plasmática de los eucariotas superiores contiene colesterol, mientras que la de los mohos está compuesta fundamentalmente por ergosterol (Brennan y col., 1974), que suele ser

la principal diana de los agentes antifúngicos utilizados para tratamientos clínicos (Groll y col., 1998), ya que no afectan a las células humanas.

En los últimos años se han purificado y caracterizado péptidos y proteínas con efecto antifúngico a partir de plantas (Almeida y col., 2000; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Huang y col., 2002; Van den Bergh y col., 2002; Ye y col., 2002; Chu y col., 2003; Ng y col., 2003), bacterias (Miller y col., 1998; Munimbazi y Bullerman, 1998; Okkers y col., 1999; Nielsen y col., 1999, 2000; Yang y col., 2002; Chitarra y col., 2003), mohos (Nakaya y col., 1990; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Lee y col., 1999; Strobel y col., 1999; Geisen, 2000), artrópodos (Moerman y col., 2002; Wang y Ng, 2002; Bíliková y col., 2003; Tomie y col., 2003), anfibios (Conlon y col., 2003), reptiles (Gomes y col., 2005); y también se han descrito péptidos sintéticos (Fujie y col., 2001; Kundu y col., 2002; Lee y col., 2002; López-García y col., 2002; Patrzykat y col., 2003).

Existe una gran variabilidad en cuanto a la composición de aminoácidos y a las estructuras secundarias y terciarias de los péptidos antifúngicos, pero la mayoría se caracterizan por ser catiónicos y por formar estructuras anfipáticas (Hwang y Vogel, 1998). Se han descrito tres proteínas con actividad antifúngica producidas por mohos: *afp* de *Aspergillus giganteus*, *paf* de *Penicillium chrysogenum* y *Anafp* de *Aspergillus niger*. Todas ellas se caracterizan por su pequeño tamaño (51-58 aminoácidos), su alto contenido en residuos de cisteína y su fuerte carácter básico. Además, sus estructuras terciarias están estabilizadas por tres o cuatro puentes de bisulfuro y forman estructuras con un marcado carácter anfipático (Nakaya y col., 1990; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999).

El mecanismo de acción de las proteínas y péptidos antifúngicos es tan variado como los organismos que los producen (De Lucca y Walsh, 1999; Sitaram y Nagaraj, 1999; Selitrennikoff, 2001; Theis y Stahl, 2004).

Estos compuestos pueden unirse a la membrana celular fúngica y producir alteraciones sin atravesarla, provocando por ejemplo una despolarización de la membrana, disminución en los niveles de ATP e inhibición de la respiración celular (Cociancich y col., 1993), o incluso cambios en el potencial de membrana (Thevissen y col., 1996). Otros en cambio forman canales y poros en la membrana alterando su permeabilidad y provocando la pérdida de iones y otros solutos (Thevissen y col., 1999; Lee y col., 2001).

Algunas proteínas y péptidos atraviesan la membrana e interaccionan de forma específica con ciertas moléculas (Figura I.4), pudiendo provocar desde una inhibición de la síntesis de determinadas proteínas mediante la inactivación de los ribosomas fúngicos (Hwu y col., 2000) hasta alteraciones en el ADN. Otros pueden interferir en la síntesis de componentes esenciales de la pared celular como el β -1,3-glucano (Odds y col., 2003) o la quitina (Van den Berg y col., 2002; Yang y Gong, 2002; Von der Weid y col., 2003), e incluso pueden hidrolizarlos (Mauch y col., 1988; Sela-Buurlage y col., 1993; Graham y Sticklen, 1994). Esto debilita la pared y origina la lisis de la célula. Además, la unión a la quitina de la pared celular también puede provocar alteraciones en las hifas (Hancock y Chapple, 1999). No obstante, el modelo de acción de muchos compuestos antifúngicos de naturaleza proteica aún se desconoce.

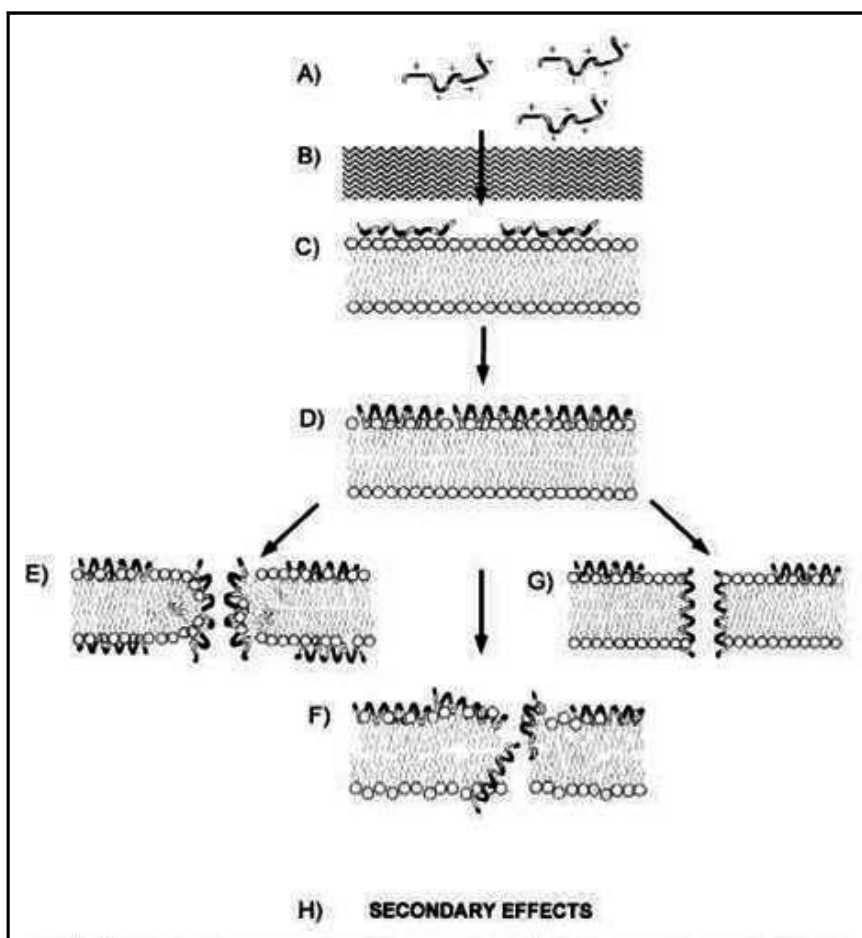


Figura I.4. Representación esquemática de los modelos propuestos para el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con estructura en α -hélice. (A) Atracción electrostática a la superficie aniónica microbiana, (B) paso a través de la membrana externa y/o la pared de peptidoglicano, (C) atracción electrostática a los fosfolípidos aniónicos de la membrana citoplasmática, (D) inserción en la membrana y acumulación, (E y G) formación de poros según los modelos *toridal* o *barrel-stave*, (F) permeabilización de la membrana, (H) efectos secundarios: unión al ADN o a proteínas, cambios en la composición de la membrana, interferencias con maquinaria celular esencial, etc. (Tossi y col., 2000).

Los péptidos antifúngicos de mayor utilidad son los que presentan mecanismos de acción específicos para las membranas de los hongos (Groll y col., 1998), ya que suelen ser poco tóxicos para las células de mamíferos. En la interacción del péptido con la membrana desempeñan un papel destacado la carga (Hoover y col., 2003) y el carácter catiónico o hidrofóbico del compuesto (Friedrich y col., 1999; Hancock y Chapple, 1999). Así, la hidrofobicidad y la

estructura en α -hélice, se correlacionan con la toxicidad para las células de mamíferos, mientras que la carga positiva afecta más al efecto antifúngico (Hong y col., 2001).

A diferencia de lo que sucede con otros antibióticos, no existe una gran preocupación por las reacciones cruzadas entre compuestos desarrollados para medicina humana y para su uso en alimentos, ya que los mohos que se desarrollan normalmente en alimentos son diferentes a los que producen micosis en el hombre. Además existe una gran diversidad de compuestos y de mecanismos de acción. Algunas de esas sustancias son sensibles a los enzimas digestivos, por lo que se degradan en el tracto gastrointestinal, lo que constituye una enorme ventaja para su posible utilización en alimentos.

La utilización de cepas de mohos productores de péptidos antifúngicos, solas o combinadas con otras, como cultivos protectores en productos cárnicos madurados, permitiría reducir o incluso eliminar la incidencia de mohos toxigénicos y estandarizar las características del producto. La obtención y caracterización de los péptidos responsables de la actividad también permitiría la utilización del péptido como aditivo en productos cárnicos madurados.

I.5. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Para obtener microorganismos con actividad antimicrobiana es necesario evaluar diversas cepas, discriminando las que deben su actividad a compuestos de naturaleza peptídica de las que producen otros compuestos con actividad fungicida. Además, es preciso detectar las cepas activas que puedan formar micotoxinas u otros compuestos indeseables. Por último, sería necesario conocer el efecto de los mohos con actividad antifúngica en las características del alimento inoculado, para excluir los que puedan alterar el producto o interferir en la actividad de los microorganismos deseables.

I.5.1. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Se han descrito numerosos métodos para detectar la actividad inhibidora tanto de los organismos productores como de las proteínas con actividad antimicrobiana ya purificadas. Algunos se basan en la formación de zonas de inhibición. En el caso del *agar plug test* (Larsen y Knochel, 1997) o del *plate inhibition assay* (Geisen, 2000), se cortan porciones de agar donde ha sido incubado el microorganismo inhibidor el tiempo necesario para que produzca los compuestos antifúngicos. Posteriormente se transfieren a placas que han sido inoculadas con los microorganismos diana. Tras la difusión de los compuestos inhibidores a través del agar se observan las zonas de inhibición. De manera similar, puede utilizarse el medio líquido de cultivo donde se ha incubado el microorganismo inhibidor para rellenar pocillos realizados en las placas inoculadas con los microorganismos diana, como es el caso del *spot on lawn assay* (Larsen y Knochel, 1997) o el *agar-well diffusion* (Von der Weid y col., 2003). En estos casos el potencial inhibitorio se estima en función del área de la zona de inhibición producida. Otros autores disponen el péptido ya purificado sobre discos de papel y observan si interfiere en el desarrollo del moho diana sembrado en el centro de la placa (Van den Bergh y col., 2002; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y col., 2003).

También se han llevado a cabo numerosos métodos en placas multipocillo (Broekaert y col., 1990; Amsterdam, 1996; Steinberg and Lehrer, 1997; Hancock, 1997; du Toit y Rautenbach, 2000), tanto con el medio de cultivo donde se ha incubado el microorganismo productor como con los compuestos ya purificados. En este caso, el crecimiento del microorganismo diana se traduce en un incremento en la densidad óptica de los pocillos en función del tiempo. De este modo, puede cuantificarse el potencial inhibitorio comparando el desarrollo normal con el producido en presencia de determinadas sustancias. Además de permitir una cuantificación, estos métodos permiten la realización de muchos

ensayos de manera simultánea y la utilización de cantidades muy pequeñas de reactivos.

Por otra parte, pueden utilizarse diversos microorganismos como indicadores de la inhibición: desde mohos sensibles a diversos antifúngicos, pasando por mohos alterantes o toxigénicos, hasta los que componen la microbiota habitual del producto. Debido a todo lo anterior, estos métodos deben ser modificados en función del tipo de sustancia antimicrobiana, del organismo productor, del alimento al que se destinan, o de los microorganismos que vayan a ser utilizados como indicadores de la inhibición.

I.5.2. CARACTERIZACIÓN FÚNGICA.

Actualmente existen técnicas muy diversas encaminadas a la identificación y caracterización de mohos. Las técnicas utilizadas tradicionalmente se basan en la observación de las características morfológicas que presentan los mohos en determinados medios de cultivo y bajo condiciones de temperatura y humedad relativa específicas (Pitt y Hocking, 1997). Aunque el aspecto macroscópico de los mohos puede variar considerablemente dentro de una especie en función de su estado fisiológico (Wiley, 1981), estas técnicas siguen siendo utilizadas por lo general acompañadas de otras pruebas complementarias tendentes a una identificación adecuada.

Los mohos también pueden caracterizarse en función de su comportamiento frente a diferentes sustratos, o bien a través de características químicas como el perfil lipídico, proteínico o por la producción de metabolitos secundarios como las micotoxinas (Khachatourians, 1999).

Hay opiniones diferentes respecto de la utilización del perfil de metabolitos secundarios para la caracterización e identificación de mohos. Algunos autores consideran que los metabolitos secundarios son específicos de cepa, mientras

otros consideran que su síntesis está condicionada por factores ambientales (Khachatourians, 1999). Sin embargo en algunos géneros, entre los que se incluyen *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, los metabolitos secundarios han demostrado ser fiables para su identificación (Frisvad y Filtenborg, 1990; Khachatourians, 1999).

Entre los métodos que pueden ser utilizados para el análisis de metabolitos secundarios se encuentran las técnicas inmunológicas y cromatográficas.

Las técnicas inmunológicas se basan en el reconocimiento de polisacáridos extracelulares y proteínas antigénicas de superficie (Khachatourians, 1999). En el caso de las micotoxinas, que no son antigénicas, los estudios se orientan hacia la búsqueda de micotoxinas unidas a una proteína o polipéptido transportador (Chu, 1992; Ward y col., 1993).

Existen además gran variedad de técnicas aplicables al estudio del perfil de metabolitos secundarios para la identificación de mohos, como la cromatografía en capa fina (Frisvad y col., 1989), cromatografía de gases (Scott, 1993), cromatografía o electroforesis capilar (Holland y Sepaniak, 1993; Nielsen y col., 1996; Martín y col., 2005), o cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de masas (Malmstrom y col., 2000) o de batería de diodos (Frisvad, 1987b). La cromatografía líquida asociada a un espectrómetro de masas ha sido utilizada para el análisis de micotoxinas producidas por mohos aislados de jamón curado (Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002). Así mismo, la electroforesis capilar además de permitir la detección de diferentes micotoxinas en alimentos (Tsao y Zhou, 2000; Peña y col., 2002), ha sido empleada recientemente para la caracterización de mohos aislados de productos cárnicos madurados en función del perfil de metabolitos secundarios (Martín y col., 2004).

También se ha propuesto el estudio de extractos fúngicos mediante espectrometría de masas con electrospray para la identificación de mohos

(Smedsgaard y Frisvad, 1996, 1997). Asimismo, el análisis de compuestos volátiles mediante *nariz electrónica* parece ser muy útil para la identificación de la población fúngica desarrollada durante el almacenamiento de los cereales (Magan y Evans, 2000).

Finalmente, también existen técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos entre las que destacan por su utilidad para mohos, la secuenciación de las regiones ITS para la identificación a nivel de especie (White y col., 1990; Peterson, 1995; Morrison y col., 2005), y el análisis del polimorfismo del ADN amplificado al azar o RAPD para la caracterización de cepas (Meyer y col., 1991, 1993; Bayman y Cotty, 1993).

I.5.3. DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.

Se han aislado gran cantidad de mohos de productos cárnicos madurados capaces de producir micotoxinas (Tabla I.2). Debido a esto, una vez que se han seleccionado las cepas con actividad antifúngica resulta necesario descartar el hecho de que deban su actividad a la producción de micotoxinas.

Las condiciones ambientales, fundamentalmente la temperatura y la a_w , así como la disponibilidad de nutrientes, son críticas para el desarrollo del moho y para la producción de micotoxinas. No obstante, las condiciones necesarias para que el microorganismo produzca las micotoxinas son mucho más limitadas que las requeridas para el desarrollo del moho, y pueden variar entre micotoxinas distintas producidas por la misma especie de moho (Frisvad y Samson, 1991).

Para descartar que la actividad antifúngica detectada se deba a la producción de micotoxinas se debe realizar la extracción de las mismas en idénticas condiciones en las que se detectó la actividad inhibitoria. No obstante, el hecho de que el moho no forme micotoxinas en esas condiciones no implica necesariamente la ausencia de potencial toxigénico en el mismo. Por ello, para las cepas

seleccionadas para su utilización en productos cárnicos madurados debe comprobarse que no producen micotoxinas en el amplio rango de temperaturas y a_w que tienen lugar durante la elaboración de este tipo de productos (Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002).

Se han descrito numerosos métodos para el estudio del potencial toxigénico de mohos aislados de productos cárnicos madurados (Núñez y col., 1996b, 2000; Díaz, 1999; Sosa y col., 2002; López-Díaz y col., 2001; Tabuc y col., 2004). En todos los casos, la extracción de las micotoxinas se realiza con diferentes solventes orgánicos.

Posteriormente, los extractos obtenidos pueden separarse y analizarse mediante cromatografía en capa fina (López-Díaz y col., 2001; Tabuc y col., 2004), electroforesis capilar micelar electrocinética (Martín y col., 2004) o cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002), método que permite además realizar una cuantificación de las micotoxinas detectadas. También existen tests comerciales basados en pruebas inmunológicas para la detección de determinadas micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, etc. (Comi y col., 2004). Además, la producción de micotoxinas también puede cuantificarse mediante espectrofluorodensitometría (Tabuc y col., 2004).

I.5.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO.

Una vez seleccionadas las cepas de mohos no toxigénicas con actividad antifúngica, se puede evaluar el efecto del moho sobre el producto en el que se vaya a aplicar y sobre el resto de la población microbiana presente en el mismo.

Las actividades metabólicas que pueden contribuir a las características del producto acabado son fundamentalmente la capacidad del moho para hidrolizar

proteínas y lípidos y para generar compuestos volátiles de interés en los productos cárnicos madurados (véase apartado I.3.1). Por otro lado, se debe asegurar que el moho con actividad antifúngica sea capaz de inhibir al resto de mohos no deseables presentes en el producto cárnico madurado, sin afectar a las cepas deseables.

I.6. OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Para obtener las proteínas con actividad antifúngica es necesario seleccionar las técnicas más adecuadas para la extracción y purificación de la proteína diana en función de sus características y las del organismo productor.

I.6.1. OBTENCIÓN.

Los procedimientos de obtención deben ser seleccionados según la fuente de proteínas. En el caso de que sean producidas por mohos, los posibles compuestos activos van a ser liberados al medio de cultivo para que puedan tener efecto. Por ello, la obtención de proteínas a partir de medios de cultivo no requiere generalmente operaciones previas como la homogeneización. En ese caso, se debe diseñar un medio de cultivo que estimule la producción de la proteína diana y la posterior liberación al medio (Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Lee y col., 1999; Geisen, 2000). Para ello, el microorganismo se cultiva en distintos medios con proporciones diferentes de hidratos de carbono, proteínas, minerales, etc., así como a distintas a_w y temperaturas durante periodos de incubación variables. Esto además ofrece información sobre las condiciones óptimas de producción de la proteína, de gran utilidad para la posterior utilización del moho en la elaboración del producto cárnico.

I.6.2. PURIFICACIÓN.

Los métodos de purificación de proteínas más comúnmente utilizados incluyen precipitación y cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de exclusión (Bonnerjea y col., 1986). La selección y el orden en el que se apliquen dependerá de la información de que dispongamos respecto de la proteína diana, tales como la estabilidad a diferentes pHs, sales o temperaturas, sensibilidad a proteasas, peso molecular, punto isoelectrico, solubilidad, hidrofobicidad, afinidad por determinados sustratos, etc. En el caso de los péptidos antifúngicos la hidrofobicidad y la estructura en α -hélice se correlacionan con la toxicidad para las células de mamíferos, mientras que la carga positiva afecta más al efecto antifúngico (Hong y col., 2001).

I.6.2.1. SEPARACIÓN POR PRECIPITACIÓN.

La solubilidad de las proteínas en diferentes soluciones depende de la concentración de la misma y de la carga de los aminoácidos en la molécula, por lo que puede modificarse en función del pH o la temperatura.

La precipitación con **sulfato amónico** $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ permite extraer y concentrar proteínas de manera eficaz, por lo que es una técnica que puede utilizarse en las primeras etapas de la purificación proteica (Wang y Ng, 2001a). No obstante, el extracto obtenido contiene una elevada concentración de sal que debe eliminarse posteriormente mediante diálisis, ultrafiltración o columnas de desalado.

La utilización de **solventes orgánicos** permite fraccionar proteínas en función de la solubilidad en los mismos, aunque muchos péptidos podrían desnaturalizarse (Khmelnitsky y Rich, 1999), por lo que no es una técnica muy adecuada si se requiere recuperar posteriormente la actividad de la proteína diana.

I.6.2.2. SEPARACIÓN POR ADSORCIÓN.

La adsorción cromatográfica se basa en la separación de compuestos en función de la diferente afinidad a un soporte sólido y a un solvente móvil.

La **cromatografía de intercambio iónico** se basa en una interacción reversible entre una proteína cargada y un soporte con carga opuesta. Posteriormente las proteínas se eluyen selectivamente de la columna mediante el incremento de la fuerza iónica o cambios en el pH. Es la técnica más frecuentemente utilizada para la purificación de proteínas (Bonnerjea y col., 1986), ya que pueden utilizarse volúmenes de muestra muy variables. En los péptidos antifúngicos específicos para las membranas de los hongos desempeña un papel destacado la carga (Hoover y col., 2003) y el carácter catiónico o hidrofóbico (Friedrich y col., 1999; Hancock y Chapple, 1999) del compuesto. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio iónico resulta muy útil para la purificación de los péptidos con actividad antifúngica (Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Lee y col., 1999; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y col., 2003).

La **cromatografía de afinidad** separa proteínas en función de una interacción reversible con un ligando inmovilizado covalentemente en la matriz de la columna (Dean y col., 1985). La desorción se lleva a cabo de manera específica mediante el uso de ligandos competitivos, cambios en el pH, en la fuerza iónica o en la polaridad. Esta técnica ofrece una gran especificidad, por lo que suele ser de gran utilidad cuando se conoce el compuesto a purificar. De hecho, se utiliza con frecuencia para la obtención de proteínas con actividad antifúngica a partir de vegetales (Van den Berg y col., 2002; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y col., 2003). Por el contrario, cuando se desconocen los compuestos activos no es tan útil, al no disponerse de matrices comerciales aplicables a la purificación de gran variedad de proteínas.

La **cromatografía en fase reversa** se utiliza para separar proteínas en función de su hidrofobicidad. Debido a la naturaleza de las matrices utilizadas, la unión es normalmente tan fuerte que requiere el uso de solventes orgánicos para la elución, por lo que muchas proteínas pueden desnaturalizarse (Khmelnitsky y Rich, 1999). Es una técnica muy selectiva y de alta resolución, por lo que suele utilizarse en las últimas fases de la purificación proteica (Marx y col., 1995; Lee y col., 1999; Gomes y col., 1995), y siempre que no se requiera una recuperación posterior de la actividad de la proteína diana.

El **cromatoenfoco** es una variante de la cromatografía de intercambio iónico (Sluyterman y Kooistra, 1989). Mediante la generación de un gradiente de pH *in situ* se concentran las moléculas por su punto isoeléctrico. Se utiliza para determinar el punto isoeléctrico de las proteínas purificadas (Moyne y col., 2001).

I.6.2.3. SEPARACIÓN POR TAMAÑO.

La separación tiene lugar en función del peso molecular y de la conformación de las proteínas, lo que determina su paso a través de unos poros de diámetro conocido.

La **ultrafiltración** permite la separación de proteínas en función del tamaño mediante membranas con diferentes límites de corte. No obstante, se han descrito multitud de proteínas antifúngicas de tamaños muy variables, por lo que es una técnica que no resulta muy útil si se desconoce el tamaño de la proteína diana.

La **cromatografía de exclusión o filtración en gel** es una técnica basada en la capacidad de una molécula para penetrar a través de los poros de las partículas del gel, lo que permite separar proteínas en función de su peso molecular (Borman, 1983). Aunque suele utilizarse para desalar extractos obtenidos mediante precipitación con diferentes sales, es ideal para las últimas etapas de purificación (Lacadena y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Wang y Ng,

2001a,b, 2003; Chu y col., 2003; Gomes y col., 2005) ya que el volumen de muestra influye significativamente en la resolución. Además permite realizar una estimación del peso molecular de la proteína diana mediante el uso de patrones.

I.6.2.4. SEPARACIÓN POR ELECTROFORESIS.

La **electroforesis en gel de poliacrilamida** puede utilizarse para separar proteínas en función de su carga y tamaño, mediante electroforesis no desnaturizantes o nativas (Bonnerjea y col., 1986); o bien sólo en función del tamaño de sus subunidades, mediante electroforesis desnaturizantes (Weber y Osborn, 1969). Las matrices sólidas discontinuas son las más utilizadas y constan de dos geles, uno concentrador con gran tamaño de poro y otro separador cuyo tamaño de poro dependerá del peso molecular de las proteínas a separar (Ornstein, 1964; Laemmli, 1970).

Muchos autores han utilizado estos geles para comprobar la pureza y calcular el peso molecular de la proteína purificada (Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Lee y col., 1999; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y Ng, 2003). También es un paso previo a la fijación en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de las proteínas a secuenciar.

La **electroforesis capilar en gel** permite separar proteínas y péptidos de peso molecular alto (Grossman y col., 1989; Ganzler y col., 1992) mediante la aplicación de un alto voltaje sobre un capilar relleno de un gel de poliacrilamida o matrices de polímeros de dextranos a través del que se separa la muestra. Los compuestos son posteriormente identificados y cuantificados mediante diferentes detectores, siendo los de ultravioleta y de fluorescencia los más utilizados (Swedberg, 1997). El volumen de muestra analizado así como el que se obtiene tras el análisis es muy pequeño, por lo que es una técnica que puede ser útil en las últimas fases de la purificación para comprobar el grado de pureza de la muestra.

I.6.3. CARACTERIZACIÓN.

Una vez purificada la proteína resulta de gran interés para su posterior aplicación en el alimento la caracterización de la misma. Se pueden determinar sus condiciones óptimas de actuación (temperatura, ph, etc.), la sensibilidad a distintos tratamientos (térmicos, enzimas proteolíticos, etc.), concentración mínima inhibitoria, o espectro de inhibición. Además, el conocimiento tanto de la secuencia de aminoácidos como de los genes que codifican la proteína puede ser de gran utilidad para una futura expresión. No obstante, antes de su utilización en alimentos, se debe asegurar que la proteína no cause daños en los consumidores.

I.6.3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

El pH del medio tiene una gran influencia en la actividad antifúngica de la proteína ya que la carga positiva se correlaciona con el efecto antifúngico (Hong y col., 2001). Las proteínas con actividad antifúngica podrían utilizarse como aditivo para la elaboración de algunos productos cárnicos madurados. Estos productos ofrecen unas condiciones de temperatura, pH o a_w muy variables a lo largo del proceso de elaboración, por lo que es necesario evaluar las condiciones en las que la proteína mantiene la actividad antifúngica para determinar su posible aplicación.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria para los diferentes microorganismos resulta fundamental para asegurar la ausencia de mohos no deseables en el caso de aplicar el compuesto antifúngico en el alimento.

I.6.3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A TRATAMIENTOS TÉRMICOS Y ENZIMÁTICOS.

Los tratamientos térmicos que puedan tener lugar durante la elaboración de los productos cárnicos madurados no suelen ser inconveniente para la utilización de proteínas antifúngicas, ya que en general son muy estables al calor (Lacadena y col., 1995).

En los productos cárnicos madurados se desarrolla una población fúngica que libera al medio numerosos enzimas proteolíticos, por lo que resulta de gran interés la evaluación de la sensibilidad de las proteínas antifúngicas al tratamiento con estos enzimas. Además, en la elaboración de algunos productos cárnicos pueden utilizarse enzimas proteolíticos para acelerar la maduración (Fernández y col., 2000). Por otro lado, la degradación tras el tratamiento con enzimas digestivos representa una enorme ventaja para su posible utilización en alimentos.

I.6.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA.

Conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína es de gran utilidad ya que permite encuadrarla dentro de alguna de las familias conocidas. A partir de la secuencia de aminoácidos también se puede determinar la configuración espacial de la proteína, que condiciona en gran medida el mecanismo de acción de la misma. De hecho, la estructura en α -hélice se correlaciona con la toxicidad para las células de mamíferos (Hong y col., 2001). Por otro lado, todas las proteínas con actividad antifúngica producidas por mohos que han sido descritas presentan una estructura terciaria estabilizada por tres o cuatro puentes bisulfuro (Nakaya y col., 1990; Campos-Olivas y col., 1995; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999).

Cada aminoácido se corresponde con una secuencia concreta de nucleótidos, es decir, tiene una secuencia concreta en el genoma para su síntesis. Por ello, el conocimiento de esas secuencias permite una manipulación genética encaminada a su expresión.

Existen diferentes estrategias para encontrar los genes de síntesis de una proteína, como la elaboración de bibliotecas de ADN complementario (ADNc; Marx y col., 1995). Para ello es necesario elegir un vector o plásmido que se utilizará como herramienta para la construcción de la biblioteca. Los vectores plasmídicos son capaces de clonar fragmentos de ADNc desde cientos de pares de bases hasta unas 9000 pares de bases, ya que tamaños mayores necesitan otros vectores como los cósmidos (Chang y col., 1993). La elección del plásmido depende de los sitios de clonación, de restricción y de los lugares de resistencia a antibióticos. Una vez elegido el vector se une al ADNc sintetizado. Posteriormente se introducen en el microorganismo competente elegido, formándose los transformantes que constituirán la biblioteca. Los clones relacionados con la síntesis de la proteína se detectan mediante una sonda de ADN (Redkar y col., 1996) que puede elaborarse a partir de la secuencia del extremo amino terminal de la proteína purificada.

Otras estrategias encaminadas a encontrar los genes relacionados con la síntesis de la proteína están basadas en la realización de PCRs directamente sobre el ADN genómico (Geisen, 2000) o el ARN mensajero (RT-PCR) del microorganismo productor de la proteína. Para ello se pueden utilizar cebadores diseñados a partir de las secuencias amino y carboxilo terminal de la proteína purificada. El fragmento resultante puede ser clonado y secuenciado.

La determinación de la secuencia de ADN que codifica la producción de proteínas con actividad antifúngica puede ser de gran interés para la transformación de otros microorganismos aislados de productos cárnicos madurados, que aunque presenten unas características tecnológicas deseables,

sean incapaces de competir con el resto de la población fúngica presente en estos productos a lo largo de todo el proceso de elaboración. Por otra parte, también permitiría una producción de la proteína a nivel industrial para su posible utilización como aditivo en alimentos en los que la presencia de mohos no sea deseable.

I.7. OBJETIVOS.

Dado que en los productos cárnicos madurados se desarrollan mohos que pueden contribuir a las características del producto final, pero que también pueden alterarlo e incluso producir micotoxinas, es necesario controlar la población fúngica superficial. Los métodos eficaces para lograr este objetivo resultan poco adecuados para estos productos. La reciente descripción de péptidos antifúngicos producidos por mohos abre nuevas perspectivas en este sentido. No obstante, los posibles compuestos de interés han de ser activos durante la maduración por lo que deberían resistir la acción de enzimas microbianos. Además, sería deseable que se degradasen en el tracto gastrointestinal. Por último, una posible utilización de los mohos productores en productos cárnicos madurados requiere una evaluación de la influencia de los factores ambientales en la producción del compuesto activo.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido seleccionar cepas de *Penicillium* productoras de péptidos que inhiban el desarrollo de mohos indeseables, con el fin de proponerlos como cultivos protectores para productos cárnicos madurados. Para lograr este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Selección de cepas de *Penicillium* con actividad antifúngica a partir de mohos aislados en las distintas etapas del procesado y en diferentes industrias con distinta localización geográfica.
- Caracterización de la actividad antifúngica debida a compuestos solubles para seleccionar las cepas que deban su actividad a compuestos de naturaleza proteica, descartando las que produzcan algún compuesto no deseado como las micotoxinas.

- Purificación de los compuestos antifúngicos de naturaleza peptídica de interés para el estudio posterior de su actividad.
- Evaluación de la capacidad de producción de los compuestos de interés en condiciones similares a las de maduración de los productos cárnicos para valorar la posible utilización de los mohos productores como cultivos protectores.
- Caracterización de los compuestos activos, incluyendo su actividad frente a mohos de interés en productos cárnicos madurados y su sensibilidad al tratamiento con enzimas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

II.1. MATERIAL.

II.1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Para la realización de la parte experimental de este trabajo, se han empleado productos químicos de calidad reactivo suministrados por las casas comerciales SIGMA, SCHARLAB, ALDRICH, DIFCO, PANREAC y MERCK.

Los medios de cultivo utilizados para la siembra de las distintas cepas de mohos, fueron preparados con productos de las firmas SCHARLAB, DIFCO y PANREAC.

Los gases utilizados fueron suministrados por AIR LIQUIDE.

II.1.2. APARATOS.

Todas las manipulaciones que requerían condiciones de esterilidad, se realizaron en campanas de flujo laminar TELSTAR mod. BIO-II-A con lámpara UVA SILVANA 46320 (1x15 W) con tubo PHILIPS ultra-violet 15 W, y TELSTAR mod. AV-30/70.

Las pesadas rutinarias se llevaron a cabo en una balanza electrónica AND mod. FV-300 de precisión 10 mg. Para las de precisión se empleó una balanza analítica SARTORIUS mod. 1601A de precisión 0,1 mg.

Para las mediciones de pH se utilizó un pHmetro CRISON mod. MICROPH 2002.

La preparación de los medios de cultivo y del resto de disoluciones se llevó a cabo en agitadores térmicos magnéticos JENWAY mod. 1000 y SELECTA mod. Agimatic-N.

Las mediciones de la actividad del agua se realizaron con un medidor Fa-st/1 de GBX (Scientific Instruments).

Los microorganismos fueron incubados en una estufa SELECTA mod. 207 con temperatura regulable y en estufas refrigeradas AQUA LYTIC de FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC. Los incubadores orbitales utilizados fueron mod. INNOVA 4000 de NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC y BIOTECH-CERTOMAT mod. IS, de BRAUN.

La observación de las preparaciones fúngicas para su caracterización se llevó a cabo en un microscopio invertido NIKON mod. ALPHAPHOT2 YS-2. Para el recuento de esporas se utilizó una lupa con luz marca IUL y una cámara de recuento (0,0025 mm² x 0,100 mm) de BRAND.

Las pipetas automáticas de 1-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl y de 1-5 ml utilizadas son de la marca BIOHIT.

Las muestras para la preparación de los extractos fúngicos para la detección de micotoxinas se homogeneizaron en un homogeneizador de paletas mod. LAB-BLENDER 400. Dichos extractos se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro de la marca SCHARLAB.

La evaporación de grandes volúmenes de cloroformo se realizó en un rotavapor HEIDOLPH mod. VV2000 con destilador conectado a una trompa de agua SAVANT mod. Speed vac Water Jet SWJ120. Los volúmenes pequeños de cloroformo se evaporaron bajo corriente de nitrógeno en una cámara de extracción de gases SIEMENS.

La concentración a vacío de los extractos se llevó a cabo en equipo formado por un condensador REFIGERATED CONDENSATION TRAP RT4104 acoplado a una bomba TELSTAR mod. UNL-25.

Las centrifugaciones fueron realizadas en una microcentrífuga refrigerada mod. 5417 C/R de EPPENDORF y una de sobremesa MICROSPIN mod. 24 S de SORVALL.

El tratamiento por calor de las muestras se llevó a cabo en un bloque térmico mod. TEMBLOC de SELECTA, en un baño de agua PRECISTERM mod. S-140 y en un baño de arena COMBIPLAC de P-SELECTA.

Los medios de cultivo, soluciones y diverso material de laboratorio, fueron esterilizados en un autoclave mod. AUTESTER S-437-G de SELECTA. Para las esterilizaciones por filtración se utilizaron filtros de acetato de celulosa de 0,22 μm de diámetro de poro de ALBET.

Para la filtración de los diferentes tampones utilizados en la purificación del péptido se utilizaron filtros de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro de ALBET.

El agua destilada se obtuvo mediante el tratamiento con un destilador de USF mod. PURELAB pRO. El agua utilizada para la preparación de tampones y diversas soluciones, fue previamente tratada con un desionizador mod. ELGASTAT UHQ MKII de ELGA.

Reactivos y microorganismos fueron conservados en un refrigerador ZANUSSI mod. ZF/26 y en una cámara refrigerada VEREDECA mod. 230 AXEX. Las muestras se mantuvieron en un congelador mod. -86°C ECONOFREEZER de FORMA SCIENTIFIC y en un arcón congelador ZANUSSI.

Las amplificaciones de ADN se realizaron en un termociclador mod. iCycler de BIORAD.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se llevaron a cabo en cubetas verticales mod. MINIPROTEAN de BIORAD. Las electroforesis en gel de agarosa de ácidos nucleicos se hicieron en cubeta horizontal de BIORAD mod. Sub-Cell GT. En ambos casos se utilizó una fuente de alimentación mod. POWER PAC 300 también de BIORAD.

Los geles de agarosa se observaron con luz ultravioleta en un transiluminador mod. VILBER LOURMAT.

Las fotografías de los geles de agarosa y de poliacrilamida fueron tomadas con una cámara digital KODAC mod. DC 290. La intensidad de las bandas se analizó con un programa informático de análisis de imagen KODAC, versión 3.5 (Kodac Digital Science 1D Image Analysis Software).

Para la transferencia del péptido a las membranas de difluoruro de polivinilideno (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) se utilizó una cubeta de transferencia electroforética de BIORAD alimentada por una fuente mod. POWER PAC 300 también de BIORAD.

El equipo de electroforesis capilar empleado fue el BECKMAN P/ACE System 2200 con detector de ultravioleta y batería de diodos. Se utilizó una columna silanizada de 75 μm de diámetro suministrada por SUPELCO PARK. Los datos se analizaron con el programa informático SYSTEM GOLD versión 711.

Las lecturas de absorbancias de las placas multipocillo se llevaron a cabo en un lector de MERCK mod. MIOS MR 7000.

Para la cuantificación del nitrógeno se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro VIS-UV-HITACHI, mod. U-2000.

La separación y análisis de micotoxinas y metabolitos secundarios se realizó en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) mod. 1100 de HEWLETT PACKARD. Para la separación se utilizó una columna de C:18 de PHENOMENEX de 25 cm x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm. Los diferentes compuestos se detectaron con un detector de luz ultravioleta mod. 166 a 254 nm y un detector de masas LCQ MS de FINNIGAN MAT.

La caracterización bioquímica de los diferentes aislados se llevó a cabo en un sistema de BIOLOG compuesto por un lector de placas multipocillo BIOLOG MicroStation, el programa informático MicroLog™ 3 y las bases de datos de mohos de Biolog.

La separación y purificación de los compuestos de naturaleza proteica con actividad antifúngica se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido para la purificación rápida de proteínas (FPLC) mod. ÄKTA_{FPLC} con un colector de fracciones mod. FRAC-950, ambos de AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. El análisis de los resultados obtenidos se realizó con el programa informático UNICORN version 4.12. Se utilizaron las columnas de sefaroza HiTrap™ SP HP y HiLoad™ 26/10 SP HP de intercambio catiónico; y columnas de filtración en gel Superose™ 12 10/300 GL, Superdex™ 75 HR 10/30 y HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75, todas ellas suministradas por AMERSHAM BIOSCIENCES.

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se empleó el programa informático SPSS para Windows versión 12.0.

II.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO.

Las cepas de mohos utilizadas para la purificación de los compuestos antifúngicos fueron aisladas en 9 industrias productoras de jamón curado situadas en diferentes localidades de las provincias de Salamanca, Cáceres, Badajoz y Huelva. También se utilizaron las cepas BFE66 y BFE67 de *Penicillium nalgiovense* con actividad antifúngica (Geisen, 2000), cedidas por el Dr. Rolf Geisen (Centro Federal de Investigación, Instituto de Higiene y Toxicología, Karlsruhe, Alemania), y 3 mohos con actividad proteolítica aislados de jamón curado (Núñez y col., 1996b; Rodríguez y col., 1998): *Penicillium chrysogenum* Pg131, *P. chrysogenum* Pg341 y *P. nalgiovense* Pj261, de la colección de la Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura.

Los mohos utilizados como indicadores de la inhibición son cepas toxigénicas aisladas de jamón curado (Núñez y col. 1996b; Díaz, 1999) de la colección de la Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura, y cepas toxigénicas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo: *Aspergillus flavus* CECT 2687 Af2687, *Aspergillus parasiticus* CECT 2682 Ap2682, *Aspergillus versicolor* CECT 2664 Av2664, *Penicillium aurantiogriseum* CECT 2918 Pa2918 y *Penicillium griseofulvum* CECT 2919 Pg2919.

En las transformaciones se utilizaron las células competentes de *Escherichia coli* Subcloning EfficiencyTM DH5 α TM de la casa comercial INVITROGEN.

II.1.4. PATRONES.

El patrón utilizado como marcador de pesos moleculares en las electroforesis en gel de poliacrilamida, suministrado por la casa comercial SIGMA, contiene una mezcla liofilizada de albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de la tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14,2 kDa) y aprotinina (6,5 kDa).

Para determinar el tamaño de los productos de PCR se utilizaron dos marcadores de pesos moleculares de ADN diferentes: de 0,15 a 2,1 kb de ROCHE y de 0,5 a 10 kb de AMERSHAM BIOSCIENCES.

Para la detección e identificación de micotoxinas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS) y electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC) se utilizaron los siguientes patrones de micotoxinas: patulina, ácido penicílico, viridicatumtoxina, roquefortina C, aflatoxinas G1 y B1, griseofulvina, citreoviridina, ácido micofenólico, citrinina, ocratoxina A, xanthomegmina, verruculógeno, esterigmatocistina, ácido secalónico D, ácido ciclopiazónico, fumitremorgina B, verrucosidina, paxilina, deoxinivalenol, zearalenona y penitrem A, suministradas por la casa comercial SIGMA y el Centro Federal de Investigación de la Carne de Kulmbach en Alemania.

Para la determinación del punto isoelectrico por electroforesis capilar de isoelectroenfoque se utilizó un patrón constituido por ribonucleasa, anhidrasa carbónica II, β -lactoglobulina y péptido CCK, incluido en el kit cIEF 3-10, de la casa comercial BECKMAN.

II.2. MÉTODOS.

II.2.1. OBTENCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

II.2.1.1. TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE MOHOS.

El muestreo se realizó en nueve industrias distintas en poblaciones diferentes de las provincias de Badajoz (I), Cáceres (II y III), Salamanca (IV, V, VI, VII y VIII) y Huelva (IX). En cada industria se tomaron muestras de la población fúngica mediante el raspado de 25 cm² de la superficie de al menos cinco jamones en las etapas del procesado que fue posible. Concretamente, en las industrias I, II, III, VI, y VII se muestrearon jamones en las fases de postsalado (P), secadero (S) y bodega (B), al igual que en las industrias IV y IX donde además se tomaron muestras de dos secaderos (SI y SII), y dos bodegas (BI y BII) sólo en el caso de la industria IV. Nos obstante, en ambos casos secaderos por un lado y bodegas por otro, se diferenciaron únicamente en la localización de la sala dentro de la misma industria, no en el tiempo de maduración del producto. Finalmente, en las industrias V y VIII sólo pudieron tomarse muestras de jamones en fase de bodega, aunque en la VIII se muestrearon jamones de uno y tres años de maduración (BI y BII, respectivamente).

Dado que se estimaba que el recuento en estas muestras para la población fúngica sería superior a 10⁵ u.f.c/cm², se realizaron diluciones decimales en agua de peptona al 1% estéril. Las siembras se efectuaron en tres medios de cultivo diferentes para obtener la mayor diversidad posible entre los aislados:

- Agar creatina sacarosa neutro (CSN; Pitt, 1993), para diferenciación de especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium* o poliverticilados.
- Agar diclorán glicerol al 18% (DG18; Hocking y Pitt, 1980), medio con actividad de agua intermedia.

- Agar extracto de carne (AEC; Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2002), elaborado con componentes similares a los encontrados en productos cárnicos.

Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días. Posteriormente se aislaron al menos tres colonias de cada una de las placas que mostraran distintas características morfológicas o fisiológicas.

II.2.1.2. SELECCIÓN MEDIANTE EL ENSAYO DE INHIBICIÓN RADIAL EN MEDIO SÓLIDO.

Para detectar la posible actividad inhibidora de los aislados se utilizaron como referencia 5 cepas de la colección de la Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura (*Penicillium expansum* Px121, *Penicillium echinulatum* Pe321, *Penicillium commune* Pc332, *Aspergillus sydowii* As161 y *Aspergillus niger* An261), aisladas de productos cárnicos madurados (Núñez y col., 1996b), y seleccionadas por su capacidad de producción de micotoxinas (Díaz, 1999).

El método utilizado para evaluar la actividad antifúngica de los aislados obtenidos frente a las cepas de referencia, se basa en una modificación del propuesto por Geisen (2000). Cada uno de los aislados se sembró en placas de agar extracto de malta (AEM; Rapper y Thom, 1949) a pH 4,5, y se incubó a 25°C durante 4 días. Tras la incubación se extrajeron del medio 5 cilindros de 2,5 cm de diámetro, que se traspasaron a otras tantas placas estériles. En cada una de las placas se colocaron tres cilindros, cada uno de un aislado diferente. Cada placa se rellenó con una mezcla de 30 ml de AEM fundido a pH 4,5 con 1 ml de suspensión de esporas (10^9 u.f.c/ml aproximadamente) de una cepa de referencia diferente (Figura II.1). Posteriormente fueron incubadas a 25°C durante 48 h.

La intensidad de la inhibición se estimó en función del área del halo de inhibición observado alrededor de los cilindros.

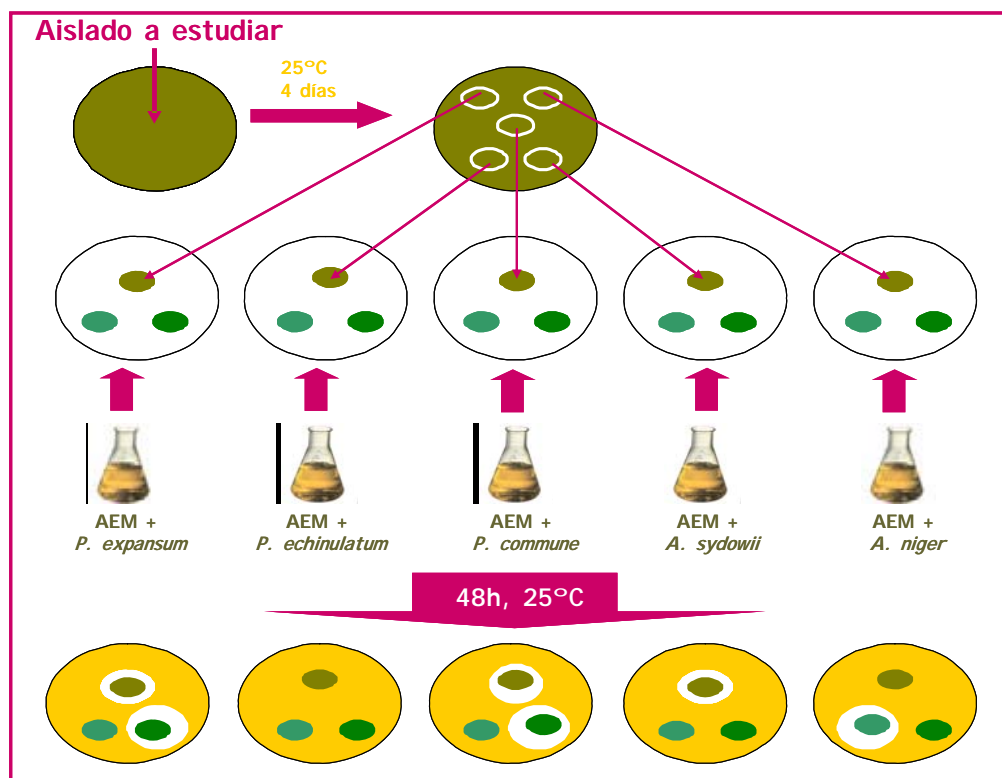


Figura II.1. Método utilizado para la determinación de la inhibición radial en medio sólido.

II.2.1.3. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS AISLADOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Los aislados que mostraron actividad en el ensayo de inhibición radial en medio sólido se sometieron a una caracterización preliminar basada en pruebas morfológicas y fisiológicas (Pitt, 1979; Pitt, 1993; Pitt y Hocking, 1997) que permitiera agruparlos en *tipos* diferentes, asegurando de este modo una selección de aislados lo más variada posible para los ensayos posteriores.

Para ello, los mohos se inocularon en agar Czapeck extracto de levadura (CYA; Pitt, 1973), agar extracto de malta 2% (AEM; Rapper y Thom, 1949) y

agar nitrato glicerol 25% (G25N; Pitt, 1973). Cada microorganismo se sembró en una placa de cada uno de los medios, excepto en agar CYA, del que se inocularon tres placas. Posteriormente, las placas se incubaron durante 7 días a 25°C, exceptuando dos de CYA que lo hicieron a 5°C y a 37°C respectivamente. A continuación, se procedió a la observación de las características tanto macroscópicas (color del micelio y de las esporas, diámetro de la colonia, color del reverso, presencia de exudado y/o de pigmentos solubles, forma y aspecto de la colonia), como microscópicas (estructura de los cuerpos fructíferos, características de las esporas o presencia de estructuras características en el micelio).

Para la clasificación de las especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium*, o penicilos terverticilados, se procedió a su inoculación en placas de agar creatina sacarosa neutro (CSN; Pitt, 1993), que se incubaron a 25°C durante 7 días. Posteriormente se procedió a la caracterización de estos mohos en función de la morfología de sus colonias y de su metabolismo, que puede provocar la acidificación o alcalinización del medio.

II.2.1.4. ENSAYOS DE INHIBICIÓN EN PLACAS MULTIPOCILLO.

Los halos observados en el ensayo de inhibición radial en medio sólido pueden deberse a compuestos de naturaleza proteica, pero también a la producción de micotoxinas u otras sustancias liposolubles, o a una simple competición por los nutrientes del medio. Para detectar y determinar la naturaleza de los compuestos responsables de la inhibición se efectuaron ensayos en placas multipocillo siguiendo el protocolo propuesto por Broekaert y col. (1990) con algunas modificaciones.

DETECCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS LIBERADOS AL MEDIO.

En primer lugar se planteó un ensayo en placas multipocillo con 90 de los aislados que produjeron inhibición radial en medio sólido. Tras 15 días de incubación en caldo extracto de malta (MEB; 2% extracto de malta, 2% glucosa y 0,1% peptona bacteriológica, ajustado a pH 4,5) a 25°C, se eliminó el micelio y el medio libre de células se sometió a una extracción con cloroformo (Figura II.2).

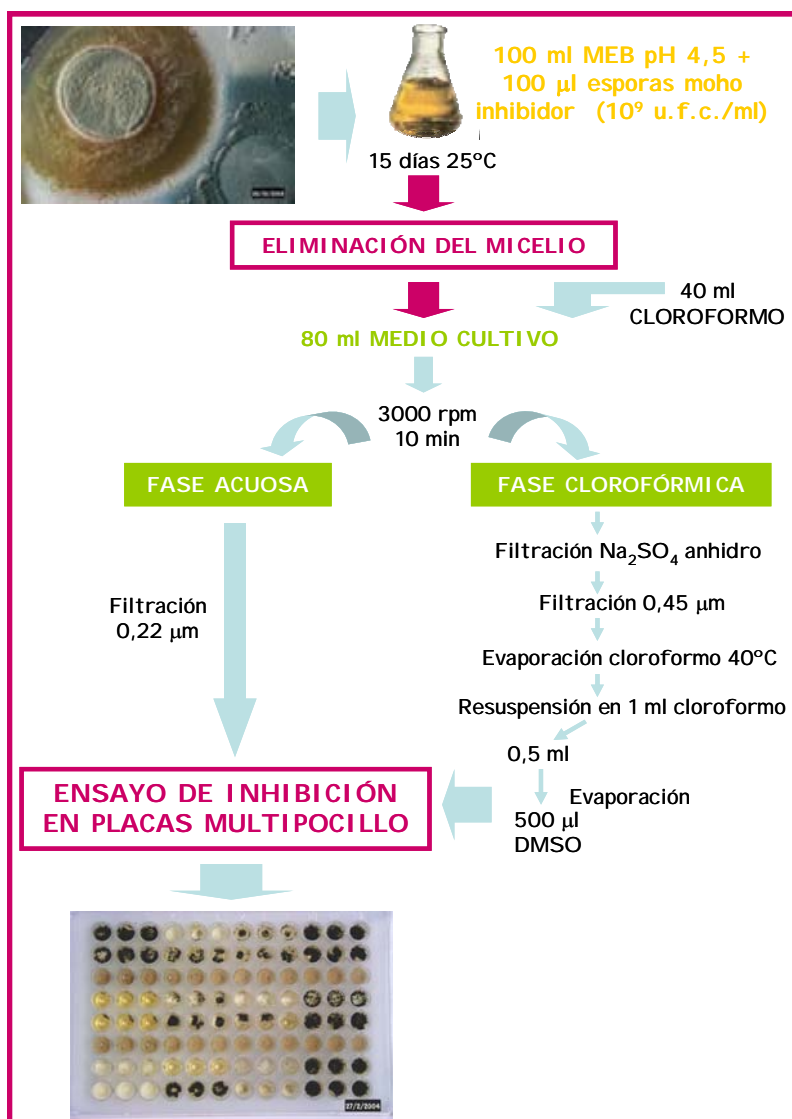


Figura II.2. Metodología seguida para la preparación de los extractos utilizados en los primeros ensayos realizados en placas multipocillo.

Posteriormente se evaluó la inhibición producida tanto por el extracto clorofórmico como por la fase acuosa frente a *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261, aislados de productos cárnicos madurados (Núñez y col., 1996b) y seleccionados por su capacidad de producción de micotoxinas (Díaz, 1999).

Para ello, se depositaron en las placas 100 µl tanto del extracto clorofórmico como de la fase acuosa por triplicado. A continuación, cada uno de los pocillos se rellenó con 100 µl de medio de cultivo. Para preparar este medio, se mezclaron 100 ml de MEB con 500 µl de una suspensión de esporas (10^9 u.f.c/ml aproximadamente) de cada microorganismo indicador por separado. Los extractos obtenidos a partir del medio de cultivo sin inocular e incubados en las mismas condiciones fueron utilizados como controles negativos de la inhibición.

Las placas fueron incubadas a 25°C durante una semana. El crecimiento de cada uno de los mohos indicadores se determinó en función de la variación de la densidad óptica a 595 nm de los pocillos registrada los días 0, 3 y 7 de incubación.

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS LIBERADOS AL MEDIO.

Posteriormente se planteó una segunda prueba muy similar a la anterior pero con algunas modificaciones. Este ensayo se llevó a cabo con 37 microorganismos: 32 de entre aquellos aislados que mostraron capacidad de inhibición radial en medio sólido, además de 2 cepas de *Penicillium nalgiovense* con actividad antifúngica: BFE66 y BFE67 (Geisen, 2000), y 3 mohos con actividad proteolítica aislados de jamón curado: *Penicillium chrysogenum* Pg131, *P. chrysogenum* Pg341 y *P. nalgiovense* Pj261 (Núñez y col., 1996b; Rodríguez y col., 1998).

En estos ensayos de inhibición en placas multipocillo se utilizaron 4 cepas de mohos como indicadores de la inhibición: *P. echinulatum* Pe321, *P. commune*

Pc332 y *A. niger* An261, que también se habían utilizado como indicadores en el ensayo de inhibición radial en medio sólido y en los primeros ensayos en placas multipocillo, incorporándose así mismo *Penicillium solitum* Ps321, igualmente aislado de productos cárnicos (Núñez y col. 1996b) y seleccionado como productor de micotoxinas (Díaz, 1999).

Cada uno de los microorganismos inhibidores se incubó a 25°C durante 15 días en 300 ml de dos caldos de cultivo diferentes: caldo extracto de malta (MEB; 2% extracto de malta, 2% glucosa y 0,1% peptona bacteriológica, ajustado a pH 4,5) y caldo de patata y dextrosa (PDB; 24 gramos por litro de caldo de patata y dextrosa ajustado a pH 4,5).

Tras el periodo de incubación se recogieron 50 ml del medio de cultivo libre de células, que se filtraron (0,22 μm) y se concentraron a vacío hasta un volumen final de 5 ml (Figura II.3). Posteriormente se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización.

El micelio y otros 100 ml del medio de cultivo se traspasaron a una bolsa de Stomacher y se homogeneizaron con 50 ml de cloroformo en un homogeneizador de paletas durante 10 min. A continuación se centrifugó durante 10 min a 3000 r.p.m. Seguidamente, se recogieron 50 ml del sobrenadante acuoso, se filtraron (0,22 μm), se concentraron a vacío hasta un volumen final de 5 ml y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización. El extracto clorofórmico se filtró a través de sodio sulfato anhidro para eliminar los restos de agua. Posteriormente, se evaporó el cloroformo del filtrado en un rotavapor a 40°C y el residuo se resuspendió en 1 ml de cloroformo, que fue filtrado (0,45 μm) y evaporado con una corriente de nitrógeno. Los extractos se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización, y se resuspendieron en 500 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) justo antes de su uso (Figura II.3).

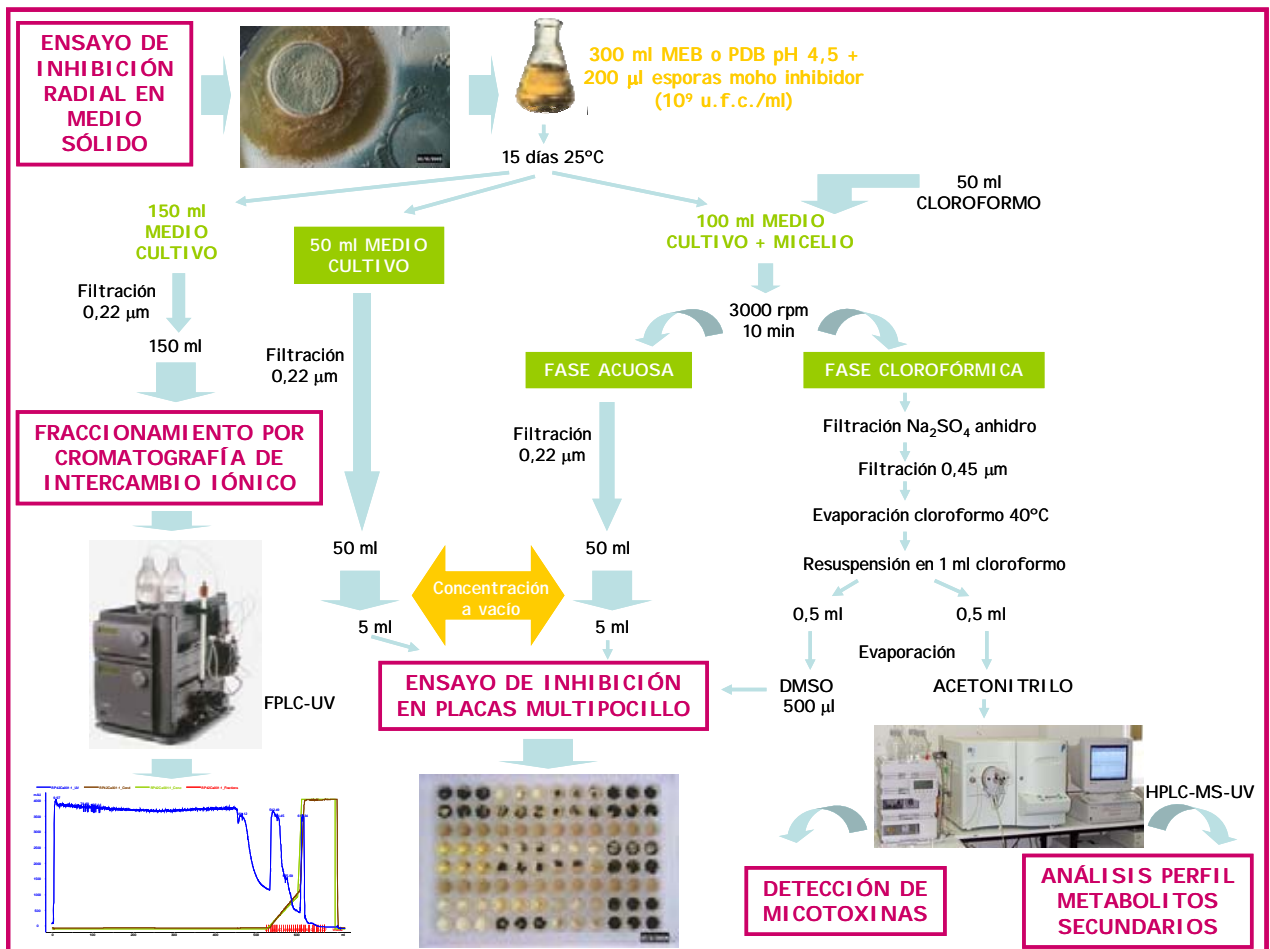


Figura II.3. Protocolo seguido para la caracterización de los compuestos responsables de la inhibición observada en medio sólido.

Para llevar a cabo el ensayo de inhibición en placas multipocillo, se depositaron 100 µl de cada uno de los tres extractos por triplicado. Posteriormente, cada uno de los pocillos se rellenó 100 µl de medio de cultivo. Para preparar este medio, se mezclaron 100 ml del medio de cultivo (MEB o PDB a pH 4,5) con 500 µl de una suspensión de esporas (10^9 u.f.c/ml aproximadamente) de cada microorganismo indicador por separado. Los extractos obtenidos a partir de los dos medios de cultivo sin inocular e incubados en las mismas condiciones fueron utilizados como controles negativos de la inhibición.

Las placas fueron incubadas a 25°C durante 96 h. El crecimiento de cada uno de los mohos indicadores se determinó en función de la variación de la densidad óptica a 595 nm de los pocillos cada 24 h durante 96 h.

II.2.1.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Los componentes de los extractos clorofórmicos, una vez separados mediante HPLC como se describe a continuación (Tabla I.1), se detectaron mediante un detector de luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. Los mohos se agruparon en función del perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios.

Por otro lado, los electroferogramas obtenidos a partir de los extractos clorofórmicos mediante electroforesis capilar micelar electrocinética como se describe a continuación, también se utilizaron para agrupar los diferentes aislados en función de su perfil de metabolitos secundarios.

II.2.1.6. DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.

El análisis de los extractos clorofórmicos obtenidos como se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS; Núñez y col., 2000) y por electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC; Martín y col., 2004).

ANÁLISIS DE MICOTOXINAS MEDIANTE HPLC-MS.

La separación, detección e identificación de micotoxinas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS) se realizó según el método descrito por Núñez y col. (2000). Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa C18 de 25 cm de longitud, 4,6

mm de diámetro y con un tamaño de partícula de 5 μm de diámetro. Como fase móvil se emplearon agua desionizada (solvente A) y acetonitrilo con 0,05% de ácido trifluoroacético (solvente B), ambos filtrados a vacío (0,22 μm). La separación se realizó a 0,8 ml/min mediante un gradiente programado según se describe en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Gradiente utilizado para la separación mediante HPLC.

TIEMPO (min)	FLUJO (ml/min)	% B*
0,0	0,8	10
0,5	0,8	10
5,0	0,8	50
25,0	0,8	70
28,0	0,8	99
33,0	0,8	99
38,0	0,8	10
40,0	0,8	10

* % B: Porcentaje del solvente B (0,05% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo).

La detección de los diferentes componentes del extracto se llevó a cabo utilizando una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI). Las condiciones de ionización de la fuente y del capilar se recogen en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Condiciones de la fuente APCI y del capilar del detector de masas.

Voltaje de descarga	5 Kv
Corriente de descarga	5 μA
Temperatura de vaporización	450°C
Flujo de gas principal	60 (unidades arbitrarias)
Flujo de gas auxiliar	20 (unidades arbitrarias)
Voltaje del capilar	0 V
Temperatura del capilar	150°C

La identificación de las micotoxinas se realizó en función del tiempo de retención y de la relación masa/carga de los compuestos detectados, en comparación con los obtenidos mediante el análisis de 18 patrones de diferentes micotoxinas (Figura II.4).

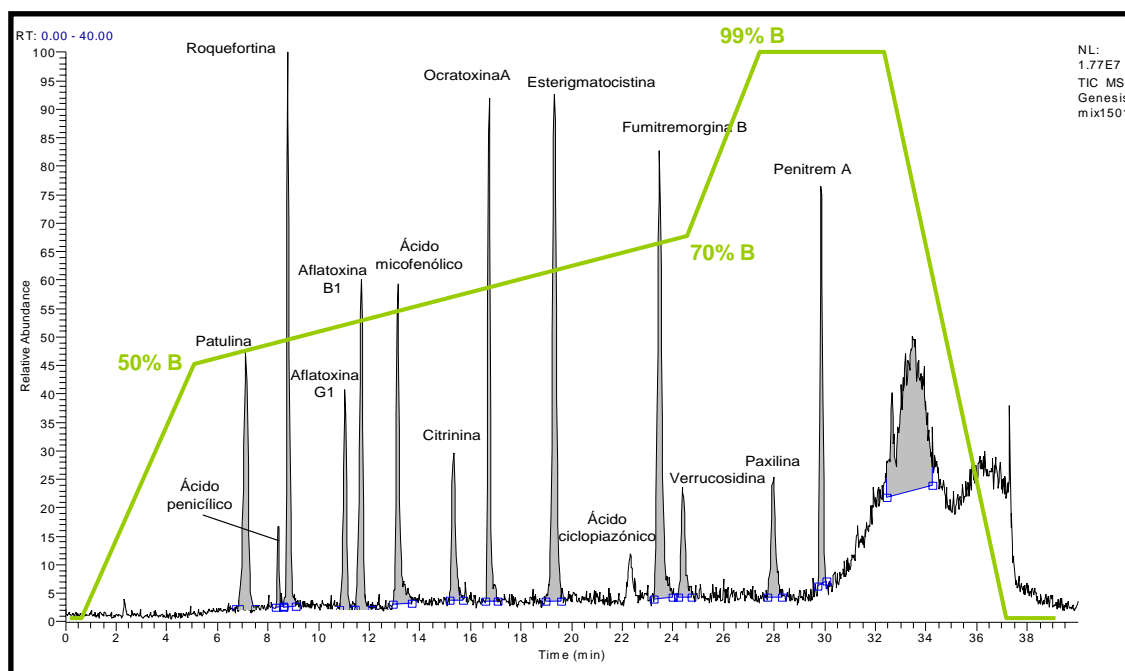


Figura II.4. Cromatograma de algunas de las micotoxinas estudiadas y evolución del porcentaje de 0,05% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo (%B) en el método cromatográfico diseñado.

ANÁLISIS DE MICOTOXINAS MEDIANTE MECC.

La detección de micotoxinas mediante electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC) se realizó según el método descrito por Martín y col. (2004). Para la separación de los distintos metabolitos se utilizó un capilar silicado de 57 cm de longitud y 75 μm de diámetro interno. El capilar se acondicionó entre análisis mediante inyección a alta presión (20 psi) de NaOH 0,1 mM (3 min) y agua desionizada (3 min), antes de la inyección del tampón de carrera constituido por tetraborato sódico 25 mM y SDS 50 mM a pH 9. El análisis se realizó a un potencial constante de 15 KV, 200 μA de corriente

máxima y temperatura de 23°C. La muestra se inyectó a baja presión (0,5 psi) durante 3 min. En estas condiciones la duración del análisis fue de 30 min.

La absorbancia se recogió a longitudes de onda de 214 y 280 nm. El detector de batería de diodos obtuvo un espectro de absorbancia entre 190 y 600 nm para cada pico.

II.2.1.7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante el estudio de los cambios originados por cada moho frente a diferentes sustratos. Para ello se utilizó un sistema patentado por BIOLOG compuesto esencialmente por un lector de placas multipocillo o Microstation, el programa informático MicroLog 3 y las bases de datos de mohos de Biolog.

Este sistema se basa en la identificación de mohos en función de la utilización de 95 fuentes de carbono y nitrógeno diferentes. Cada microorganismo incubado en idénticas condiciones metaboliza determinados sustratos produciendo un patrón para ese microorganismo. En el caso de los mohos, este sistema permite detectar tanto la utilización del oxígeno por el microorganismo como la asimilación de las diferentes fuentes de carbono o nitrógeno de manera independiente. La utilización del oxígeno produce alteraciones en el potencial redox lo que origina un cambio de color a rojo-naranja en los pocillos por la reducción de un colorante, el tetrazolio, que se detecta a 750 nm. La asimilación de nutrientes o desarrollo del moho produce una turbidez que se detecta a 490 nm. Los resultados obtenidos se comparan con los de cepas de referencia recogidos en bases de datos.

Para completar el proceso de identificación, los aislados se incuban en placas de AEM al 2% durante 7 días a 26°C para inducir la formación de esporas. Posteriormente se prepara el inóculo a una densidad de esporas determinada (75%

± 2% de transmitancia), se inocula la placa multipocillo y se incuba a 26°C durante 96 h. Las lecturas se realizan a las 48, 72 y 96 h de incubación.

II.2.2. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.

II.2.2.1. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Concretamente, 15 de los 37 microorganismos evaluados en el ensayo de inhibición en placas multipocillo se incubaron en 500 ml de MEB y PDB a pH 4,5 durante 15 días a 25°C. Tras separar el micelio y filtrar (0,45 µm) se analizaron 450 ml del medio de cultivo por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). Se utilizaron dos columnas de sefarosa de intercambio catiónico: HiTrap™ SP HP (5 ml) y HiLoad™ 26/10 SP HP (53-58 ml), de igual capacidad iónica (0,14-0,20 mmol/ml de gel). La única diferencia entre ambas radica en las dimensiones de la columna y por tanto en el volumen de muestra que se puede inyectar y en la velocidad del flujo a la que pueden someterse sin ocasionar daños en la matriz (5 y 13 ml/min respectivamente). En ambos casos, las columnas fueron preequilibradas con tampón acetato sódico 0,02 M a pH 4,5 (Tampón A). Tras la inyección de la muestra y la elución del material no adsorbido a la columna con el mismo tampón, los compuestos adsorbidos se eluyeron con un gradiente de tampón acetato sódico 0,02 M a pH 4,5, 1 M de NaCl (Tampón B). En primer lugar se incrementó el porcentaje de tampón B de 0% a 25% en 15 volúmenes de columna (VC), posteriormente se aumentó hasta el 100% en 2 VC y se mantuvo durante 15 VC. Finalmente se equilibró la columna con 10 VC de tampón A (Figura II.5).

La cromatografía se realizó a un flujo constante de 5 ml/min. Los compuestos, separados en función de su carga, se detectaron a una longitud de onda de 280 nm, y se recogieron en 28 fracciones de 5 ml. Posteriormente se

evaluó la capacidad de inhibición de cada fracción en placas multipocillo frente a *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. niger* An261 y *P. solitum* Ps321, del mismo modo descrito anteriormente.

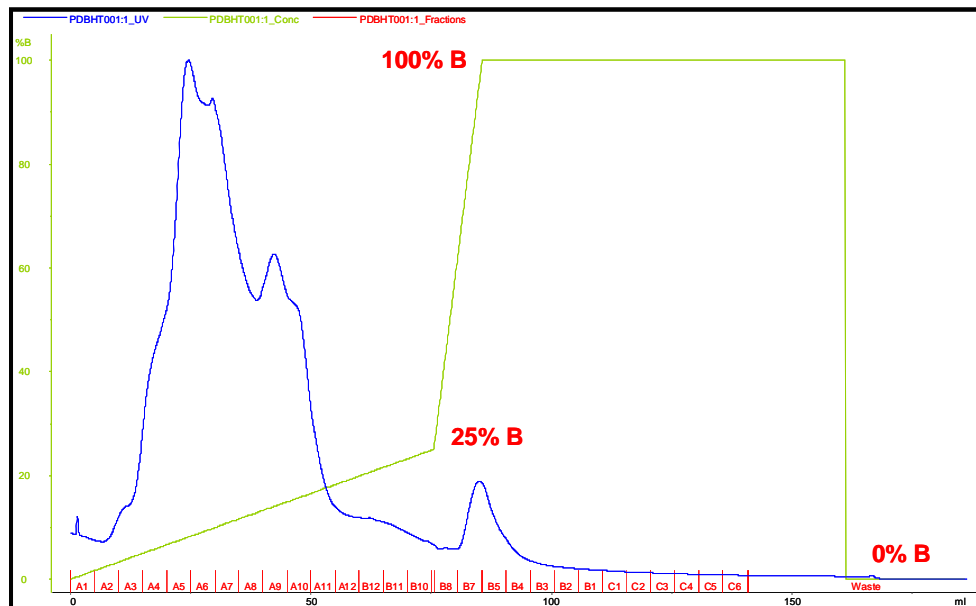


Figura II.5. Evolución del porcentaje de tampón acetato sódico 0,02 M a pH 4,5, 1 M de NaCl en el método cromatográfico diseñado. Fraccionamiento de un medio de cultivo (PDB) sin inocular incubado a 25°C durante 15 días.

II.2.2.2. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.

Las fracciones activas obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico fueron posteriormente purificadas por FPLC en columnas de filtración en gel. Se hicieron ensayos con tres columnas diferentes: Superose™ 12 10/300 GL, Superdex™ 75 HR 10/30 y HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75. Las tres columnas se diferencian fundamentalmente en los rangos óptimos de separación por tamaño y en la velocidad del flujo a la que pueden someterse sin ocasionar daños en la matriz (Tabla II.3).

Tabla II.3. Características de las columnas utilizadas para la purificación mediante cromatografía de filtración en gel.

PROPI EDADES	COLUMNAS de FILTRACI ÓN EN GEL		
	Superose™ 12 10/300 GL	Superdex™ 75 HR 10/30	HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75
Rango óptimo separación*	1 x10 ³ a 3x10 ⁵ Da	3 x10 ³ a 7x10 ⁴ Da	3 x10 ³ a 7x10 ⁴ Da
Límite de exclusión*	2x10 ⁶ Da	1x10 ⁵ Da	1x10 ⁵ Da
Volumen de la matriz	24 ml	24 ml	319-330 ml
Volumen de muestra	25 a 500 µl	25 a 250 µl	13 ml
Flujo recomendado	0,5 a 1 ml/min	0,5 a 1 ml/min	0,9-4,4 ml/min

* El rango óptimo de separación y el límite de exclusión se refiere a proteínas globulares.

Se analizaron un total de 13 fracciones obtenidas de 4 aislados distintos incubados en los dos medios de cultivo.

Se inyectaron diferentes volúmenes de cada fracción en función de la columna utilizada en cada caso. Las columnas se preequilibraron en tampón fosfato sódico 50 mM, 0,15 M de NaCl a pH 7. Posteriormente los distintos compuestos eluyeron en un gradiente isocrático del mismo tampón y se detectaron a una longitud de onda de 280 ó 214 nm. A continuación se evaluó la capacidad de inhibición frente a *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. niger* An261 y *P. solitum* Ps321 en placas multipocillo, como se ha descrito anteriormente.

II.2.2.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Las fracciones activas obtenidas por cromatografía de filtración en gel, se analizaron mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida para comprobar su estado de pureza. Se prepararon geles discontinuos (Laemmli, 1970), con una fracción de concentración al 4% de poliacrilamida y otra de separación al 12%. Para el análisis se utilizó tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%, pH 8,3. Las muestras se desnaturalizaron mediante calentamiento a 100°C durante 5 min en tampón 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8 con

20% de glicerol, 2% de SDS y 5% de 2- β -mercaptoetanol. Al tampón de tratamiento de las muestras también se le añadió azul de bromofenol al 0,025% para visualizar el avance del frente.

Las electroforesis se realizaron a 100 V durante 90 min aproximadamente. Una vez finalizado el desarrollo electroforético, los geles fueron tratados con una solución de tinción constituida por 0,25 g de azul de Comassie R-250 en una solución 1:1 de metanol-agua al 90% y ácido acético al 10% durante 15 min, transcurridos los cuales fueron desteñidos en una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%.

Para determinar el peso molecular de las diferentes fracciones se utilizó un patrón de proteínas constituido por albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de la tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14,2 kDa) y aprotinina (6,5 kDa), suministrado por la casa comercial SIGMA.

II.2.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DEL PÉPTIDO ANTIFÚNGICO.

Para estudiar las condiciones de producción del péptido antifúngico se determinó la influencia de varios factores: tiempo y temperatura de incubación, y pH y actividad de agua del medio de cultivo.

II.2.3.1. PRODUCCIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

Para determinar la cantidad de péptido producido en función del periodo de incubación, el moho productor se incubó por duplicado a 25°C en 500 ml de MEB a pH 4,5 durante 7, 15 y 21 días. El péptido producido se purificó por cromatografía de intercambio catiónico y de filtración en gel como ya se ha descrito anteriormente.

La concentración del péptido producido se estimó en función de la concentración de nitrógeno del compuesto purificado como se detallará más adelante.

II.2.3.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, pH Y ACTIVIDAD DEL AGUA.

Se estudió la influencia de diferentes factores en la producción del péptido. Los factores ecológicos estudiados fueron temperatura de incubación, pH del medio de cultivo y actividad del agua del medio de cultivo.

El moho productor se cultivó en diferentes medios con extracto de carne diseñados para lograr los siguientes valores de actividad del agua:

- a_w alta (0,99): 2,5% de extracto de carne y 0,25% de peptona bacteriológica.
- a_w media (0,96): 20% de extracto de carne, 0,25% de peptona bacteriológica y 5% de NaCl.
- a_w baja (0,90): 20% de extracto de carne, 0,25% de peptona bacteriológica, 5% de NaCl y 20% de glicerol.

El pH de los medios se ajustó con ácido láctico a los valores de 4,5, 5,5 y 6,5. Las temperaturas de incubación utilizadas fueron de 15, 20, 25 y 30°C. El tiempo de incubación se fijó en 15 días en todos los casos.

Tras el periodo de incubación se determinó el peso seco del micelio mediante desecación a 100°C.

El péptido producido se purificó por cromatografía de intercambio catiónico y de filtración en gel como ya se ha descrito anteriormente. La concentración del péptido se estimó en función de la concentración de nitrógeno de las muestras como se detalla a continuación.

II.2.3.3. CUANTIFICACIÓN DEL NITRÓGENO.

La concentración de nitrógeno del péptido purificado por cromatografía de filtración en gel se cuantificó mediante el método de Jonhson descrito por Córdoba (1990). Se fundamenta en la reacción de los compuestos nitrogenados con ioduro potásico mercúrico o reactivo de Nessler para dar, en solución alcalina, un complejo de color naranja que se mide en un espectrofotómetro a 490 nm.

Para su determinación, 100 µl del péptido purificado se desecaron en una estufa a 100°C. A continuación se añadieron 200 µl de ácido sulfúrico y se digirió a 120 °C en un baño de arena, donde se mantuvo el tiempo suficiente para que la solución fuese transparente. Posteriormente se añadieron 4,8 ml de agua destilada, 3 ml de NaOH 4 N y 2 ml de reactivo de Nessler (4 gr de KI, 4 gr de HgI₂ y 1,75 gr de goma arábiga hasta 1 litro de agua destilada). Se agitó y se dejó reaccionar durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 490 nm. Los datos obtenidos se refirieron a una recta patrón elaborada con diferentes cantidades de sulfato amónico.

II.2.4. CARACTERIZACIÓN DEL PÉPTIDO ANTIFÚNGICO.

Con el fin de obtener el péptido para su caracterización, la cepa productora se incubó en MEB a pH 4,5 durante 15 días a 25°C. Tras filtrar (0,45 µm) para obtener el medio libre de células, se fraccionó por intercambio iónico en una columna HiTrapTM SP HP de 5 ml, obteniéndose una fracción con actividad antifúngica que fue posteriormente purificada por filtración en gel en la columna HiLoadTM 26/60 SuperdexTM 75.

II.2.4.1. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA.

Para el análisis del péptido por electroforesis capilar en zona, se utilizó un capilar silanizado no recubierto de 57 cm de longitud (50 cm útiles hasta la ventana del detector) con un diámetro de 75 μm . Como tampón de carrera se utilizó tetraborato sódico 20,6 mM, fosfato disódico 8,75 mM con un 20% de acetonitrilo, también empleado para acondicionar el capilar durante 2 min. Las condiciones en las que se efectuó el análisis fueron de 5 seg de inyección a presión (0,5 psi) y un voltaje de 15 kV durante 25 min. El lavado del capilar se realizó con NaOH 100 mM (3 min) y agua (3 min).

La absorbancia se obtuvo a 214, 254 y 280 nm. El detector de batería de diodos recogió un espectro de absorbancia de 190 nm a 300 nm.

II.2.4.2. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ISOELECTROENFOQUE.

El punto isoelectrico del péptido purificado se determinó mediante electroforesis capilar de isoelectroenfoque con el kit comercial cIEF 3-10 de BECKMAN (*Isoelectrofocusing of proteins in the PI range of 3 to 10 by capillary electrophoresis*).

Para el análisis se utilizó un capilar neutro no silicado de 27 cm de longitud (20 cm útiles hasta la ventana del detector) con un diámetro interno de 50 μm .

El patrón suministrado por la casa comercial estaba constituido por una mezcla de péptido CCK (2,5 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$), β -lactoglobulina (1,5 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$), anhidrasa carbónica II (2,5 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$) y ribonucleasa A (1,5 $\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$), con puntos isoelectricos de 2,75, 5,1, 5,9 y 9,45 respectivamente.

Se utilizó una mezcla de 3,8 ml del gel comercial P/ACE™ con 380 µl de ácido fosfórico 1 M como tampón del ánodo, y NaOH 20 mM como tampón del cátodo. El lavado del capilar se realizó con ácido fosfórico 10 mM.

La muestra se preparó con 200 µl de gel cIEF, 4 µl de anfolito cIEF y péptido a una concentración de 3 µl/100µl.

El capilar se acondicionó mediante inyección a alta presión (20 psi) de ácido fosfórico 10 mM (1 min) y agua desionizada (3 min) antes de rellenarlo con la muestra (1 min). Seguidamente se aplicó un potencial de 500 V/cm (13,5 KV a los 27 cm del capilar) durante 2 min antes de movilizar la muestra a baja presión (0,5 psi) con la misma corriente. En estas condiciones la duración del análisis fue de 34 min.

La absorbancia se recogió a una longitud de onda de 280 nm.

II.2.4.3. ANÁLISIS MEDIANTE HPLC-UV.

Se realizó un análisis del péptido purificado en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,15 M a pH 7 mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de luz ultravioleta (HPLC-UV). Como fase estacionaria se empleó una columna de fase reversa C18 (150 mm x 1 mm). Las fases móviles utilizadas fueron agua desionizada y acetonitrilo. El péptido se detectó a una longitud de onda de 214 nm.

II.2.4.4. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La fracción purificada en columnas de filtración en gel se envió para su análisis a laboratorios especializados en espectrometría de masas para proteínas. Se realizaron dos tipos de análisis por espectrometría de masas:

ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF.

Para el análisis por espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz asociada a un analizador de tiempo de vuelo o MALDI-TOF, se envió el péptido purificado en tampón fosfato sódico 50 mM, 0,15 M de NaCl a pH 7 al Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC en Barcelona.

También se envió el péptido en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Comassie como ya se ha detallado anteriormente al Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid.

La muestra se deposita en una matriz con capacidad de absorción de luz ultravioleta y es irradiada con un láser. La mayor parte de la energía es absorbida por la matriz, lo que evita una fragmentación no deseada de la proteína a analizar. La molécula ionizada es acelerada en un campo eléctrico y es conducida a un analizador de tiempo de vuelo. Durante este vuelo las diferentes moléculas se separan en relación a su masa/carga alcanzando el detector a distintos tiempos. Este método puede utilizarse para la detección y caracterización de proteínas de masas comprendidas entre 400 y 350000 Da.

ANÁLISIS MEDIANTE SELDI-TOF.

Además, se realizó un envío del péptido purificado para su análisis por espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser intensificada por superficie asociada a un analizador de tiempo de vuelo o SELDI-TOF, al Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid. En este caso se envió el péptido en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Comassie como ya se ha detallado anteriormente.

Esta técnica es similar a la descrita anteriormente, aunque en este caso la matriz no sólo sirve para absorber la energía del láser, sino que también purifica, extrae o modifica la muestra. En concreto, la matriz SELDI se selecciona para un analito concreto, a diferencia de las matrices utilizadas en MALDI. El análisis se realizó con dos matrices diferentes: CHCA (α -cyano-4-hidroxy cinnamic acid) y SPA (sinapinic acid), para análisis de pequeñas proteínas o de más de 10 kDa respectivamente.

II.2.4.5. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN.

La determinación del espectro de inhibición del péptido antifúngico se llevó a cabo mediante ensayos de inhibición en placas multipocillo. Se evaluó la actividad antifúngica del péptido a diferentes concentraciones (de 60 a 0,47 $\mu\text{gN/ml}$) frente a 14 mohos de referencia (Tabla II.4).

Tabla II.4. Mohos utilizados para determinar el espectro de inhibición del péptido.

Cepas	Especie Fúngica	Esporas (ufc/ml) *	Origen/Fuente
Pe321	<i>Penicillium echinulatum</i>	6×10^8	Colección de la Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria de la UEX. (Núñez y col., 1996b)
Ps321	<i>Penicillium solitum</i>	1×10^9	
Pc332	<i>Penicillium commune</i>	1×10^9	
An261	<i>Aspergillus niger</i>	8×10^8	
Pg222	<i>Penicillium chrysogenum</i>	5×10^8	
Pj261	<i>Penicillium nalgiovense</i>	4×10^9	
Pc131	<i>Penicillium commune</i>	2×10^9	
Pp51	<i>Penicillium polonicum</i>	7×10^8	
Pr341	<i>Penicillium restrictum</i>	5×10^8	
Af2687	<i>Aspergillus flavus 2687</i>	4×10^8	
Ap2682	<i>Aspergillus parasiticus 2682</i>	6×10^7	
Av2664	<i>Aspergillus versicolor 2664</i>	7×10^8	
Pa2918	<i>Penicillium aurantiogriseum 2918</i>	1×10^9	
Pg2919	<i>Penicillium griseofulvum 2919</i>	2×10^9	

* La concentración de esporas de cada suspensión se determinó en una cámara de recuento ($0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,100 \text{ mm}$) de la marca BRAND.

II.2.4.6. ENSAYO DE INHIBICIÓN RADIAL CON EL PÉPTIDO PURIFICADO.

Los mohos de referencia utilizados fueron: *A. niger* An261, *P. chrysogenum* Pg222 y dos cepas de *P. commune* Pc332 y Pc131, todas ellas pertenecientes a la Colección de la Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria de la UEx; y *A. flavus* Af2687, *P. aurantiogriseum* Pa2918 y *A. versicolor* Av2664, de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Para realizar el ensayo de inhibición radial en medio sólido con el péptido purificado, se prepararon placas con AEM a pH 4,5 fundido en el que previamente se resuspendió por separado 1 ml de una suspensión de esporas de cada uno de los microorganismos indicadores de la inhibición (10^9 u.f.c/ml aproximadamente). Una vez gelificadas se realizaron dos pocillos en cada una de las placas que se sellaron con 500 µl de AEM a pH 4,5 fundido.

El pocillo utilizado como control se rellenó con 500 µl de tampón fosfato sódico 50 mM, 0,15 M de NaCl a pH 7. En el otro se colocaron 500 µl del péptido purificado a una concentración de 130 µgN/ml. A continuación, las placas se mantuvieron en refrigeración durante 1 h para permitir la difusión a través del agar de los compuestos contenidos en cada uno de los pocillos.

Posteriormente las placas se incubaron a 25°C durante 48 h, transcurridas las cuales se observó la aparición o no de los halos de inhibición.

II.2.4.7. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO CON DIFERENTES ENZIMAS.

Para determinar la sensibilidad del péptido al tratamiento con enzimas de diversa actividad se han utilizado: α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (150-250 unid/mg), tripsina (7,500 unid/mg), pepsina (2,500-3,500 unid/mg), lisozima (60,000 unid/mg), papaína (1.5-3.5 unid/mg), ficina (1 unid/mg) y dos proteasas

producidas por *Streptomyces griseus* (4 unid/mg) y *Aspergillus oryzae* (0,12 unid/mg), todos ellos suministrados por la casa comercial SIGMA. Los enzimas se utilizaron a una concentración final de 0,5 mg/ml. El tratamiento se aplicó a distintas concentraciones del péptido (de 25 a 1,56 $\mu\text{gN/ml}$) en tampón al pH óptimo de actuación del enzima (Tablas II.5 y II.6).

Tabla II.5. Condiciones de incubación del péptido con cada uno de los enzimas.

ENZIMAS	T ^a	pH.	TAMPÓN (T) DE RESUSPENSIÓN
Pepsina	37°C	2	T1. 0,3M de KCl 0,15M de NaCl, pH 2
Lisozima	25°C	6,2	T2. 0,3M de fosfato sódico 0,15M de NaCl, pH 6,2
Papaína	25°C	6,2	
α -amilasa de <i>A. oryzae</i>	20°C	7	T3. 0,3M de fosfato sódico 0,15M de NaCl, pH 7
Ficina	37°C	7	
Proteasa Tipo II de <i>A. oryzae</i>	37°C	7,5	T4. 0,3M de fosfato sódico 0,15M de NaCl, pH 7,5
Proteasa de <i>S. griseus</i>	37°C	7,5	
Tripsina	25°C	7,5	

Tabla II.6. Preparación de las muestras para la determinación de la sensibilidad de diferentes concentraciones de péptido al tratamiento con enzimas de diversa actividad.

VOLUMEN UTILIZADO			CONCENTRACIÓN FINAL	
PÉPTIDO (μl)	TAMPÓN SP (μl) ¹	ENZIMAS (μl) ²	PÉPTIDO ($\mu\text{gN/ml}$)	ENZIMAS ($\mu\text{gN/ml}$)
1000	0	1000	25	0,5
500	500	1000	12,5	0,5
250	750	1000	6,25	0,5
125	875	1000	3,12	0,5
62,5	937,5	1000	1,56	0,5

¹ Tampón en el que está resuspendido el péptido: 0,3M de fosfato sódico 0,15M de NaCl, pH 7.

² Cada enzima se resuspendió en un tampón distinto en función de su pH óptimo de actuación (Tabla II.5).

Además, se utilizaron dos preparaciones diferentes como controles positivos de la inhibición. Por un lado, se utilizó el péptido sin tratar con enzimas, a concentraciones de 25, 12,5, 6,25, 3,12 y 1,56 $\mu\text{gN/ml}$; y por otro, a concentración de 25 $\mu\text{gN/ml}$ mezclado por separado con los distintos tampones utilizados para resuspender los enzimas en una proporción 1:1.

Tanto los enzimas como los tampones utilizados para resuspenderlos se mezclaron por separado con el tampón SP en una proporción 1:1 para comprobar si tenían efecto sobre el crecimiento de las cepas de referencia.

Todas las preparaciones se incubaron en agitación durante 12 h a la temperatura óptima de actuación de cada enzima (Tabla II.5). Posteriormente se evaluó la pérdida de actividad del péptido mediante ensayos de inhibición en placas multipocillo frente a *P. griseofulvum* Pg2919, *P. restrictum* Pr341, *A. flavus* Af2687 y *A. niger* An261 (Figura II.6).

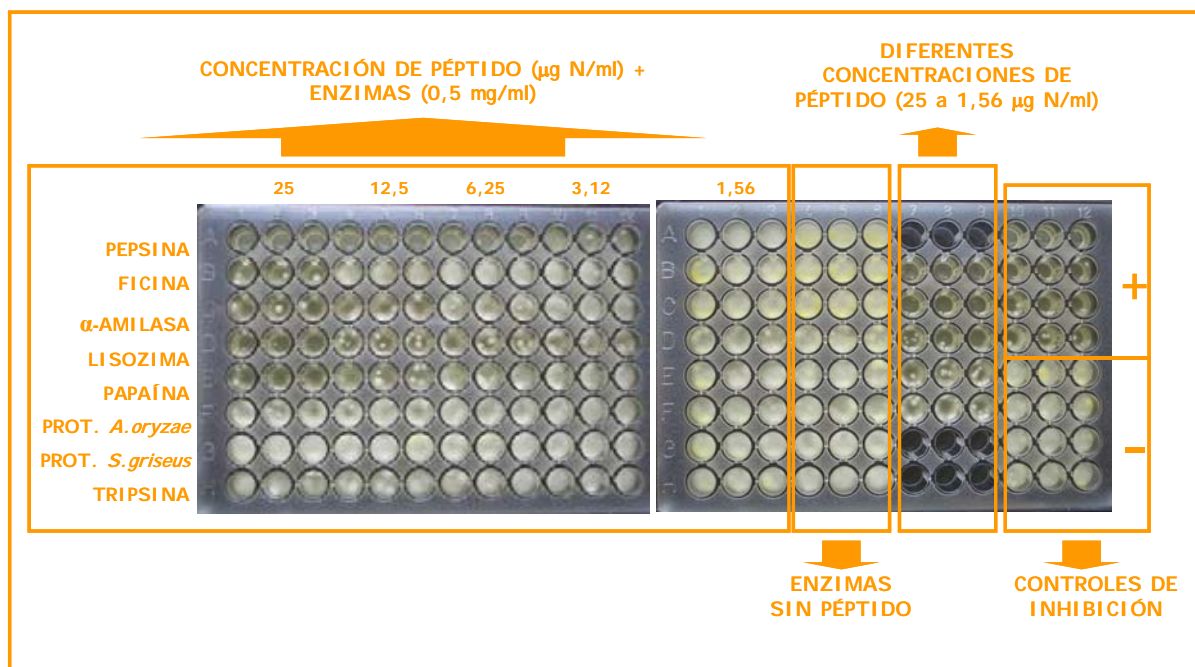


Figura II.6. Distribución de las muestras en las placas multipocillo para la evaluación de la sensibilidad del péptido al tratamiento con enzimas de diversa actividad.

II.2.4.8. DETERMINACIÓN DE GRUPOS GLICÍDICOS EN EL PÉPTIDO.

La presencia de grupos glicídicos en el péptido se determinó mediante una tinción de ácido periódico-Schiff (PAS), siguiendo el método descrito por Deepak y col. (2003). En primer lugar se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (véase apartado II.2.2.3). A continuación, el gel se mantuvo 1 h en ácido acético al 7,5% en agitación. Para oxidar los oligosacáridos, el gel se trató posteriormente con ácido periódico al 0,2% durante 45 min a 4°C. Seguidamente, el gel se lavó con agua destilada y se tiñó con reactivo de Schiff en la oscuridad durante 40 min a 4°C.

II.2.4.9. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS N-TERMINAL DEL PÉPTIDO PURIFICADO.

El péptido purificado se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) para inmovilizarlo y secuenciar su extremo N-terminal por degradación de Edman. Para ello se preparó un gel de poliacrilamida al 12% (véase apartado II.2.2.3). Posteriormente se procedió a la transferencia en semiseco en un *trans-blot* de BIORAD. El gel bañado en tampón Tris-glicina-metanol (25 Mm DE Tris, 192 mM de glicina pH 8 y 20% de metanol) se colocó sobre la membrana de PVDF activada con metanol (1 min), agua desionizada (1 min) y tampón Tris-glicina-metanol (15 min). Debajo de la membrana y sobre el gel se colocó papel Whatman empapado en tampón Tris-glicina-metanol. Se introdujo todo en el soporte del *trans-blot* y se transfirió durante 15 min a 15 V.

Para comprobar que la transferencia se había realizado con éxito, la membrana de PVDF se tiñó con 0,25 g de azul de Comassie R-250 en una solución 1:1 de metanol-agua al 90% y ácido acético al 10% durante 15 min. A continuación se destiñó en una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%. El péptido inmovilizado fue recortado y enviado a la Plataforma de Proteómica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

II.2.5. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DEL PÉPTIDO.

La técnica empleada fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN extraído del moho. Para ello se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia amino y carboxilo terminal del péptido. Tras la obtención de los fragmentos de ADN amplificados se insertaron en un vector y se realizó la transformación de las células competentes de *E. coli*. Finalmente se secuenciaron los plásmidos con insertos (Figura II.7).

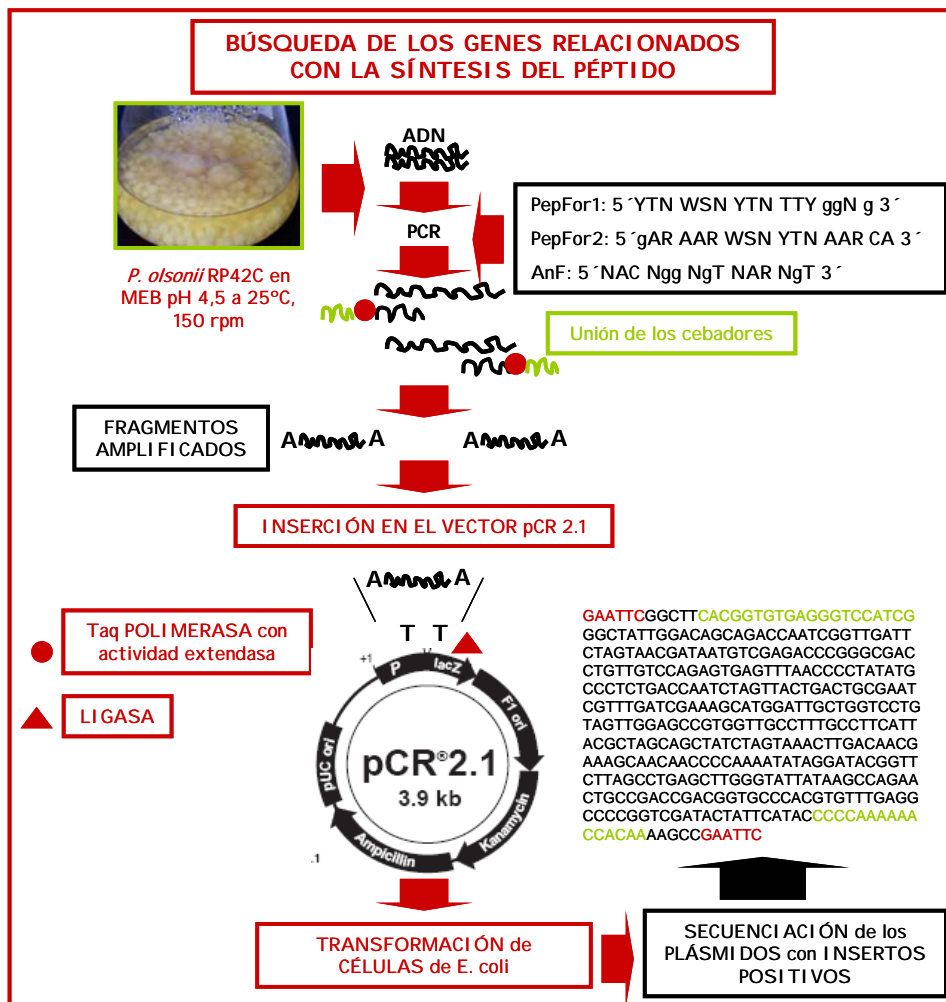


Figura II.7. Estrategia seguida para la búsqueda de la secuencia de ácidos nucleicos relacionada con la producción del péptido con actividad antifúngica.

II.2.5.1. EXTRACCIÓN DEL ADN.

La extracción del ADN se hizo a partir del micelio del microorganismo productor. Se trituraron 2 gramos de micelio congelado con nitrógeno líquido. Posteriormente se añadieron de 4 a 5 ml de tampón TES pH 8 (Tris 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,05 M), 350 µl de SDS al 20% y 200 µl de proteinasa K a una concentración de 10 µg/µl. A continuación se realizó una incubación a 60°C durante 35 min. Tras enfriar en hielo se añadió a la mezcla la misma cantidad de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:25:1). Se agitó suavemente y se realizó una centrifugación a 3000 r.p.m durante 3 min. El sobrenadante se repartió en fracciones de 500 µl, añadiéndose 200 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1,3 ml de etanol al 100% a cada una de las fracciones. Se dejó precipitar a -80°C durante 30 a 60 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 r.p.m durante 4 min y se desechó el sobrenadante. Para eliminar los restos de sales que pudieran quedar adheridos al ADN se realizó un lavado con etanol al 70% y una nueva centrifugación a 13000 r.p.m durante 2 min. A continuación se secaron las muestras y se resuspendió el sedimento en agua desionizada estéril. El ADN se trató con 50 µl de ARNasa (10 µg/µl) durante 1 h a 37°C. Finalmente se procedió a la purificación con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y a la precipitación con etanol como se ha descrito anteriormente. Para terminar, el ADN se resuspendió en agua desionizada estéril y se mantuvo a -20°C hasta el momento de su utilización.

II.2.5.2. DESARROLLO DE LA PCR.

La reacción se desarrolló en un volumen de 40 μ l, utilizando los siguientes componentes:

- 4 μ l de tampón de reacción de la Taq ADN polimerasa 10x (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1% Triton x-100, pH 8,8).
- 1 μ l de la mezcla de nucleótidos, con una concentración de 10 mM cada nucleótido.
- Volumen variable (1,2, 2, 2,4, 3 y 5 μ l) de $MgCl_2$ a una concentración de 50 mM.
- 0,6 μ l del cebador directo (Fwd) a una concentración de 100 μ M: PepFor, PepFor1 o PepFor2.
- 0,6 μ l del cebador reverso (Rev) a una concentración de 100 μ M: AnF.
- Volumen variable (1, 3 o 5 μ l) de ADN a una concentración también variable (obtenido sin diluir, 1/10, 1/50 o 1/100).
- Agua desionizada estéril hasta completar los 40 μ l de la reacción.
- 0,5 μ l de una solución de Taq ADN polimerasa (2,0 U/ μ l) de la casa comercial FINNZYMES, que corrige los errores que se van produciendo durante la amplificación.

El programa de amplificación utilizado en los diferentes ensayos se obtuvo tras realizar diversas modificaciones tanto en los tiempos como en las temperaturas de cada fase (Tabla II.7). El número de ciclos de PCR también fue variable (28 ó 30). Además, se utilizaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y de ADN. De esta manera se optimizaron las condiciones en función de los cebadores utilizados en cada caso.

Tabla II.7. Variaciones en las condiciones de amplificación para la optimización de la PCR.

FASES								
DESNATURALIZACIÓN		HIBRIDACIÓN		EXTENSIÓN		EXTENSIÓN FINAL		
T ^a (°C)	Tiempo (seg)	T ^a (°C)	Tiempo (seg)	T ^a (°C)	Tiempo (seg)	T ^a (°C)	Tiempo (min)	
94	30	33	40	65	30	55	2	
		35		70		60		65
		37						70
		40						
		45						
		50						
		55						
		56						
		57						
		60						

Se utilizaron dos grupos de cebadores diferentes. En el primer caso se empleó como cebador directo un cebador degenerado diseñado a partir de la secuencia N-terminal: Leu-Ser-Leu-Phe-Gly-Gly-Glu-Lys-Ser-Leu-Lys-His.

PepFor (36 nucleótidos): 5´(TC)T(TCAG) (TA)(CG)(TCAG) (TC)T(TCAG) TT(TC) GG(TCAG) GG(TCAG) GA(AG) AA(AG) (TA)(CG)(TCAG) (TC)T(TCAG) AA(AG) CA(TC) 3´

Como cebador reverso se utilizó un cebador degenerado diseñado a partir de la secuencia carboxilo terminal: Thr-Leu-Thr-Pro-Val.

AnF (15 nucleótidos): 5´(TCAG)AC (TCAG)GG (TCAG)GT (TCAG)A(AG) (TCAG)GT 3´

Para las reacciones de PCR que se llevaron a cabo posteriormente, se utilizaron dos cebadores degenerados directos derivados de la secuencia del cebador directo (PepFor) utilizado previamente. Como cebador reverso se utilizó el cebador degenerado AnF anteriormente descrito:

PepFor1 (16 nucleótidos): 5´(TC)T(TCAG) (TA)(CG)(TCAG) (TC)T(TCAG) TT(TC) GG(TCAG) G 3´

PepFor2 (17 nucleótidos): 5´GA(AG) AA(AG) (TA)(CG)(TCAG) (TC)T(TCAG) AA(AG) CA 3´

AnF (15 nucleótidos): 5´(TCAG)AC (TCAG)GG (TCAG)GT (TCAG)A(AG) (TCAG)GT 3´

Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 y al 2%. Como tampón de carrera se utilizó 1xTAE preparado a partir de 50xTAE (Tris base 2M, ácido acético 1M y EDTA 0,05 M). En cada pocillo se depositaron 20 µl del producto de PCR y 4 µl de solución colorante (50% de glicerol, EDTA 25 mM, 0,25% de azul de bromofenol). Las electroforesis se desarrollaron a 70 V durante 2 h aproximadamente.

Para determinar el tamaño de los productos de PCR se utilizaron dos marcadores de pesos moleculares de ADN diferentes: de 0,15 a 2,1 kb de ROCHE y de 0,5 a 10 kb de AMERSHAM BIOSCIENCES.

II.2.5.3. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

La purificación se llevó a cabo utilizando un kit de extracción de ADN de ROCHE a partir de los geles de agarosa (*High Pure PCR Product Purification Kit*). Tras la solubilización de la agarosa el ADN se retiene mediante la centrifugación a través de unas columnas. Después de varios lavados se eluye el filtrado que contiene los fragmentos de ADN purificados (Figura II.8).

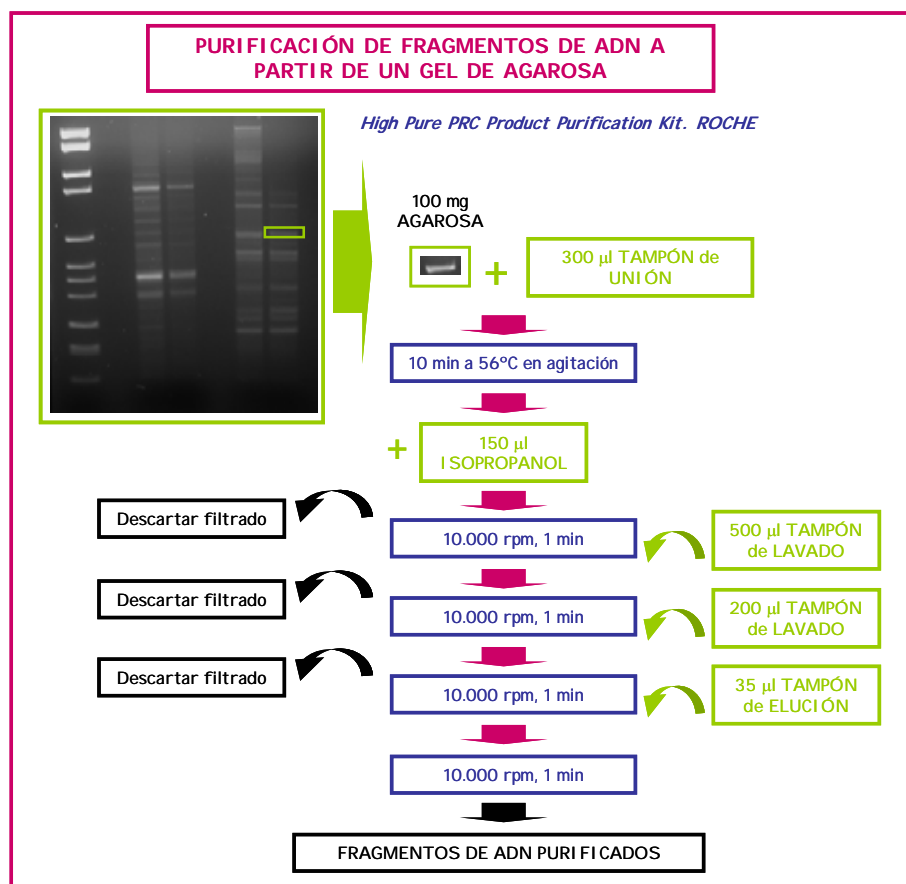


Figura II.8. Procedimiento seguido en la purificación de los fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa.

II.2.5.4. LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN EN EL VECTOR PCR 2.1.

La Taq ADN polimerasa utilizada en la amplificación de los fragmentos de ADN añade colas de adeninas en el extremo 3' de los mismos. El vector linearizado posee en su extremo 3' una cola de residuos de timinas, lo que permite una inserción eficaz de los fragmentos de ADN amplificados. Se utilizó como vector el plásmido pCR 2.1 de 3,9 kb de INVITROGEN (Figura II.9).

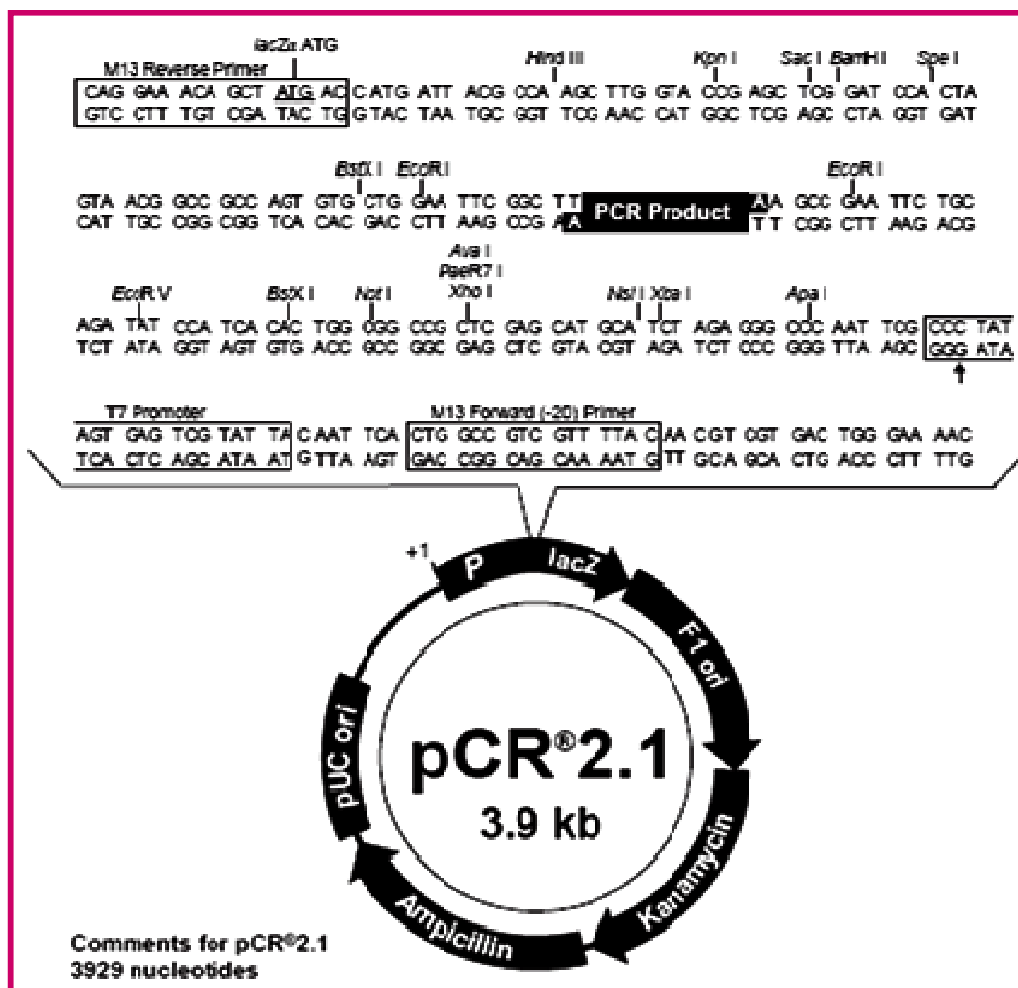


Figura II.9. Vector pCR 2.1 de INVITROGEN para la sobreexpresión de genes en *E. coli*.

Este vector se caracteriza por poseer genes de resistencia a kanamicina y ampicilina. Además posee otro gen, el gen *lacZ*, que codifica el enzima β -

galactosidasa. Su actividad se ensaya fácilmente en placa porque las colonias que expresan el enzima hidrolizan el compuesto X-gal que lleva el medio de cultivo y lo transforman en un derivado de color azul. El enzima es inactivado por la inserción del ADN extraño en un sitio de restricción situado dentro del gen. Por lo tanto, la búsqueda de colonias portadoras de insertos consiste únicamente en examinar las placas con ampicilina y X-gal, recogiendo las de color blanco, que son las colonias en las que el enzima se encuentra inactivado.

Los fragmentos de ADN cortados y purificados fueron insertados en el vector pCR 2.1. Para la reacción de ligación se utilizó un kit de ligación rápida de la casa comercial ROCHE. Se realizó durante 20 min a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes reactivos:

- 3 μ l del producto de PCR purificado + 1 μ l de vector pCR 2.1 + 1 μ l de tampón de dilución del ADN 5x.
- 5 μ l de tampón de ligación 2x.
- 0,6 μ l de T4 DNA ligasa (4 unidades/ μ l).

II.2.5.5. TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS COMPETENTES.

Una vez realizada la ligación, el vector se introdujo en células competentes DH5 α de *Escherichia coli* suministradas por INVITROGEN. Para ello se tomaron 100 μ l de estas células y se añadió la ligación (10,06 μ l aproximadamente). Se dejó en contacto 10 min en hielo para posteriormente realizar un calentamiento rápido en un baño de agua a 37°C durante 90 seg. Posteriormente se realizó un enfriamiento rápido en hielo durante 2 min. Seguidamente las células se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (LBA; 1% de bacto-peptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de NaCl, 50 μ l de ampicilina). Previamente a la siembra, se añadieron 50 μ l de X-Gal a las placas para detectar la actividad del enzima marcador. Finalmente se incubaron a 37°C durante toda la noche.

II.2.5.6. COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLÁSMIDOS CON EL INSERTO EN LAS CÉLULAS SELECCIONADAS.

Para la obtención de los plásmidos, se realizó un cultivo de las células de *E. coli* con el enzima β -galactosidasa inactivado (colonias blancas), en tubos con 10 ml de caldo LB con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C en agitación (150 r.p.m) durante toda la noche. La extracción de los plásmidos se realizó con el kit *QUIA prep Spin Miniprep (50)* de QUIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura II.10).

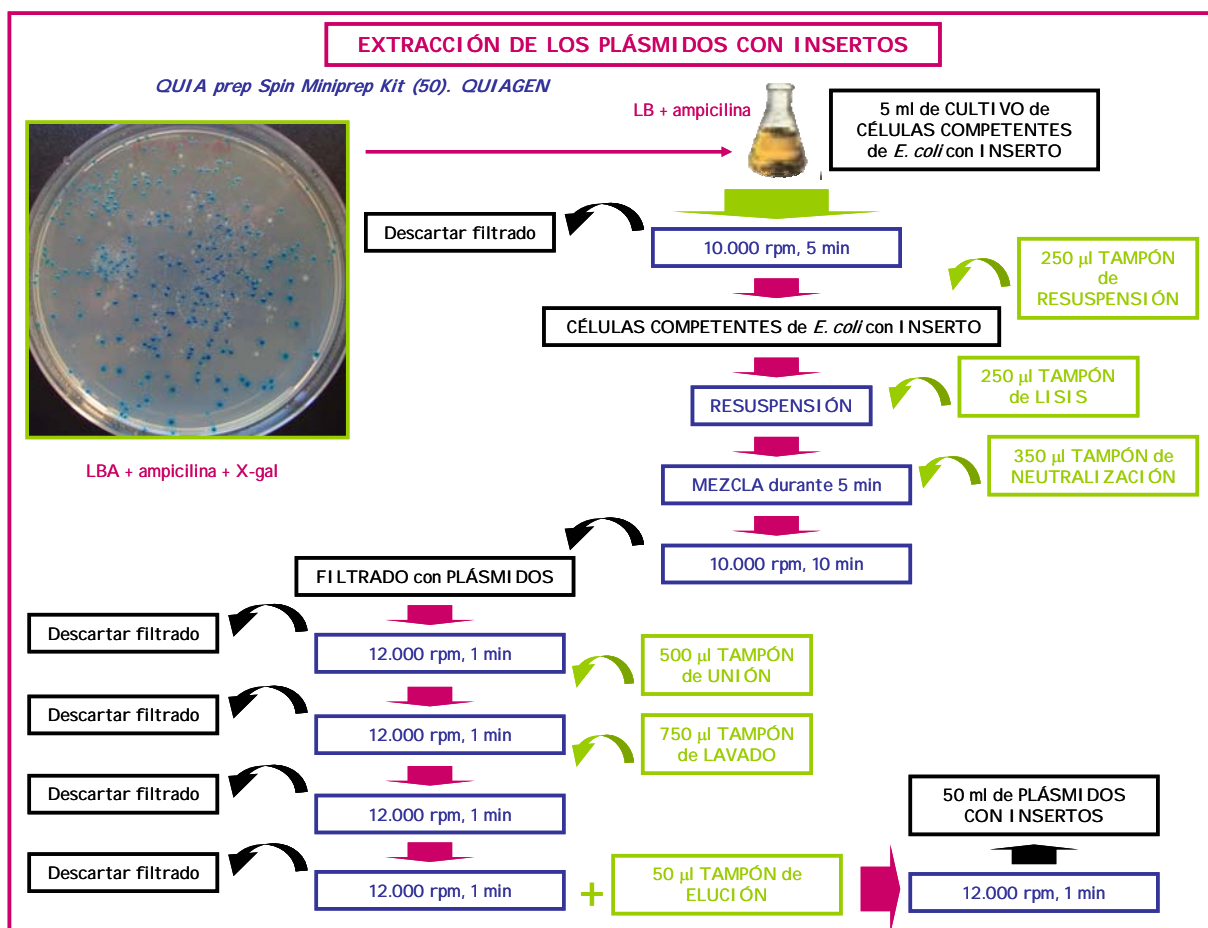


Figura II.10. Procedimiento seguido para la extracción de los plásmidos.

Finalmente se obtuvieron 50 μl de plásmido. La comprobación de los plásmidos con inserto se realizó mediante digestión con enzimas de restricción.

Para ello se utilizó el enzima EcoRI de ROCHE (10 unidades/ μ l). La digestión de comprobación se realizó durante 1 h a 37°C utilizando los siguientes reactivos:

- 1,5 μ l de tampón del enzima.
- 1,5 μ l de enzima EcoRI.
- 3 μ l del plásmido.
- 9 μ l de agua desionizada.

La comprobación tanto de la existencia de plásmidos con insertos como de la correcta digestión de los mismos se realizó en un gel de agarosa al 1% a 80 mV. El tamaño de los insertos se calculó comparando con un marcador de pesos moleculares de ADN de 0,15 a 2,1 kb de ROCHE.

II.2.5.7. SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON INSERTOS.

La secuencia de los insertos unidos al vector pCR 2.1 fue determinada en el Servicio de Secuenciación de ADN SECUGEN S.L. Las muestras fueron enviadas una vez purificados los plásmidos, a las concentraciones requeridas (100 ng/ μ l).

II.2.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medias se establecieron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) siguiendo los procedimientos de una y dos vías. En este último caso, cuando el efecto de la interacción es significativo ($p < 0,05$) se procedió a la realización de un test de comparación de medias por el método TUKEY, que determinó la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta fuese estadísticamente significativa.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS.

III.1. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

III.1.1. TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE MOHOS.

Las primeras tomas de muestra se realizaron en tres industrias ubicadas en las localidades de Mérida (Badajoz), Alcuéscar y Trujillo (Cáceres). Se utilizaron tres medios de cultivo para el aislamiento de mohos: CSN (Pitt, 1993), DG18 (Hocking y Pitt, 1980) y AEC (Núñez y col., 2000; Sosa y col., 2001). Los mohos se aislaron en función tanto de las características macroscópicas observadas en los tres medios como de la identificación a nivel de género realizada mediante la observación de los cuerpos fructíferos al microscopio. Los resultados preliminares revelaron que el medio AEC sólo permitía el desarrollo de mohos del género *Penicillium* de forma esporádica, por lo que se descartó para la obtención de aislados en tomas de muestra posteriores.

En el medio CSN se aisló una mayor proporción de mohos pertenecientes al género *Penicillium* que en las placas de agar DG18 (Tabla III.1). Los mohos desarrollados en el medio DG18 presentaron escasas diferencias macroscópicas, por lo que en muchos casos las colonias escogidas resultaron ser de la misma especie. Por el contrario, en el medio CSN se obtuvo un mayor número de mohos con aspecto macroscópico diferente, lo que unido a la capacidad de dicho medio para cambiar de color en función de la fisiología de los mohos permitió obtener entre los aislados una mayor diversidad de especies.

En las restantes tomas de muestra el único medio de cultivo utilizado para el aislamiento de mohos fue el agar CSN debido a la mayor proporción y diversidad de mohos del género *Penicillium* aislados a partir del mismo.

Se obtuvieron un total de 298 aislados a partir de las nueve industrias: 50 de la fase de postsalado, 109 de secadero y 139 de bodega.

Tabla III.1. Caracterización a nivel de género de los aislados obtenidos a partir de dos medios de cultivo diferentes en las primeras tomas de muestra.

LOCALIZACIÓN	FASE de PROCESADO	MEDIO de CULTIVO	Nº de AISLADOS	GÉNERO	
				<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus/Eurotium</i>
ALCUÉSCAR	POSTSALADO	CSN	9	7	2
		DG18	2	-	2
	SECADERO	CSN	4	4	-
		DG18	2	2	-
	BODEGA	CSN	6	4	2
		DG18	1	-	1
TRUJILLO	POSTSALADO	CSN	4	4	-
		DG18	-	-	-
	SECADERO	CSN	4	3	1
		DG18	4	2	2
	BODEGA	CSN	7	2	5
		DG18	5	5	-
MÉRIDA	POSTSALADO	CSN	3	3	-
		DG18	-	-	-
	SECADERO	CSN	5	4	1
		DG18	6	2	4
	BODEGA	CSN	5	5	-
		DG18	3	2	1

III.1.2. ENSAYO DE INHIBICIÓN RADIAL EN MEDIO SÓLIDO.

Para realizar los ensayos de inhibición radial en medio sólido se seleccionaron 281 de los 298 aislados, eligiendo en su caso un único moho de entre aquellos que habiéndose aislado de un mismo jamón presentaran idénticas características macroscópicas.

Se estudió la inhibición de los mohos de referencia *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261, todos ellos aislados de productos cárnicos madurados y seleccionados por la capacidad de producir micotoxinas (Núñez y col., 1996b; Díaz, 1999).

Más de la mitad de los mohos estudiados, concretamente 166 de los 281, inhibieron el desarrollo de alguna de las cepas utilizadas como indicadores en los ensayos realizados en medio sólido (Figura III.1, Tabla III.2).

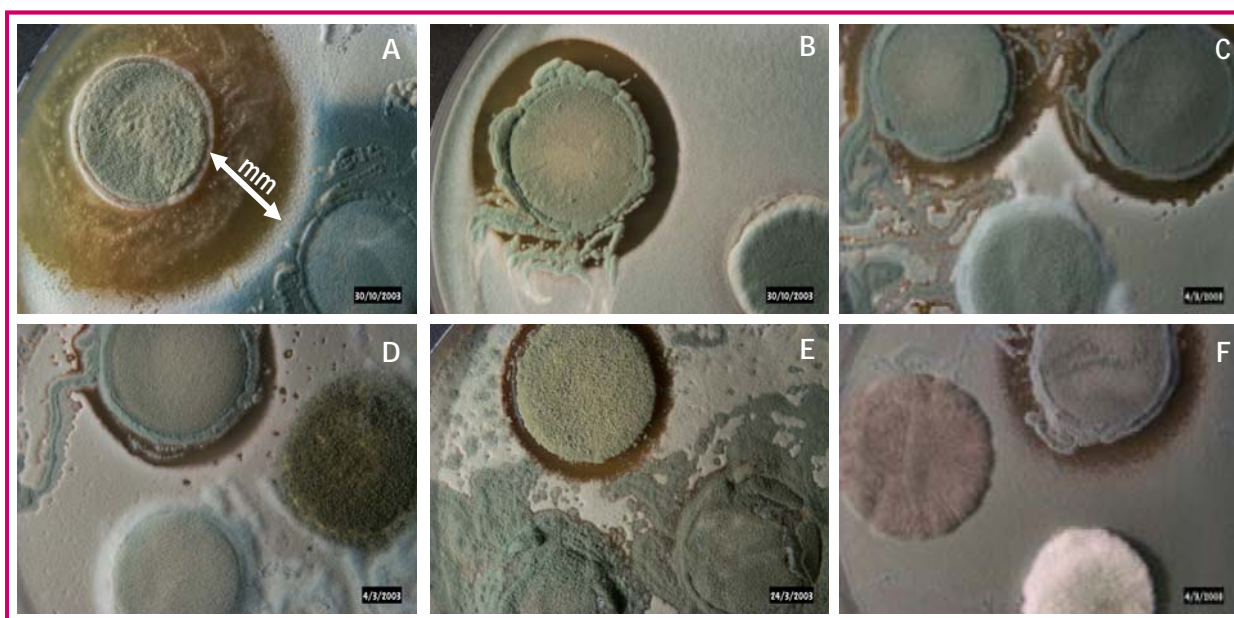


Figura III.1. Algunos ejemplos de halos de inhibición observados en el ensayo de inhibición radial en medio sólido. Inhibición producida por DBI23 (A), SNB41 (B), AMSI31 y AMSI23 (C), AMP52 (D), CP32 (E) y NB81C (F) frente a *P. echinulatum* Pe321 (A y F) y *P. commune* Pc332 (B, C, D y E). La intensidad de la inhibición se estimó en función del radio (\leftrightarrow) de la corona que constituye el halo de inhibición alrededor del cilindro de agar con el aislado inhibidor.

En general, no se aprecia una relación clara entre la fase del procesado o la industria de procedencia y el porcentaje de inhibidores aislados (Tabla III.2). Al menos el 40% de los mohos aislados en cada industria produjo inhibición en los ensayos realizados en medio sólido. El porcentaje de inhibidores más alto obtenido en una toma de muestras fue del 86%.

Aunque el número total de mohos aislados se incrementó a medida que aumentó el tiempo de procesado (49 en postsalado, 102 de secadero y 130 de bodega), el porcentaje total de mohos inhibidores se mantuvo en todos los casos en torno al 60% (Tabla III.2).

RESULTADOS

Tabla III.2. Número de aislados inhibidores obtenidos en cada industria y fase del procesado (véanse apartados II.2.1.1 y II.2.1.2).

INDUSTRIAS		FASES DEL PROCESADO ¹					TOTAL
		P	S		B		
			S.I	S.II	B.I	B.II	
I	nº aislados	3	11	-	8	-	22
	nº inhibidores	2	6	-	5	-	13
	% inhibidores	67	55		63		59
II	nº aislados	11	6	-	7	-	24
	nº inhibidores	5	3	-	3	-	11
	% inhibidores	45	50		43		46
III	nº aislados	4	8	-	12	-	24
	nº inhibidores	3	5	-	7	-	15
	% inhibidores	75	63		58		63
IV	nº aislados	5	11	15	7	6	44
	nº inhibidores	1	6	10	5	3	25
	% inhibidores	20	55	67	71	50	57
V	nº aislados	-	-	-	17	-	17
	nº inhibidores	-	-	-	7	-	7
	% inhibidores				41		41
VI	nº aislados	15	14	-	10	-	39
	nº inhibidores	9	9	-	4	-	22
	% inhibidores	60	64		40		56
VII	nº aislados	6	14	-	21	-	41
	nº inhibidores	5	12	-	13	-	30
	% inhibidores	83	86		62		73
VIII	nº aislados	-	-	-	21	17	38
	nº inhibidores	-	-	-	16	8	24
	% inhibidores				76	47	63
IX	nº aislados	5	11	12	4	-	32
	nº inhibidores	4	6	7	2	-	19
	% inhibidores	80	55	58	50		59
TOTAL	nº aislados	49	75	27	107	23	281
	nº inhibidores	29	47	17	62	11	166
	% inhibidores	59	63	63	58	48	59

¹ Fases de (P) postsalado, (S) secadero y (B) bodega.

III.1.3. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS AISLADOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Se eligieron 121 de entre los 166 aislados que produjeron inhibición radial en medio sólido en función de sus características morfológicas y fisiológicas, tratando de conseguir la mayor diversidad en cuanto a fase del procesado e industria de procedencia. En el proceso de selección se prestó especial atención a la actividad mostrada en los ensayos de inhibición radial (véanse apartados II.2.1.2 y II.2.1.3; Figura III.1).

La mayoría de los microorganismos con actividad antifúngica se agruparon en 19 especies en función de la morfología mostrada en distintos medios tanto microscópica como macroscópicamente (Pitt, 1979; Pitt, 1993; Pitt y Hocking, 1997). No obstante, algunos de los aislados sólo pudieron ser caracterizados a nivel de género. Las especies caracterizadas con mayor frecuencia fueron *Penicillium solitum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium viridicatum* y *Aspergillus penicilloides* (Figura III.2).

Algunas especies como *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. griseofulvum*, *P. aurantiogriseum* o *Penicillium olsonii*, se aislaron en todas las fases del procesado. Otras como *P. chrysogenum* o *Penicillium commune* sólo se aislaron en secadero y bodega. Los mohos de los géneros *Eurotium/Aspergillus* se aislaron fundamentalmente en las últimas fases del proceso de elaboración (Figura III.2).

El número de aislados caracterizados como *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. commune* o *P. echinulatum* fue aumentando con el tiempo de maduración. Por el contrario, otros como *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum* o *P. aurantiogriseum* se aislaron en mayor número en fase de secadero, disminuyendo posteriormente en bodega (Figura III.2).

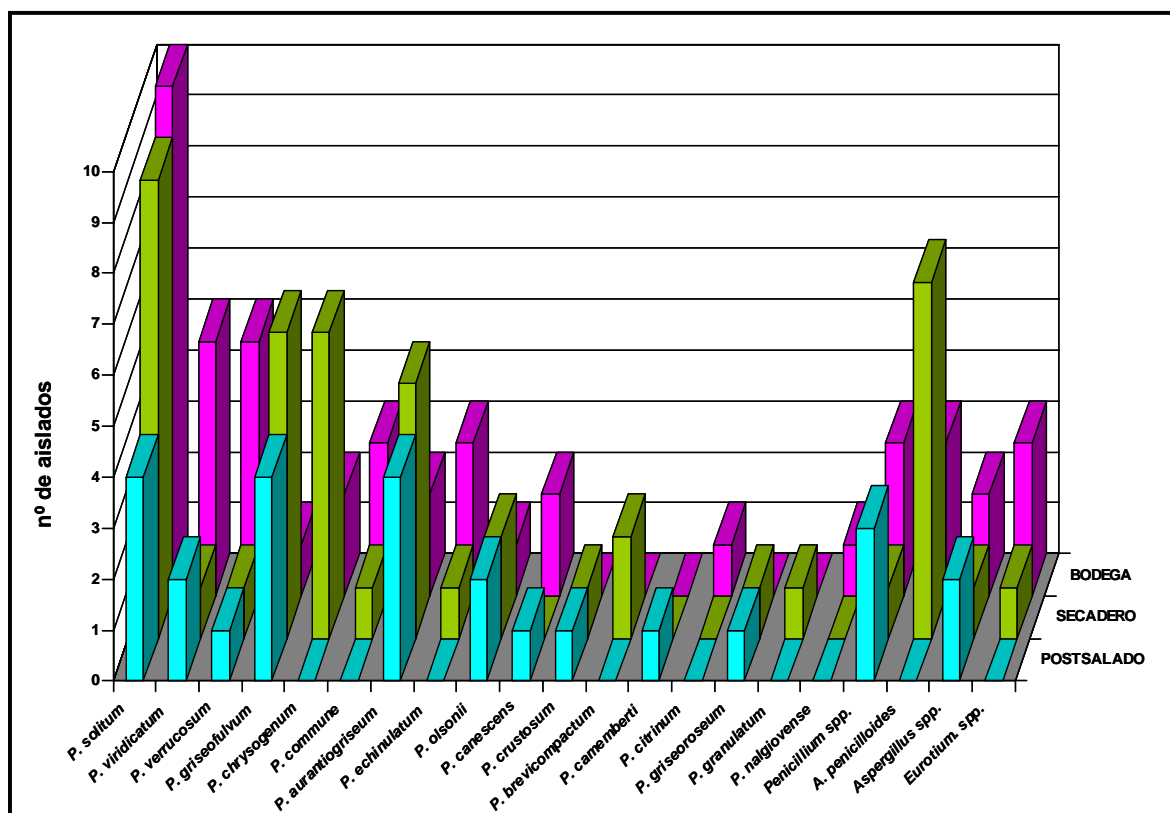


Figura III.2. Frecuencia de aislamiento de las especies de los mohos productores de inhibición radial según la fase del procesado en que se obtuvieron.

Los aislados que mostraron el espectro de inhibición más amplio fueron los caracterizados como *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. griseofulvum*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. echinulatum*, *P. olsonii* y *P. crustosum*. Por el contrario, los aislados caracterizados como *P. chrysogenum* y *Aspergillus penicilloides* resultaron activos principalmente frente a *P. expansum* y *A. sydowii*, y los caracterizados como *Penicillium verrucosum* frente a *P. expansum*, *P. commune* y *A. sydowii* (Tabla III. 3).

De las cepas utilizadas como indicadores de la inhibición, *A. niger* sólo fue inhibido por 14 aislados, mientras que *P. expansum*, *P. commune* y *A. sydowii* resultaron sensibles a la mayoría (Tabla III.3).

Tabla III.3. Espectro de inhibición radial de los 121 aislados caracterizados.

N° de AISLADOS ACTIVOS FRENTE a las CEPAS de REFERENCIA *						
AI SLADOS	N° de aislados	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. solitum</i>	23	20	22	21	19	1
<i>P. viridicatum</i>	8	8	8	7	7	2
<i>P. verrucosum</i>	7	5	1	7	6	-
<i>P. griseofulvum</i>	11	10	9	10	11	1
<i>P. chrysogenum</i>	8	5	3	3	7	-
<i>P. commune</i>	4	3	4	4	4	-
<i>P. aurantiogriseum</i>	11	6	7	10	11	2
<i>P. echinulatum</i>	4	3	2	3	4	1
<i>P. olsonii</i>	5	3	2	3	5	1
<i>P. canescens</i>	3	3	1	3	3	-
<i>P. crustosum</i>	2	2	2	2	2	1
<i>P. brevicompactum</i>	2	1	1	2	2	-
<i>P. camemberti</i>	1	1	-	1	-	-
<i>P. citrinum</i>	1	1	-	1	1	-
<i>P. griseoroseum</i>	2	2	1	-	2	-
<i>P. granulatum</i>	1	-	-	-	1	-
<i>P. nalgiovense</i>	1	-	1	-	1	-
<i>Penicillium spp.</i>	7	7	5	6	7	4
<i>A. penicilloides</i>	10	7	2	2	10	-
<i>Aspergillus spp.</i>	5	4	2	4	5	1
<i>Eurotium spp.</i>	4	1	1	3	4	-
TOTAL	121	92	74	92	105	14

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

III.1.4. ENSAYOS DE INHIBICIÓN EN PLACAS MULTIPOCILLO.

Se plantearon dos ensayos diferentes para la detección y caracterización de los compuestos solubles con actividad antifúngica.

DETECCIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS LIBERADOS AL MEDIO.

El ensayo planteado en primer lugar se llevó a cabo con 90 de entre los 121 aislados caracterizados que mostraron actividad en las pruebas de inhibición radial en medio sólido. Se seleccionaron tratando de obtener la mayor diversidad posible en función de la procedencia (industria y fase del procesado), de la caracterización preliminar realizada, y sobre todo englobando los diferentes tipos de actividad observados en los ensayos de inhibición radial en medio sólido.

Cada aislado se incubó en caldo extracto de malta (MEB) durante 15 días a 25°C. Tras la eliminación del micelio, el medio libre de células se sometió a una extracción con cloroformo (véase Figura II.2). A continuación se evaluó la inhibición producida tanto por el extracto clorofórmico como por la fase acuosa resultante frente a las siguientes cepas toxigénicas de referencia: *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

En la Tabla III.4 se recoge la inhibición de cada cepa de referencia incubada durante 7 días con la fase acuosa y el extracto clorofórmico obtenidos a partir de los 90 mohos seleccionados.

Tabla III.4. Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261	
<i>P. olsonii</i>						
RP42C	A	+++ ^a	-	+	+++	+
	C	- ^b	-	-	-	-
AMB62	A	+	-	+	-	+
	C	+++	+++	+++	-	-
RS12D	A	+	-	+++	-	+
	C	-	-	-	-	-
RS52C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	+++
SNP43	A	-	-	+	-	+
	C	-	-	+	+	-
<i>P. griseofulvum</i>						
AMP52	A	-	-	+	-	-
	C	++	-	+++	-	-
AMSI 11A	A	+	-	+	-	-
	C	+	-	+++	-	-
AMSI 33	A	-	-	+	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
AMSI 131	A	+	-	-	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
NS32C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
RB52D	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
SNP23	A	+	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
SNS33	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
<i>P. brevicompactum</i>						
AMSI 51A	A	+	-	-	-	-
	C	+++	+++	-	-	-
CSI 125	A	-	++	-	-	-
	C	-	-	+	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.4 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261	
<i>P. solitum</i>						
AMSI 23	A	- ^b	-	+	-	-
	C	+++ ^a	+++	+++	-	-
AMSI 31	A	-	-	+	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
CSI 52	A	-	+	-	-	-
	C	+	-	+	-	-
CSI I 21	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
CBI 21	A	-	++	-	-	-
	C	-	-	+	+	-
DBI 15	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	+++	-
FMP31	A	+	++	-	-	-
	C	+	+	+++	-	-
FMS16	A	-	+++	-	-	-
	C	-	-	++	-	-
FMS17	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	+	-
FMS36	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
RB11C	A	+++	-	+	-	-
	C	+++	+++	+++	+	-
SNP52	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
<i>P. jensenii</i>						
RB57C	A	+	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
<i>P. griseoroseum</i>						
AP42C	A	+	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	+++
AMSI I 22B	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.4 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261	
<i>P. camemberti</i>						
AMP61	A	+++ ^a	-	+	-	+
	C	- ^b	-	-	-	-
<i>P. aurantiogriseum</i>						
AB52C	A	-	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	+++
CBI154	A	-	+++	-	-	-
	C	+	+	+	-	-
FMP14	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	+	-
FMS35	A	-	+++	+	-	-
	C	-	+	+	+++	-
NP51C	A	++	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	+++
SNS11	A	+	++	+	-	-
	C	-	-	+	-	-
<i>P. canescens</i>						
NP11C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NB51D	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
NB52D	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
<i>P. crustosum</i>						
AMP51	A	+	-	-	+	-
	C	-	-	+	-	-
<i>Eupenicillium spp.</i>						
DBI21	A	-	++	-	-	-
	C	-	-	+	+++	-
AP52C	A	-	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	+++
RP22C	A	+	-	+	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.4 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *				
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. chrysogenum</i>					
AS21C	A	- ^b	-	-	-
	C	-	-	-	-
AS51D	A	+++ ^a	+	+	+++
	C	-	-	-	-
AMSI 11B	A	+++	-	-	-
	C	-	-	-	-
AMSI 121B	A	+	-	+	-
	C	-	-	-	-
AMSI 161	A	-	-	-	+++
	C	-	-	-	-
AMB11	A	++	-	+	+++
	C	-	-	-	-
RS54C	A	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
RB41C	A	+++	-	+++	+++
	C	-	-	-	-
<i>P. viridicatum</i>					
DBI 23	A	+++	+	+	+++
	C	-	-	-	-
NP22C	A	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
NB21D	A	-	-	-	-
	C	-	-	-	-
<i>P. echinulatum</i>					
CSI 132	A	-	-	+	-
	C	-	-	+	-
DBI 14	A	+++	-	+++	-
	C	+++	+++	+++	-
FMB11	A	-	+	-	+
	C	-	+	+	-
PNB25	A	-	++	+	-
	C	-	-	+	+++

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.4 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *				
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. verrucosum</i>					
AP43C	A	- ^b	-	-	+
	C	-	-	+	-
DBI 16	A	-	+	-	+
	C	-	-	+	-
ABI 1C	A	+	-	+	+
	C	-	-	-	-
DBI 22	A	+++ ^a	+++	++	-
	C	+	-	+	-
DBI 52	A	-	-	+	++
	C	-	-	+	-
NS41D	A	-	-	-	+
	C	-	-	+	-
<i>P. puberulum</i>					
DBI 13	A	-	-	+	-
	C	+	+++	+++	-
<i>P. granulatum</i>					
FMS52	A	++	+	-	-
	C	+	-	+	-
<i>P. citrinum</i>					
DBI 16	A	+	-	+	-
	C	-	-	-	-
<i>Penicillium spp.</i>					
AMSI 123A	A	+	-	+	++
	C	+	-	-	-
CBI 23	A	-	+	-	-
	C	-	-	+	-
CBI 159	A	-	-	-	-
	C	-	-	+	+
FMS21	A	+	+	-	-
	C	-	-	+	-
SNB41	A	++	+	+	++
	C	+	+	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.4 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) obtenidos de los aislados seleccionados cultivados en MEB.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261	
<i>A. penicilloides</i>						
AB21D	A	- ^b	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
AMSI I 21A	A	+ ^a	-	+	-	-
	C	-	-	-	-	-
AMSI I 22A	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
AMSI I 23B	A	+	-	+	-	-
	C	-	-	+	-	-
FMS22	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NS21D	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NS33D	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NB32C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
RS31D	A	+	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
RB51D	A	-	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	+	+
<i>Aspergillus spp.</i>						
AP51C	A	+	-	-	-	-
	C	-	+++	+	-	-
NS13C	A	-	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	-
<i>Eurotium spp.</i>						
AP22C	A	+	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NB81C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
NB23C	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
RS41C	A	-	-	-	-	-
	C	-	+	+++	-	+++
NB42C	A	-	-	-	-	-
	C	-	+++	+++	-	+++

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Los resultados obtenidos revelaron que 16 de los 90 aislados seleccionados únicamente mostraban actividad en la fase acuosa, y por lo tanto son susceptibles de originar una actividad debida a péptidos, mientras que la mayoría también resultaron activos al incubar con el extracto clorofórmico (Tabla III.4).

La mayoría de los mohos caracterizados como *P. chrysogenum* únicamente inhibieron al incubar con la fase acuosa, entre los que destacaron AS51D, AMB11 y RB41C, que resultaron activos frente a más de tres cepas de referencia. Los aislados *Penicillium camemberti* AMP61, *P. verrucosum* AB11C y *P. viridicatum* DBI23 mostraron una actividad similar (Tabla III.4).

Los extractos clorofórmicos de tres de los cinco aislados de *P. olsonii* inhibieron el desarrollo de alguna cepa de referencia. Sin embargo, a partir de los otros dos únicamente se obtuvieron fases acuosas activas, siendo *P. olsonii* RP42C el que mostró mayor espectro de inhibición (Tabla III.4).

A partir de los aislados que ofrecieron un amplio espectro de actividad en los ensayos de inhibición radial, caracterizados como *P. echinulatum*, *P. solitum*, *P. griseofulvum* y *P. aurantiogriseum*, se obtuvieron extractos clorofórmicos activos frente a alguna cepa de referencia o no se obtuvo actividad en la fase acuosa (Tabla III.4).

Por otro lado, en el caso de 15 de los 90 aislados seleccionados no se reprodujo en las placas multipocillo la inhibición radial observada en medio sólido. Esto puede estar relacionado con la eliminación del micelio previa a la extracción con cloroformo o con una menor concentración de los compuestos activos. Para dilucidar estos aspectos se diseñó el siguiente ensayo.

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS LIBERADOS AL MEDIO.

Los ensayos de inhibición en placas multipocillo que se realizaron posteriormente se llevaron a cabo con 37 mohos. Se seleccionaron los 7 aislados que mostraron mayor actividad al incubar con la fase acuosa en los ensayos preliminares en placas multipocillo. Además se incorporaron 25 de los 31 aislados caracterizados que mostraron actividad en las pruebas de inhibición radial y que no habían sido seleccionados anteriormente. Estos ensayos también se efectuaron con dos cepas de *P. nalgiovense* con actividad antifúngica: BFE66 y BFE67 (Geisen, 2000), y con tres mohos no toxigénicos con actividad proteolítica: *P. chrysogenum* Pg131, *P. chrysogenum* Pg341 y *P. nalgiovense* Pj261 (Núñez y col., 1996b; Rodríguez y col., 1998).

Los mohos seleccionados se incubaron en los medios de cultivo caldo extracto de malta (MEB) y caldo de patata y dextrosa (PDB) durante 15 días. Para los ensayos de inhibición en placas multipocillo se utilizaron tres fracciones: 1) el medio de cultivo filtrado tras crecer los aislados seleccionados 2) el extracto clorofórmico de dicho medio y 3) la fase acuosa obtenida tras extraer con cloroformo (véase apartado II.2.1.4; Figura II.3). Se utilizaron 4 cepas de mohos como indicadores de la inhibición. Tres de ellas (*P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261) también se habían utilizado como indicadores en el ensayo de inhibición radial en medio sólido y en los primeros ensayos en placas multipocillo. *A. sydowii* As161 y *P. expansum* Px121 se sustituyeron debido a la poca capacidad de discriminación mostrada en los ensayos realizados en medio sólido, y cuya eficacia era similar a la de *P. commune* Pc332 (Tabla III.3). Se incorporó *P. solitum* Ps321, que como los anteriores había sido aislado de productos cárnicos madurados (Núñez y col., 1996b) y seleccionado por su capacidad de producción de micotoxinas (Díaz, 1999).

En la Tabla III.5 se detalla la actividad de los 37 mohos seleccionados utilizando el medio de cultivo filtrado, el extracto clorofórmico y la fase acuosa

restante obtenidos de los medios de cultivo MEB y PDB. Los resultados que se exponen corresponden a las 96 h de incubación.

Algunos aislados mostraron un tipo de inhibición que reúne las características deseables: el medio de cultivo y la fase acuosa produjeron un retraso significativo del crecimiento de prácticamente todas las cepas de referencia no apreciándose la inhibición con los extractos clorofórmicos. De algunos de estos aislados como DBI23, AMP61, RP42C o RB41C, resultaban activas las fracciones obtenidas de cualquiera de los dos medios (Tipo P), mientras que de otros como AS51D o AMB11 sólo mostraban actividad las fracciones obtenidas a partir de MEB (Tipo P-PDB), y de AB11C las obtenidas al cultivarse en PDB (Tipo P-MEB; Tabla III.5).

Adicionalmente se obtuvieron fracciones activas con las características deseables de otros aislados a partir de ambos medios de cultivo, pero no mostraban actividad frente a *A. niger* (Tipo P-nig).

Sin embargo, la mayoría de los aislados no cumplían los requisitos necesarios, ya que al utilizar el medio de cultivo filtrado produjeron un retraso significativo del crecimiento de las cepas de referencia, pero la fase acuosa no resultaba activa. En estos aislados el extracto clorofórmico no reproducía toda la actividad observada con el medio de cultivo sin tratar (Tipo SC), como por ejemplo CSII42 o CP32. De los que mostraron este patrón, algunos originaron en el medio PDB fases acuosas muy activas frente a *P. commune* (Tipo SC+A), como CBI25, CSI44 o FMP21 (Tabla III.5).

Finalmente, algunos aislados como BFE66, BFE67 o Pg131, resultaron poco activos (Tipo F), y fundamentalmente produjeron inhibición al incubar con el medio de cultivo filtrado. Otros como DBII14, CBI52 y FMP13, apenas inhibieron el desarrollo de las cepas de referencia (Tipo N), independientemente de la fracción utilizada (Tabla III.5).

Tabla III.5. Inhibición de las cepas de referencia originada por el medio de cultivo (M), la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) de los aislados seleccionados cultivados en MEB y PDB.

CEPA	FRACCIÓN	<i>P. solitum</i> Ps321		<i>P. echinulatum</i> Pe321		<i>P. commune</i> Pc332		<i>A. niger</i> An261		TIPO ¹
		MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	
DBI 23	M	+++ ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	P
	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	C	- ^b	-	-	-	-	-	-	-	
AS51D	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	P-PDB
	A	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
AB11C	M	+++	+++	++	+++	-	+++	-	+++	P-MEB
	A	-	+++	-	++	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMB11	M	+++	-	+++	+++	+++	+	+++	-	P-PDB
	A	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
AMP61	M	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	P
	A	+++	-	+++	+	+++	+++	+++	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
RP42C	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	P
	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
RB41C	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	P
	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
BFE66	M	+++	+++	+	+++	-	+	-	++	F
	A	+++	-	+++	-	++	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
BFE67	M	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	F
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	

¹ tipo de inhibición mostrada en placas multipocillo (véase el texto).

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.5 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por el medio de cultivo (M), la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) de los aislados seleccionados cultivados en MEB y PDB.

CEPA	FRACCIÓN	<i>P. solitum</i> Ps321		<i>P. echinulatum</i> Pe321		<i>P. commune</i> Pc332		<i>A. niger</i> An261		TIPO ¹
		MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	
		Pg131	M	+ ^a	+++	-	+++	-	+++	
A	- ^b	-	-	-	-	-	-	-		
C	-	-	+	-	-	-	-	-		
CSII 42	M	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	++	SC
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pg341	M	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	SC
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
CP32	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	SC
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	+	-	-	-	-	
CBI 25	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	SC+A
	A	-	++	+	-	-	+++	-	-	
	C	-	-	-	+	-	-	-	-	
CSI 44	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	SC+A
	A	-	-	-	-	-	+++	-	-	
	C	-	-	+	-	-	-	-	-	
CSI 54	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	SC+A
	A	-	-	-	-	-	+++	-	-	
	C	-	-	-	++	-	-	-	-	
CSII 16	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	P-nig
	A	+++	++	++	+	-	+++	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSII 33	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	SC+A
	A	+++	-	-	-	-	+++	-	-	
	C	-	-	-	++	-	-	-	-	

¹ tipo de inhibición mostrada en placas multipocillo (véase el texto).

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.5 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por el medio de cultivo (M), la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) de los aislados seleccionados cultivados en MEB y PDB.

CEPA	FRACCIÓN	<i>P. solitum</i> Ps321		<i>P. echinulatum</i> Pe321		<i>P. commune</i> Pc332		<i>A. niger</i> An261		TIPO ¹
		MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	
		CS1152	M	+++ ^a	+++	-	++	+++	+++	
	A	+	-	-	-	+++	-	-	-	SC
	C	- ^b	-	-	-	-	+++	-	+	
DBI32	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
	A	-	-	-	-	-	+++	-	-	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	-	
CBI42	M	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	
	A	-	-	-	-	-	++	-	-	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	+	
CBI52	M	++	-	++	-	-	-	-	-	
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	N
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	
DBI41	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	
	A	-	-	-	-	-	+++	-	-	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	-	
CBI157	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
	A	-	+	-	++	-	+++	-	-	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	-	
DBI11	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	
	A	-	+	-	-	-	+++	-	-	SC+A
	C	-	-	+	-	++	+++	-	-	
DBI12	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
	A	-	-	-	-	-	+++	-	-	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	+	
DBI17	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
	A	-	-	-	-	-	+	-	+	SC+A
	C	-	-	-	-	-	+++	-	+	

¹ tipo de inhibición mostrada en placas multipocillo (véase el texto).

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla III.5 (continuación). Inhibición de las cepas de referencia originada por el medio de cultivo (M), la fase acuosa (A) y el extracto clorofórmico (C) de los aislados seleccionados cultivados en MEB y PDB.

CEPA	FRACCIÓN	<i>P. solitum</i> Ps321		<i>P. echinulatum</i> Pe321		<i>P. commune</i> Pc332		<i>A. niger</i> An261		TIPO ¹
		MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	MEB	PDB	
		DBI 44	M	+++ ^a	+++	+++	+++	+++	+++	
A	- ^b	-	-	-	+	-	+	-		
C	+	++	+++	+++	-	-	-	-		
FMP13	M	+	+	+++	-	+++	-	-	-	N
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DBI I 12	M	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	F
A	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	
DBI I 14	M	++	-	+++	-	++	-	++	-	N
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	
FMP21	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	SC+A
A	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	
C	-	-	++	+++	+++	-	++	-	++	
DBI I 22	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	P-nig
A	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	
C	-	++	+++	++	-	-	-	-	++	
DBI I 23	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	P-nig
A	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	
C	-	+	+++	++	-	-	-	-	+	
DBI I 41	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	P-nig
A	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	
C	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	
DBI I 42	M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	P-nig
A	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	-	
C	-	-	+++	+	-	+	-	-	+	
Pj261	M	+	-	+++	+	-	-	-	-	F
A	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

¹ tipo de inhibición mostrada en placas multipocillo (véase el texto).

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

III.1.5. DETECCIÓN DE MICOTOXINAS.

Los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de los 37 mohos seleccionados incubados tanto en MEB como en PDB, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS; Núñez y col., 2000) y por electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC; Martín y col., 2004).

ANÁLISIS DE MICOTOXINAS MEDIANTE HPLC-MS.

El método cromatográfico diseñado permitió separar, detectar e identificar 18 micotoxinas diferentes (Figura III.3).

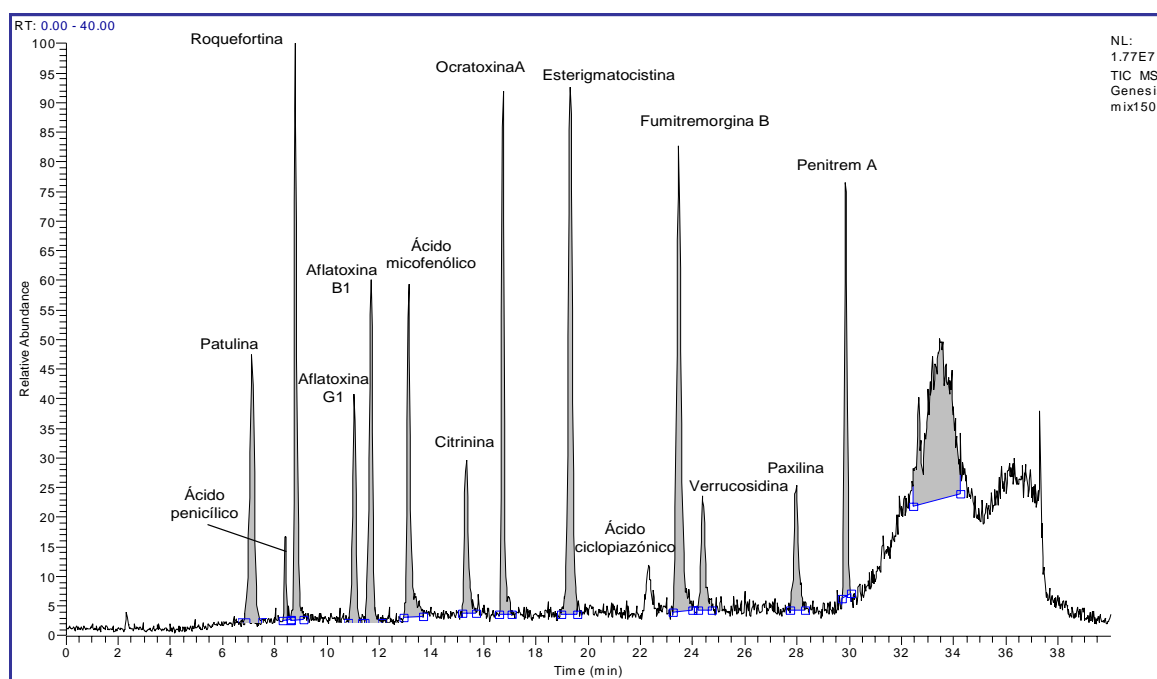


Figura III.3. Cromatograma mostrando 14 de las 18 micotoxinas analizadas mediante HPLC-MS.

Las micotoxinas se identificaron en función del tiempo de retención y la masa (Tabla III.6).

Tabla III.6. Masa detectada y tiempo de retención de las 18 micotoxinas analizadas mediante HPLC-MS.

MICOTOXINA	Masa	Tiempo de Retención
Patulina	136,9	7,22
Ácido penicílico	171,5	8,54
Roquefortina C	390,4	8,52
Aflatoxina G1	329,7	10,42
Aflatoxina B1	313,7	11,09
Ácido micofenólico	321,3	13,43
Griseofulvina	353,5	13,57
Citrinina	251,0	15,82
Ocratoxina A	404,0	17,36
Xanthomegmina	575,2	18,04
Esterigmatocistina	325,3	19,95
Verruculógeno	494,1	19,81
Ácido secalónico D	639,1	20,71
Ácido ciclopiazónico	337,1	23,08
Fumitremorgina B	462,2	24,04
Verrucosidina	417,5	27,25
Paxilina	418,1	28,73
Penitrem A	634,1	30,29

Los cromatogramas correspondientes a los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de MEB y PDB resultaron similares en todos los casos.

Únicamente se identificaron siete micotoxinas producidas por siete aislados diferentes de los 37 mohos seleccionados (Tabla III.7).

Tabla III.7. Micotoxinas detectadas mediante HPLC-MS en los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de los 37 aislados seleccionados tras incubar en MEB a 25°C durante 15 días.

AI SLADO	MICOTOXINA	Masa	Tiempo de retención (min)	Área (UAA)
RB41C	ácido secalónico	639,5	21,60	1,7x10 ¹⁰
AMP61	ácido ciclopiazónico	337,6	22,74	1,2x10 ¹⁰
AMB11	ácido secalónico	639,5	21,54	7,1x10 ⁹
AS51D	ácido secalónico	639,3	21,50	3x10 ⁹
CSI I 42	verrucosidina	417,2	27,42	1,6 x10 ⁶
CSI I 52	verrucosidina	417,4	27,34	4,5 x10 ⁵
AB11C	ocratoxina A	404,1	17,01	1,4 x10 ⁹

ANÁLISIS DE MICOTOXINAS MEDIANTE MECC.

El análisis mediante electroforesis capilar micelar electrocinética permitió separar e identificar 19 micotoxinas distintas (Figura III.4).

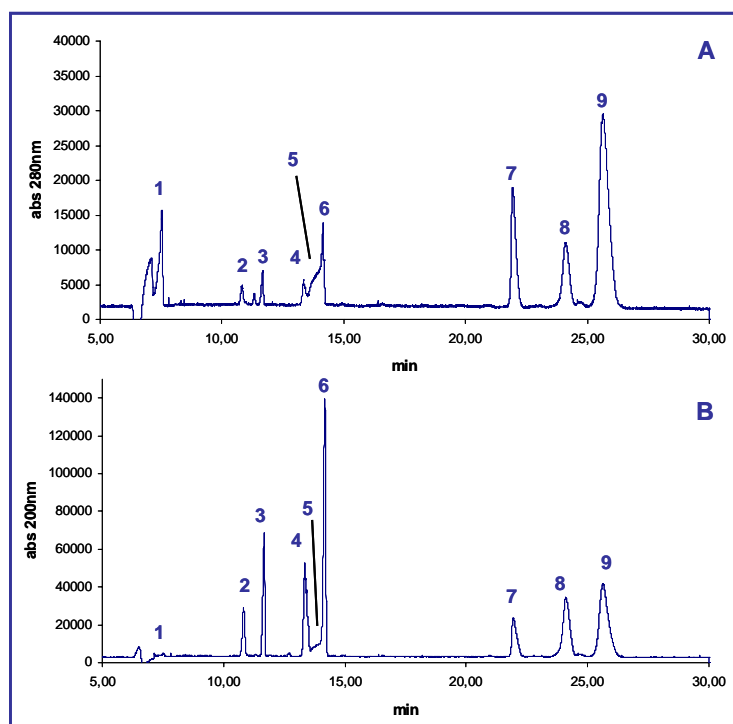


Figura III.4. Electroferogramas a 280 nm (A) y 200 nm (B) de un patrón de micotoxinas constituido por patulina (1), citrinina (2), ácido penicílico (3), ocratoxina A (4), ácido ciclopiazónico (5), ácido micofenólico (6), zearalenona (7), aflatoxina B1 (8), griseofulvina + citreoviridina (9), analizado mediante MECC.

Las micotoxinas se identificaron en función del tiempo de retención y el espectro de absorbancia entre 190 y 600 nm (Tabla III.8).

Tabla III.8. Tiempo de retención y longitudes de onda a las que se detectaron los máximos de absorbancia de las 19 micotoxinas analizadas mediante MECC.

MICOTOXINA	Tiempo de Retención (min)	Máximos de absorbancia (nm)
Patulina	7,24	280 ^c , 560
Ácido secalónico D	9,84	246, 343, 363 ^c
Citrinina	10,60	219 ^c , 255, 321
Ácido penicílico	11,20	222
Viridicatumtoxina	13,38	247, 279 ^c , 408
Ácido micofenólico	13,88	228 ^c , 342, 349
Fumitremorgina B	21,15	e ^c , 230, 295
Griseofulvina pico 1	23,08	218, 258, 294 ^c
Citreoviridina	23,05	202, 297, 397 ^c
Penitrem A	24,57	e ^c , 235, 300
Roquefortina C	25,13	206 ^c , 244, 329
Paxilina	25,20	233 ^c , 287
Griseofulvina pico 2	25,80	220, 299 ^c
Verrucosidina	12,85	e ^c , 214, 239
Ocratoxina A	13,09	e ^c , 217, 381
Ácido ciclopiazónico	13,73	225 ^c , 262, 283
Aflatoxina B1	24,14	e ^c , 232, 272, 366
Esterigmatocistina	26,60	250 ^c , 335
Deoxinivalenol	7,49	222
Zearalenona	21,05	243 ^c , 280, 317

^c Longitud de onda a la que se detectó la máxima absorbancia.
e, máximo de absorción por debajo de 190 nm.

En todos los casos se obtuvieron electroferogramas similares a partir de los extractos obtenidos tanto de MEB como de PDB para cada uno de los 37 aislados ensayados.

Los resultados del análisis de los extractos por MECC fueron similares a los obtenidos previamente, excepto en el caso de los extractos de CSII42 y CSII52, en los que no se detectó verrucosidina. En cambio, sí pudieron detectarse el resto de micotoxinas: ácido secalónico en los extractos clorofórmicos de los aislados RB41C, AMB11 y AS51D, ocratoxina A en los extractos de AB11C, y ácido ciclopiazónico en los extractos obtenidos a partir de AMP61. Los tiempos de elución (10, 13,2 y 13,9 minutos respectivamente) y el espectro de absorbancia entre 190 y 600 nm de los picos sospechosos coincidieron con los de los patrones de las micotoxinas, como se observa para el ácido secalónico y el ácido ciclopiazónico en las Figuras III.5 y III.6 respectivamente.

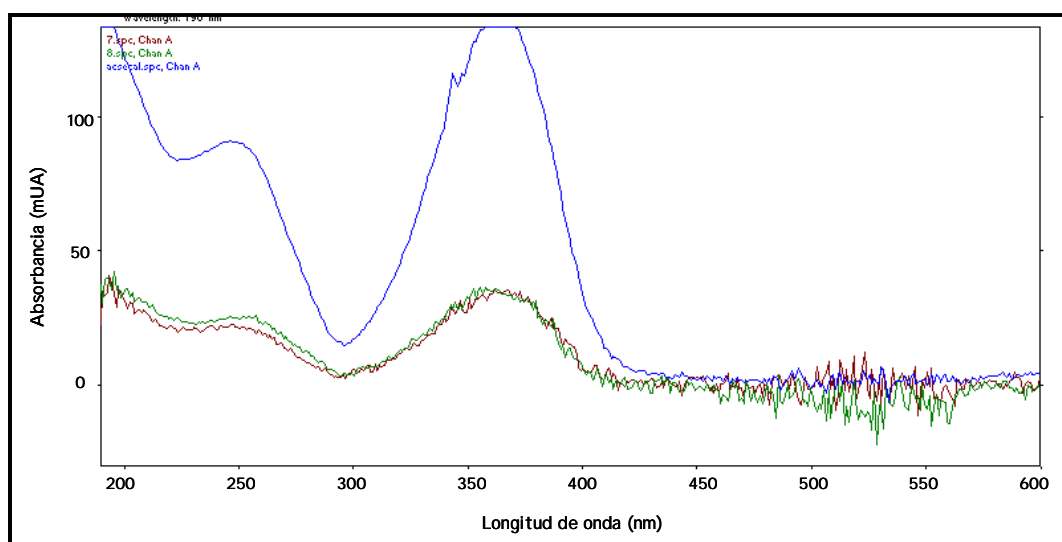


Figura III.5. Espectro de absorción de 190 a 600 nm del ácido secalónico — y de los picos sospechosos detectados en los extractos de los aislados AMB11 — y AS51D — identificados como ácido secalónico.

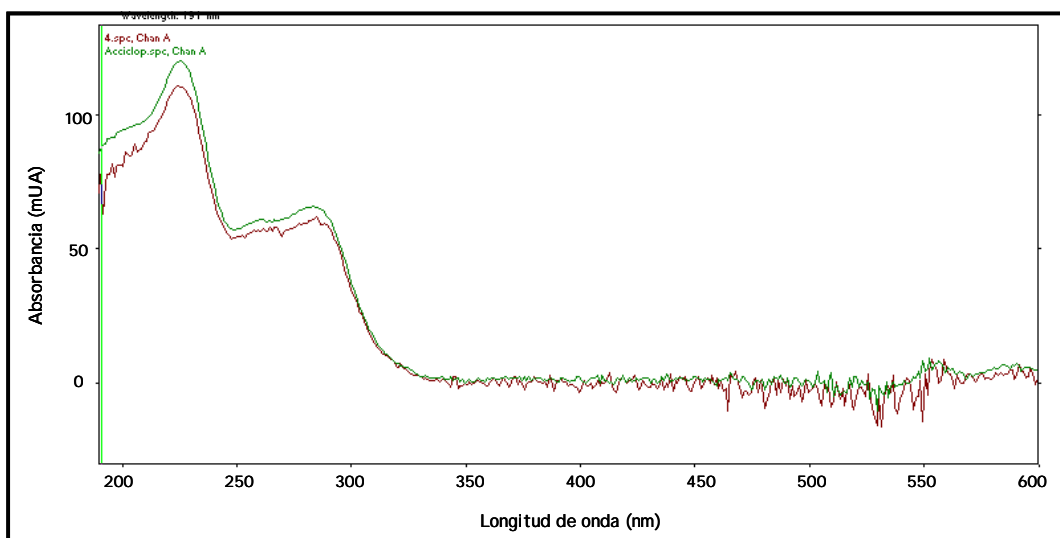


Figura III.6. Espectro de absorbancia de 190 a 600 nm del ácido ciclopiazónico — y del pico sospechoso detectado en los extractos del aislado AMP61 — identificado como ácido ciclopiazónico.

De manera similar, el espectro de absorbancia permitió descartar algunos picos sospechosos, como fue el caso del detectado en los extractos de DBI23 a un tiempo de retención similar al de la roquefortina (Figura III.7).

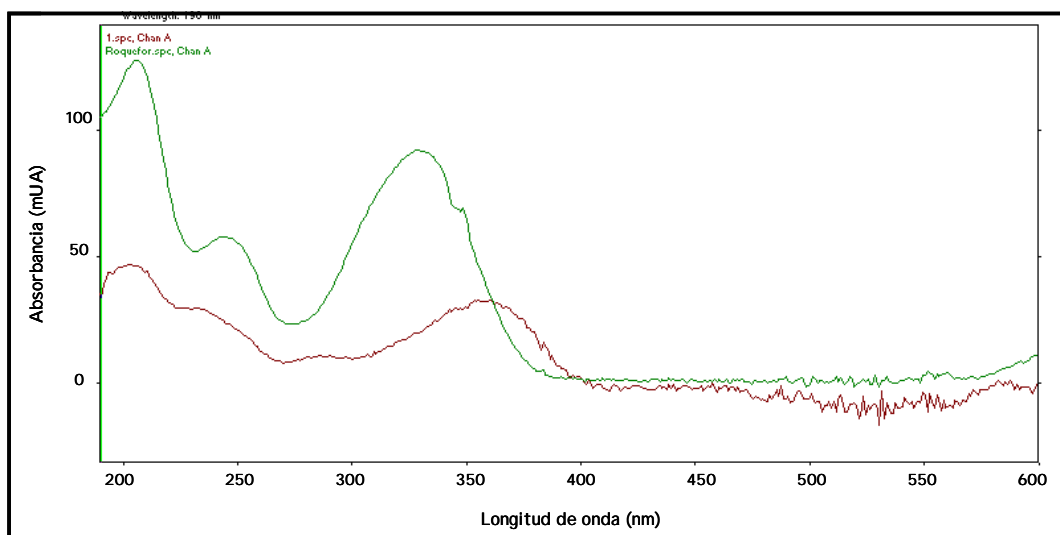


Figura III.7. Espectro de absorbancia de 190 a 600 nm de la roquefortina — y del pico sospechoso detectado en los extractos del aislado DBI23 — .

III.1.6. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR HPLC-UV.

Los perfiles de metabolitos obtenidos mediante HPLC-UV correspondientes a los extractos clorofórmicos obtenidos de un mismo aislado a partir de MEB y PDB resultaron similares en todos los casos. La mayoría de los perfiles de los 37 aislados seleccionados mostraron 6 patrones diferentes (Figura III.8) caracterizados por una serie de picos comunes (Tabla III.9). Con estos patrones se pudieron agrupar a 28 de los 37 aislados (Tabla III.10), mientras que los 9 mohos restantes presentaron perfiles totalmente diferentes (Figura III.9).

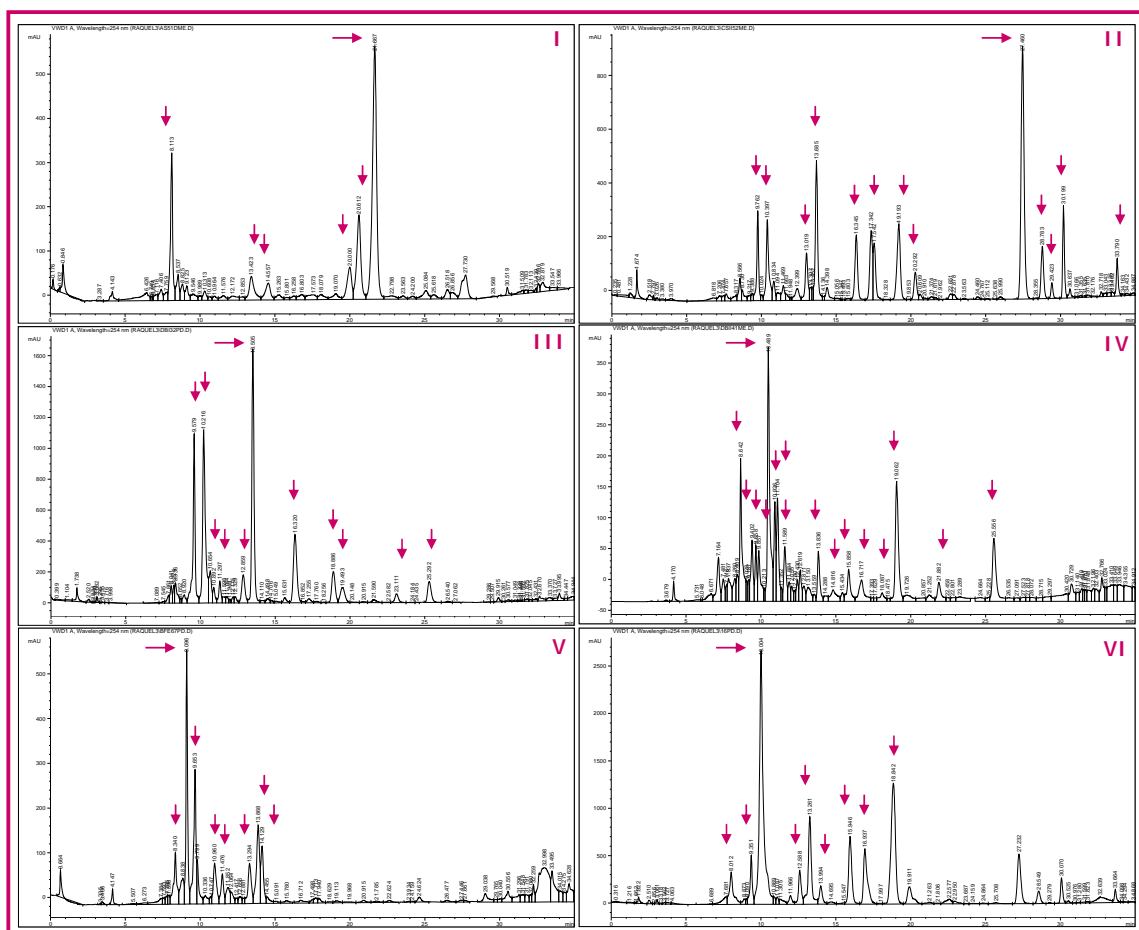


Figura III.8. Perfiles de metabolitos secundarios mayoritarios obtenidos mediante HPLC-UV a partir de los extractos clorofórmicos de los aislados ensayados. Los picos representativos de cada uno de los perfiles se señalan con una flecha. I: AS51D (MEB), II: CSII52 (MEB), III: DBI32 (PDB), IV: DBII41 (MEB), V: BFE67 (PDB) y VI: Pg131 (PDB).

Tabla III.9. Picos representativos de los seis perfiles mayoritarios.

PERFIL	MOHO REPRESENTATIVO	PICOS REPRESENTATIVOS del PERFIL	
		nº	Tiempos de retención
I	AS51D	6	8,1; 13,4; 14,6; 20; 20,6; 21,7
II	CSII 52	13	9,8; 10,4; 13; 13,7; 16,3; 17,3; 19,2; 23,3; 27,5; 28,8; 29,4; 30,2; 33,8
III	DBI 32	11	9,6; 10,2; 10,7; 11,3; 12,9; 13,5; 16,3; 18,9; 19,5; 23,1; 25,3
IV	DBI I 41	16	8,6; 9,4; 9,7; 9,9; 10,5; 10,9; 11,1; 11,6; 13,8; 14,8; 15,9; 16,7; 18,1; 19,1; 21,9; 25,6
V	BFE67	8	8,3; 9,1; 9,7; 11; 11,5; 13,3; 13,9; 14,1
VI	Pg131	9	8; 9,4; 10; 12,6; 13,3; 14; 16; 17; 18,8

Tabla III.10. Aislados incluidos en cada uno de los perfiles de metabolitos secundarios mayoritarios.

PERFIL	AI SLADOS
I	RB41C, AMB11, AS51D
II	CSII 42, CSII 52
III	DBI 17, DBI 12, DBI 32, CSI 44
IV	DBI I 41, DBI I 42, CSII 16, CSII 33, CBI 25, CBI 42, CBI I 57, CSI 54, FMP21, DBI 11, DBI 41, DBI I 22, DBI I 23, DBI I 12
V	BFE66, BFE67, Pj261
VI	Pg131, Pg341

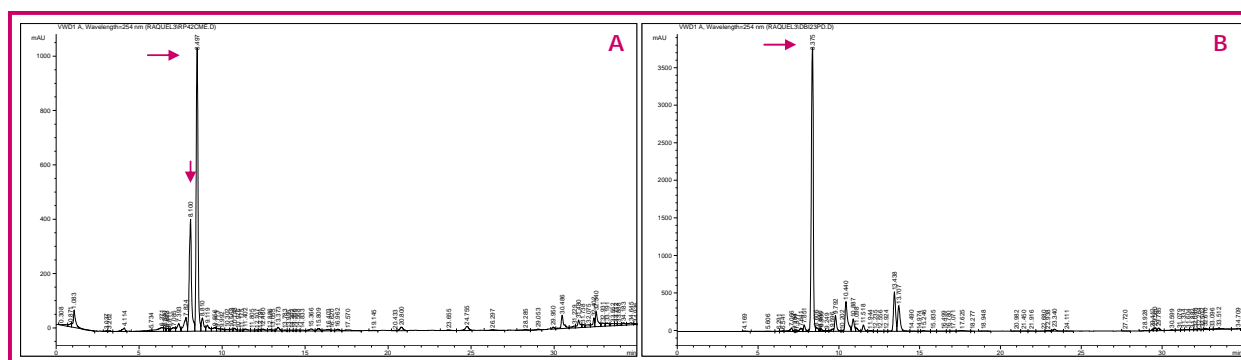


Figura III.9. Perfiles de metabolitos secundarios obtenidos mediante HPLC-UV a partir de los extractos clorofórmicos de 2 de los 11 aislados no incluidos en ninguno de los patrones mayoritarios. Los picos de mayor área de cada uno de los perfiles se señalan con una flecha. A: RP42C (MEB) y B: DBI23 (PDB).

III.1.7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

El análisis mediante el sistema Microstation de BIOLOG permite caracterizar los aislados en función de los cambios originados por cada moho frente a diferentes sustratos. Se evaluó tanto la utilización del oxígeno como la asimilación de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno de manera independiente (véase apartado II.2.1.7). El programa informático MicroLog, tras comparar los resultados obtenidos con la base de datos de mohos de Biolog, genera un listado de las especies más probables. Para cada especie se ofrecen dos parámetros, SIM y DIST, que indican la similitud y la diferencia que existe entre el patrón de metabolización mostrado por la especie posible y el del microorganismo problema respectivamente. El programa requiere valores de $SIM \geq 0,6$ y $DIST \leq 5,5$ para una identificación fiable. En ese caso ofrece un porcentaje que indica la probabilidad de acierto (PROB).

Este sistema sólo ofreció una identificación con suficiente nivel de fiabilidad (>85%) para 12 de los 37 mohos analizados, resultando identificados 11 de estos 12 aislados como *P. solitum* (Tabla III.11). Por otra parte, el aislado AMP61 fue identificado por el programa MicroLog como *Penicillium camemberti* con suficiente fiabilidad (99%). Los parámetros SIM y DIST ofrecidos por el programa MicroLog para el resto de los aislados seleccionados no ofrecen garantías de una correcta identificación (Tabla III.11).

Finalmente, ni las 3 cepas de colección de *P. nalgiovense* BFE66, BFE67 y Pj261, ni las dos cepas de *P. chrysogenum* Pg131 y Pg341 fueron identificadas con un nivel suficiente de fiabilidad con este sistema (Tabla III.11).

Tabla III.11. Caracterización de los 37 mohos mediante el programa MicroLog.

AI SLADO	CARACTERI ZACIÓN	SIM ^a	DI ST ^b	PROB ^c
DBI 23	<i>P. viridicatum</i> Westling BGB	0.499	7.12	
AS51D	<i>P. chrysogenum</i> Thom	0.312	8.08	
AB11C	<i>P. verrucosum</i> var <i>verrucosum</i> Dierckx BGB	0.559	6.94	
AMB11	<i>P. solitum</i> Westling BGC	0.55	4.49	
AMP61	<i>P. camemberti</i> Thom BGA	0.659	5.14	99%
RP42C	<i>P. solitum</i> Westling BGC	0.422	6.57	
RB41C	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx BGB	0.275	6.62	
47	<i>P. nalgiovense</i> Laxa	0.485	6.75	
BFE66	<i>P. verrucosum</i> var <i>verrucosum</i> Dierckx BGA	0.588	6.43	
BFE67	<i>P. verrucosum</i> var <i>verrucosum</i> Dierckx BGA	0.5	7.72	
16	<i>P. polonicum</i> Zaleski BGA	0.352	11.01	
CSI I 42	<i>P. polonicum</i> Zaleski BGA	0.586	6.05	
26	<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx BGB	0.152	7.94	
CP32	<i>Talaromyces bacillisporus</i> (Swift) C.R. Benjamin	0.248	13.46	
CBI 25	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.777	3.35	99%
CSI 44	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.683	4.85	
CSI 54	<i>P. solitum</i> Westling BGC	0.536	5.84	
CSI I 16	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.734	4.03	99%
CSI I 33	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.806	2.91	99%
CSI I 52	<i>P. polonicum</i> Zaleski BGA	0.487	6.91	
DBI 32	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.678	4.93	99%
CBI 42	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.642	5.52	
CBI 52	- ^d			
DBI 41	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.793	3.10	99%
CBI I 57	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.626	5.67	
DBI 11	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.726	4.15	99%
DBI 12	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.418	9.18	
DBI 17	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.633	4.02	86%
DBI 44	<i>P. expansum</i> Link BGB	0.309	12.05	
FMP13	-			
DBI I 12	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.763	3.57	99%
DBI I 14	-			
FMP21	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.762	3.59	99%
DBI I 22	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.556	7.02	
DBI I 23	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.646	5.45	99%
DBI I 41	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.546	7.15	
DBI I 42	<i>P. solitum</i> Westling BGA	0.666	5.12	99%

^a SIM similitud entre el patrón de la especie posible y el de la especie problema.

^b DIST diferencia entre el patrón de la especie posible y el de la especie problema.

^c PROB probabilidad de acierto en caso de identificación fiable.

^d -: el programa no ofrece ningún resultado por desarrollo insuficiente del moho.

III.2. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.

Para estudiar los compuestos responsables de la inhibición se seleccionaron 15 aislados en función del patrón de inhibición mostrado por el medio de cultivo, la fase acuosa y el extracto clorofórmico en placas multipocillo, incluyendo mohos de los 7 patrones descritos (véase apartado III.1.4). También se tuvo en cuenta la caracterización preliminar de los aislados (véase apartado III.1.3) dentro de cada uno de los patrones de inhibición.

III.2.1. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Tras incubar los 15 aislados seleccionados en MEB y PDB durante 15 días, los medios de cultivo se fraccionaron por cromatografía de intercambio iónico tal como se describe en el apartado II.2.2.1.

De las dos columnas de sefarosa utilizadas con la que se obtuvo una mayor resolución fue con la de 5ml (HiTrapTM SP HP). La de mayor tamaño (HiLoadTM 26/10 SP HP), aunque permite la inyección de mayor volumen de muestra, no produce una mejora en la resolución y sí alarga en exceso la duración de las carreras. Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos con la columna HiTrapTM SP HP.

Se obtuvieron 28 fracciones de cada uno de los medios MEB y PDB donde se incubaron los mohos seleccionados, así como de los medios de cultivo sin inocular (Figura III.10). En estas fracciones eluyeron los diferentes compuestos en función de su carga y se agruparon en fracciones obtenidas con baja, media y alta fuerza molar.

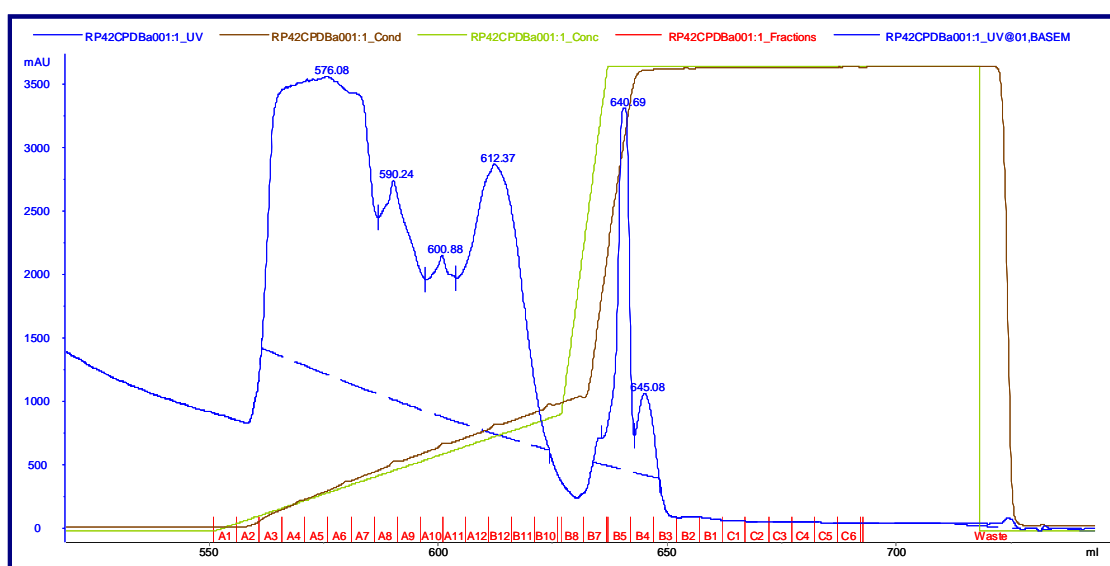


Figura III.10. Fraccionamiento del medio de cultivo PDB tras la incubación con el aislado RP42C a 25°C durante 15 días. — indica el porcentaje de tampón acetato sódico 0,02 M a pH 4,5, 1 M de NaCl. — representa la conductividad. — corresponde con la intensidad de la absorbancia. — indica las 28 fracciones obtenidas.

III.2.2. SELECCIÓN DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Para determinar dónde eluyeron los compuestos responsables de la inhibición, las diversas fracciones obtenidas por intercambio iónico se sometieron a un ensayo en placas multipocillo tal como se describe en el apartado II.2.1.4. Cada una de las 28 fracciones obtenidas de los 15 aislados seleccionados se ensayó individualmente frente a las 4 cepas de referencia que habían mostrado mayor capacidad de discriminación en las pruebas anteriores, al igual que las mismas fracciones obtenidas a partir de los medios de cultivo MEB y PDB incubados sin inocular.

En la Tabla III.12 se recoge el incremento en la absorbancia tras 96 h de incubación producido por el desarrollo de cada moho de referencia (*P. solitum* Ps321, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261) en presencia de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico a partir de los mohos seleccionados.

Se detectó un menor desarrollo de *P. solitum* Ps321 y *P. echinulatum* Pe321 al cultivar en presencia de las fracciones obtenidas a partir de PDB y MEB incubadas sin inocular respectivamente. Por otro lado, se detectó menor crecimiento de *P. commune* Pc332 en presencia de las fracciones eluídas con mayor fuerza molar independientemente del medio de cultivo del que se obtuvieron. Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en el desarrollo de *A. niger* An261 ni con las fracciones de los medios de cultivo ni con las distintas concentraciones de NaCl.

Por otra parte, se obtuvieron 258 fracciones que limitaban de manera significativa ($p < 0,05$) el crecimiento de alguna cepa de referencia a partir de los 15 mohos seleccionados. El aislado que mostró más fracciones activas fue DBI23 fundamentalmente al ser incubado en MEB. A partir de los aislados BFE66, AMP61, AS51D y RP42C también se obtuvieron distintas fracciones activas, que eluyeron tanto a baja, como a media y alta fuerza molar. Generalmente mostraron mayor espectro de inhibición las fracciones de alta fuerza molar, obtenidas tanto de MEB como de PDB. Las fracciones eluídas con una fuerza molar media sólo resultaron activas frente a *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261. Las fracciones de baja fuerza molar inhibieron en su mayoría el desarrollo de *P. commune* Pc332 y fundamentalmente al ser obtenidas a partir de PDB (Tabla III.12).

De otros aislados como DBI11, CSI54 y CSII33 se obtuvieron principalmente de MEB las fracciones activas con una fuerza molar baja o media, que inhibieron fundamentalmente a *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 (Tabla III.12).

Los mohos de los que se obtuvieron menor número de fracciones activas fueron RB41C, DBII22, DBII41, CBII57, AMB11, AB11C y Pg341 (Tabla III.12).

Las fracciones que produjeron mayor inhibición ($p < 0,001$), cuya actividad se apreciaba a simple vista transcurridas tres semanas de incubación, están recogidas en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Fracciones más activas ($p < 0,001$) obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico.

FRACCIÓN	AI SLADO	MEDI O de CULTIVO	CEPA de REFERENCIA MÁS SENSIBLE
A3, A5 ,A6 ,A7, A11, B4	DBI 23	MEB	<i>P. solitum</i> Ps321
A4	BFE66	PDB	<i>P. commune</i> Pc332
A5	AS51D	PDB	<i>P. commune</i> Pc332
A10, A11, A12	AS51D	MEB	<i>P. commune</i> Pc332
B5	RP42C	MEB/PDB	<i>P. echinulatum</i> Pe321, <i>P. commune</i> Pc332, <i>A. niger</i> An261

III.2.3. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.

Las fracciones más activas obtenidas por cromatografía de intercambio iónico se purificaron en columnas de filtración en gel. Con las columnas Superdex™ 75 HR 10/30 y HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 se obtuvo mejor resolución que con la Superose™ 12 10/300 GL. Concretamente la HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 además de permitir la inyección de un volumen mayor de muestra (hasta 13 ml) también soporta flujos más rápidos (hasta 4,4 ml/min), por lo que se utilizó para obtener todos los resultados que se muestran a continuación.

Para determinar la actividad antifúngica de las diversas fracciones purificadas se sometieron a un ensayo en placas multipocillo tal como se describe en el apartado II.2.1.4. Cada una de las fracciones purificadas se ensayó individualmente frente a las cepas de referencia que habían mostrado sensibilidad a la fracción inicial obtenida por intercambio iónico. Se comparó el desarrollo de las cepas de referencia en presencia de cada fracción con el desarrollo mostrado cuando se incubaban con el tampón de elución (fosfato sódico 50 mM, 0,15 M de NaCl a pH 7).

FRACCIONES OBTENIDAS DE *P. olsonii* RP42C EN MEB Y PDB.

A partir de la fracción B5 obtenida de *P. olsonii* RP42C tanto en MEB como en PDB se purificó por filtración en gel un único pico que eluyó aproximadamente a los 228 ml (Figura III.11), si bien la intensidad registrada en la fracción obtenida partir de MEB fue mayor (Figura III.11). Para evaluar la actividad antifúngica se seleccionó únicamente la fracción purificada del medio en el que mostró mayor concentración.

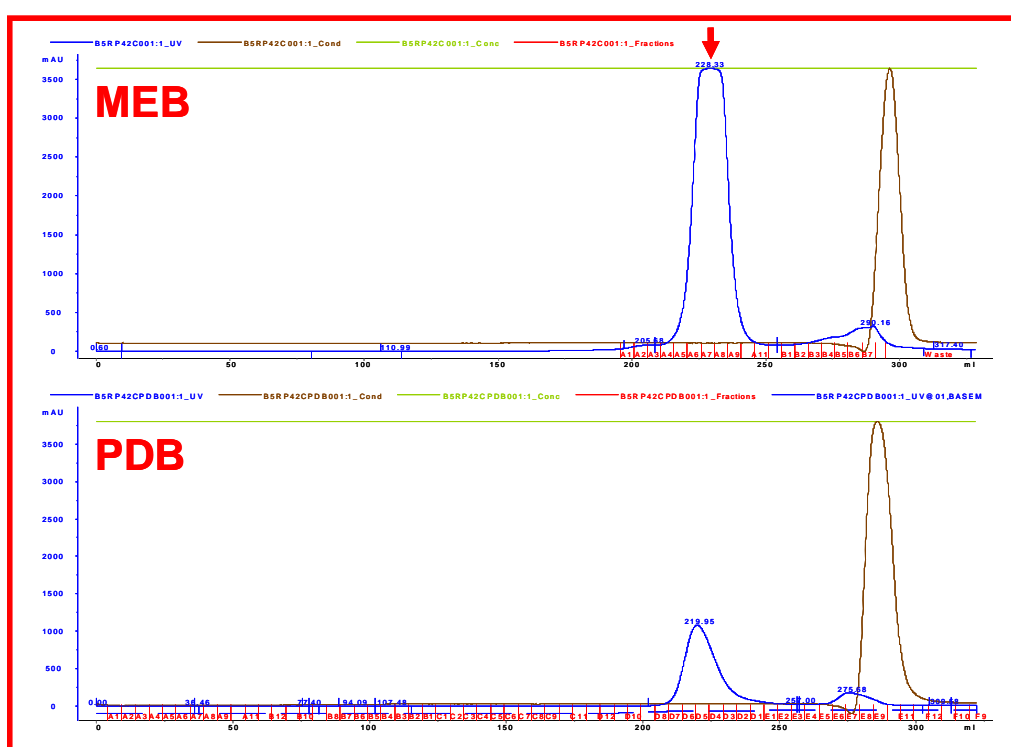


Figura III.11. Cromatogramas de la fracción B5 obtenida de *P. olsonii* RP42C incubado en MEB y PDB. La flecha indica el pico seleccionado para los ensayos de inhibición en placas multipocillo.

Dada la actividad que había mostrado la fracción B5 obtenida de *P. olsonii* RP42C, para los ensayos de inhibición en placas multipocillo se utilizaron como referencia las cepas de *P. solitum* Ps321, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261.

La fracción purificada redujo significativamente ($p < 0,001$) el crecimiento tanto de *P. solitum* Ps321 como de *P. echinulatum* Pe321 durante las 72 h de incubación (Tabla III.14). El desarrollo de *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 apenas mostró diferencias significativas en las primeras 48 h de incubación. No obstante, a las 72 h de incubación también se redujo significativamente ($p < 0,001$) el crecimiento de estas cepas en presencia de la fracción purificada (Tabla III.14).

Tabla III.14. Incrementos en la absorbancia por el cultivo de las cepas de referencia en presencia de la fracción purificada por filtración en gel a partir de la fracción activa obtenida de *P. olsonii* RP42C incubado en MEB.

Cepa de referencia	Fracciones activas	Fracciones purificados	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
			24 h	48 h	72 h
<i>P. solitum</i> Ps321	B5	B5.1	0,05 ± 0 ^{+++ a}	0,13 ± 0,007 ⁺⁺⁺	0,26 ± 0,028 ⁺⁺⁺
	CONTROL		0,12 ± 0,002	0,38 ± 0,035	1,64 ± 0,087
<i>P. echinulatum</i> Pe321	B5	B5.1	0,08 ± 0,001 ⁺⁺⁺	0,25 ± 0,012 ⁺⁺	0,44 ± 0,012 ⁺⁺⁺
	CONTROL		0,13 ± 0,005	0,47 ± 0,066	1,08 ± 0,043
<i>P. commune</i> Pc332	B5	B5.1	0,07 ± 0,004 ⁺	0,25 ± 0,031	0,41 ± 0,037 ⁺⁺⁺
	CONTROL		0,09 ± 0,004	0,28 ± 0,074	1,67 ± 0,155
<i>A. niger</i> An261	B5	B5.1	0,04 ± 0	0,12 ± 0,009	0,25 ± 0,029 ⁺⁺⁺
	CONTROL		0,03 ± 0,043	0,32 ± 0,133	1,56 ± 0,116

^a Los superíndices indican diferencias significativas + ($p < 0,05$), ++ ($p < 0,01$) y +++ ($p < 0,001$) con respecto al crecimiento de las cepas de referencia en el control con tampón de elución.

FRACCIONES OBTENIDAS DE *P. chrysogenum* AS51D EN MEB Y PDB.

A partir de la fracción A5 obtenida de *P. chrysogenum* AS51D en PDB se obtuvo un único pico (A5.1) a los 208 ml de elución (Figura III.12). De la fracción A11 obtenida en MEB se obtuvieron 2 picos a los 152 (A11.1) y 174 (A11.2) ml de elución respectivamente (Figura III.12). Las fracciones A10 y A12 obtenidas en MEB se descartaron ya que formaban parte del mismo pico que la A11, pero con menor concentración.

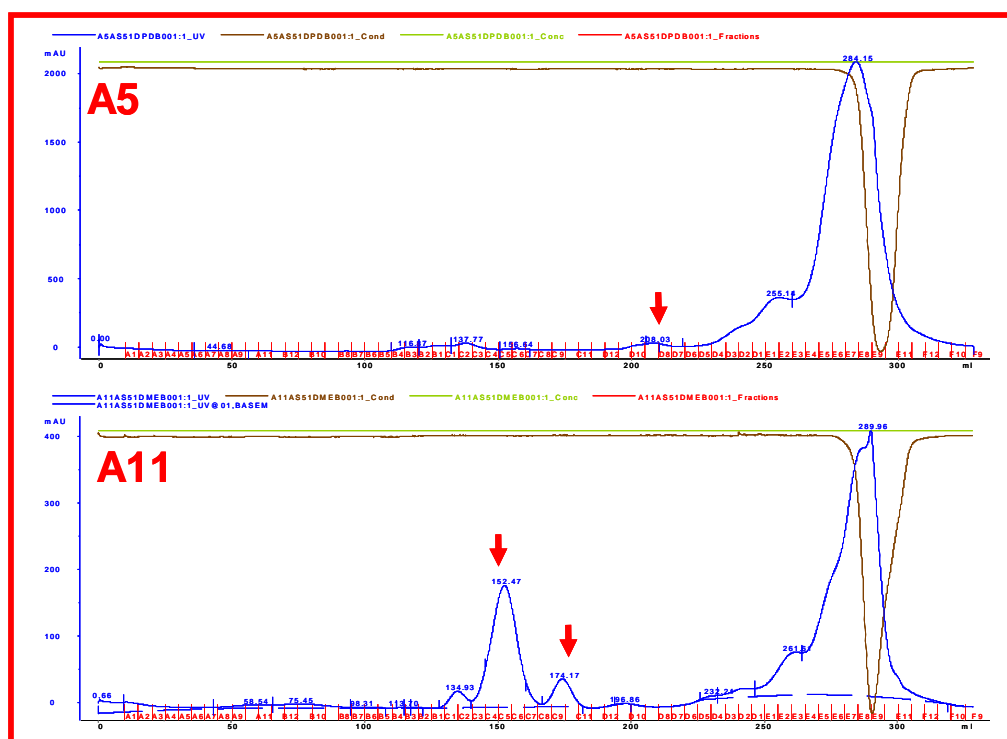


Figura III.12. Cromatogramas de las fracciones A5 y A11 obtenidas de *P. chrysogenum* AS51D incubado en PDB y MEB respectivamente. Las flechas indican los picos seleccionados para los ensayos de inhibición en placas multipocillo.

El ensayo para determinar la actividad inhibidora de la única fracción purificada a partir de la fracción de obtenida por intercambio iónico A5 reveló que no producía una inhibición significativa del crecimiento de *P. commune* Pc332 en placas multipocillo (Tabla III.15).

RESULTADOS

Tabla III.15. Incrementos en la absorbancia por el cultivo de *P. commune* Pc332 en presencia de la fracción purificada por filtración en gel a partir de la fracción activa obtenida de *P. chrysogenum* AS51D incubado en PDB.

Fracciones activas	Fracciones purificados	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
		24 h	48 h	72 h
A5	A5.1	0,32 ± 0,001	1,28 ± 0,016	1,39 ± 0,013
	CONTROL	0,12 ± 0,002	0,43 ± 0,079	1,25 ± 0,329

Por el contrario, la fracción con el pico de mayor tamaño (A11.1) purificada a partir de la fracción A11 obtenida en MEB produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del crecimiento de *P. commune* Pc332 a las 72 h de incubación (Tabla III.13). También se observaron diferencias, aunque menos marcadas ($p < 0,05$), al incubar con la fracción A11.2 que eluyó a los 174 ml (Tabla III.16).

Tabla III.16. Incrementos en la absorbancia por el cultivo de *P. commune* Pc332 en presencia de las fracciones purificadas por filtración en gel a partir de la fracción activa obtenida de *P. chrysogenum* AS51D incubado en MEB.

Fracciones activas	Fracciones purificados	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
		24 h	48 h	72 h
A11	A11.1	0,08 ± 0,001	0,22 ± 0,006	0,48 ± 0,04 ⁺⁺
	A11.2	0,07 ± 0,005 ^{++a}	0,26 ± 0,051	1,21 ± 0,266 [†]
	CONTROL	0,09 ± 0,004	0,28 ± 0,074	1,67 ± 0,155

^a Los superíndices indican diferencias significativas + ($p < 0,05$) y ++ ($p < 0,01$) con respecto al crecimiento de *P. commune* Pc332 en el control con tampón de elución.

FRACCIONES OBTENIDAS DE *P. nalgiovensis* BFE66 EN PDB.

A partir de la fracción A4 obtenida de *P. nalgiovensis* BFE66 incubado en PDB se detectaron por filtración en gel 4 picos a los 123 (A4.1), 171 (A4.2), 197 (A4.3) y 211 ml (A4.4) de elución (Figura III.13).

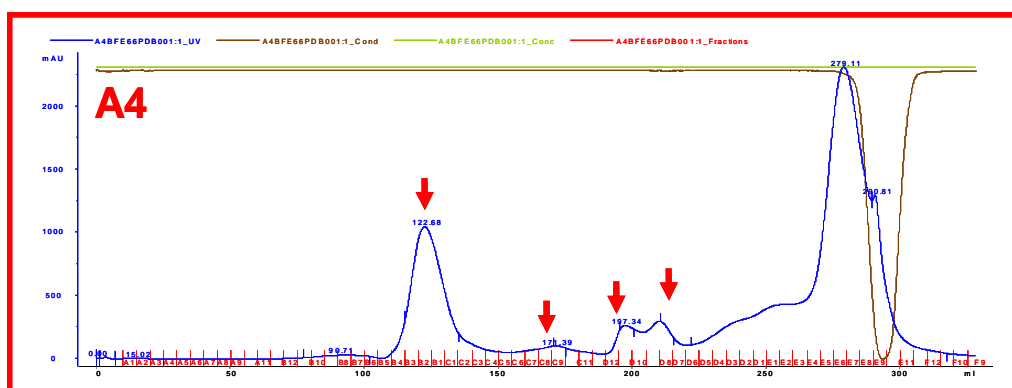


Figura III.13. Cromatograma de la fracción A4 obtenida de *P. nalgiovensis* BFE66 incubado en PDB. Las flechas indican los picos seleccionados para los ensayos de inhibición en placas multipocillo.

En los ensayos realizados en placas multipocillo sólo produjo una inhibición significativa del crecimiento de *P. commune* Pc332 la fracción obtenida a los 123 ml de elución (A4.1), tanto a las 48 (p<0,05) como a las 72 h de incubación (p<0,001; Tabla III.17).

Tabla III.17. Incrementos en la absorbancia por el cultivo de *P. commune* Pc332 en presencia de las fracciones purificadas por filtración en gel a partir de la fracción activa obtenida de *P. nalgiovensis* BFE66 incubado en PDB.

Fracciones activas	Fracciones purificados	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
		24 h	48 h	72 h
A4	A4.1	0,10 ± 0,008	0,3 ± 0,027 ^a	0,47 ± 0,05 ⁺⁺⁺
	A4.2	0,47 ± 0,039	1,32 ± 0,018	1,38 ± 0,029
	A4.3	0,19 ± 0,009	1,17 ± 0,02	1,35 ± 0,027
	A4.4	0,15 ± 0,004	1,18 ± 0,049	1,38 ± 0,043
CONTROL		0,12 ± 0,002	0,43 ± 0,079	1,25 ± 0,329

^a Los superíndices indican diferencias significativas + (p<0,05) y +++ (p<0,001) con respecto al crecimiento de *P. commune* Pc332 en el control con tampón de elución.

FRACCIONES OBTENIDAS DE *P. viridicatum* DBI23 EN MEB.

A partir de *P. viridicatum* DBI23 se seleccionaron las fracciones A3, A6, A11 y B4, ya que A5 y A7 formaban parte del mismo pico que la A6, pero con menor concentración. De cada una de las fracciones A3, A6 y B4 obtenidas en MEB sólo se obtuvo un pico con absorbancia a 214 nm que eluyó a los 228 (A3.1), 193 (A6.1) y 230 (B4.1) ml respectivamente (Figura III.14). En la fracción A11 se registraron dos picos a los 151 (A11.1) y 197 (A11.2) ml (Figura III.14).

Ninguna de las fracciones obtenidas produjo una inhibición significativa del crecimiento de *P. solitum* Ps321 a las 72 h de incubación (Tabla III.18).

Tabla III.18. Incrementos en la absorbancia por el cultivo de *P. solitum* Ps321 en presencia de las fracciones purificadas por filtración en gel a partir de las fracciones activas obtenidas de *P. viridicatum* DBI23 incubado en MEB.

Fracciones activas	Fracciones purificados	TIEMPO DE INCUBACIÓN		
		24 h	48 h	72 h
A3	A3.1	0,11 ± 0,020	0,33 ± 0,071	1,59 ± 0,119
A6	A6.1	0,08 ± 0,004 ^{++ a}	0,27 ± 0,016 ⁺	1,53 ± 0,021
A11	A11.1	0,09 ± 0,009	0,35 ± 0,050	1,29 ± 0,184
	A11.2	0,12 ± 0,012	0,48 ± 0,009	1,45 ± 0,458
B4	B4.1	0,09 ± 0,00 ⁺	0,26 ± 0,012 ⁺	1,46 ± 0,128
CONTROL		0,12 ± 0,002	0,38 ± 0,035	1,64 ± 0,087

^a Los superíndices indican diferencias significativas + (p<0,05) y ++ (p<0,01) con respecto al crecimiento de *P. solitum* Ps321 en el control con tampón de elución.

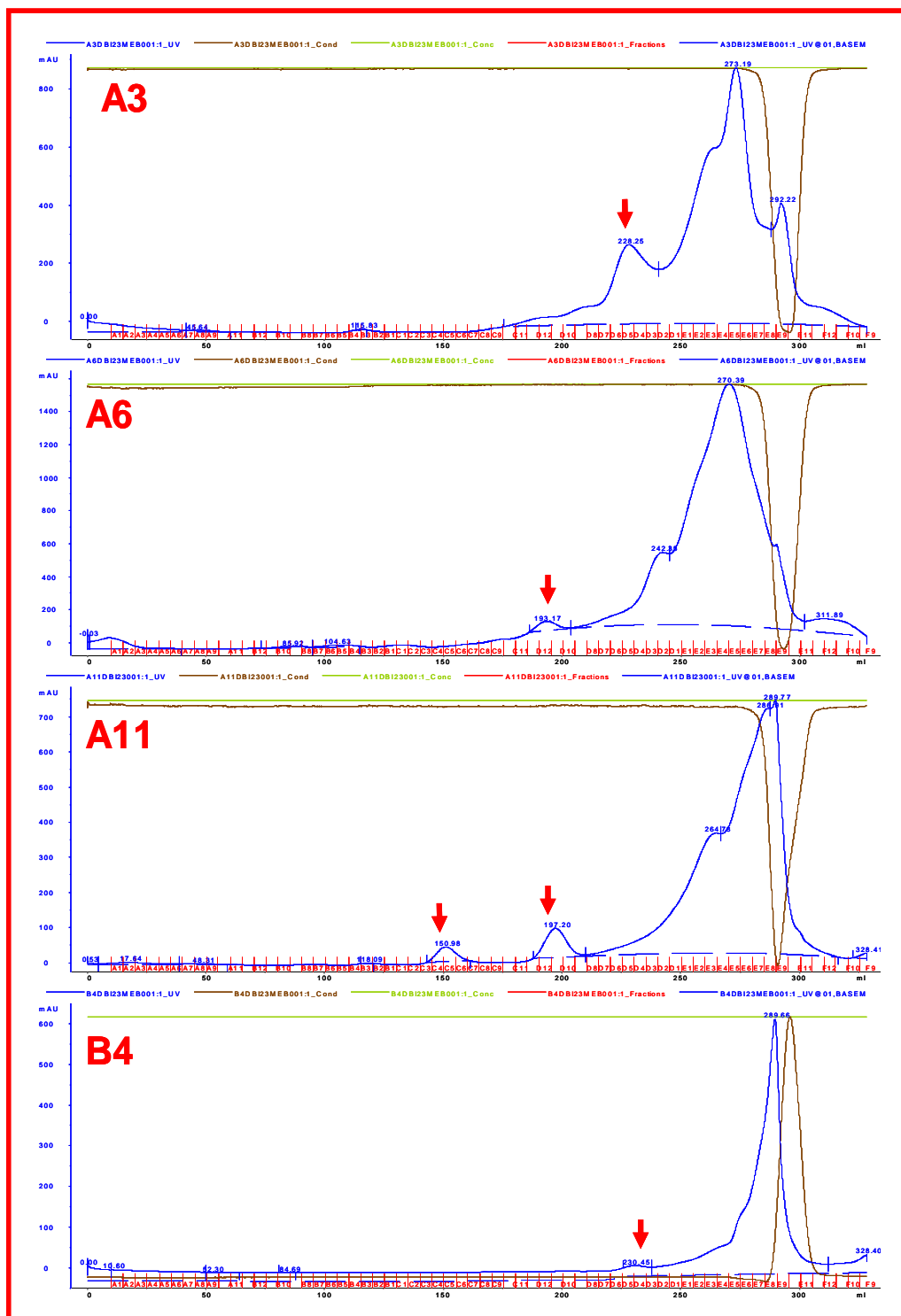


Figura III.14. Cromatogramas de las fracciones A3, A6, A11 y B4 obtenidas de *P. viridicatum* DBI23 incubado en MEB. Las flechas indican los picos seleccionados para los ensayos de inhibición en placas multipocillo.

III.2.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Las fracciones purificadas mediante cromatografía de filtración en gel que mostraron mayor actividad frente a las cepas de referencia en los ensayos realizados en placas multipocillo se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura III.15).

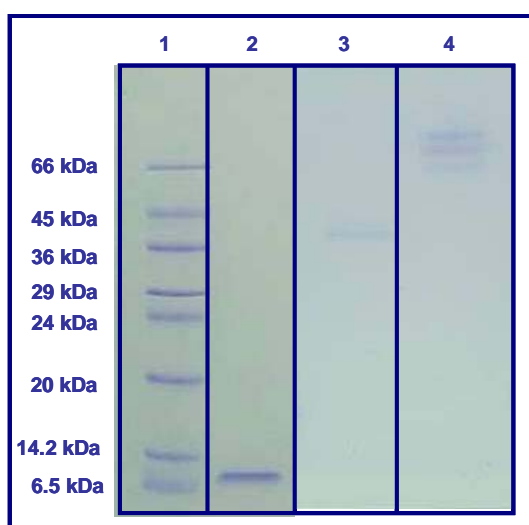


Figura III.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 12% de las fracciones activas purificadas por cromatografía de filtración en gel. Línea 1: marcador de pesos moleculares, línea 2: fracción B5.1 obtenida de *P. olsonii* RP42C (2 μ l/pocillo), línea 3: fracción A11.1 obtenida de *P. chrysogenum* AS51D (20 μ l/pocillo), línea 4: fracción A4.1 obtenida de *P. nalgiovense* BFE66 (20 μ l/pocillo).

A partir de las fracciones B5.1 y A11.1 se obtuvo una única banda, mientras que la fracción A4.1 reveló 3 bandas diferentes (Figura III.15). También se observaron importantes diferencias en la intensidad de las bandas en el gel de poliacrilamida, siendo muy superior la correspondiente a la fracción B5.1 de *P. olsonii* RP42C que en las restantes.

En la Tabla III.19 se presentan los pesos moleculares estimados para las diferentes bandas obtenidas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Tabla III.19. Pesos moleculares estimados de las bandas obtenidas mediante PAGE-SDS a partir de las fracciones activas purificadas por cromatografía de filtración en gel.

Fracciones activas	Bandas obtenidas	Peso molecular (Da)
B5.1	1	9067
A11.1	1	37667
A4.1	1	74925
	2	69150
	3	62325

III.3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE *P. olsonii* RP42C EN LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA.

De las tres fracciones purificadas mediante filtración en gel con actividad antifúngica se seleccionó la producida por *P. olsonii* RP42C en MEB, debido en primer lugar al mayor espectro de inhibición mostrado frente a las cepas de referencia ensayadas y en segundo, a su menor peso molecular.

III.3.1. PRODUCCIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

La concentración de la proteína producida por *P. olsonii* RP42C en MEB a pH 4,5 a 25°C, alcanza un nivel detectable en una semana de incubación y aumenta conforme se incrementa el tiempo de incubación hasta las tres semanas (Figura III.16).

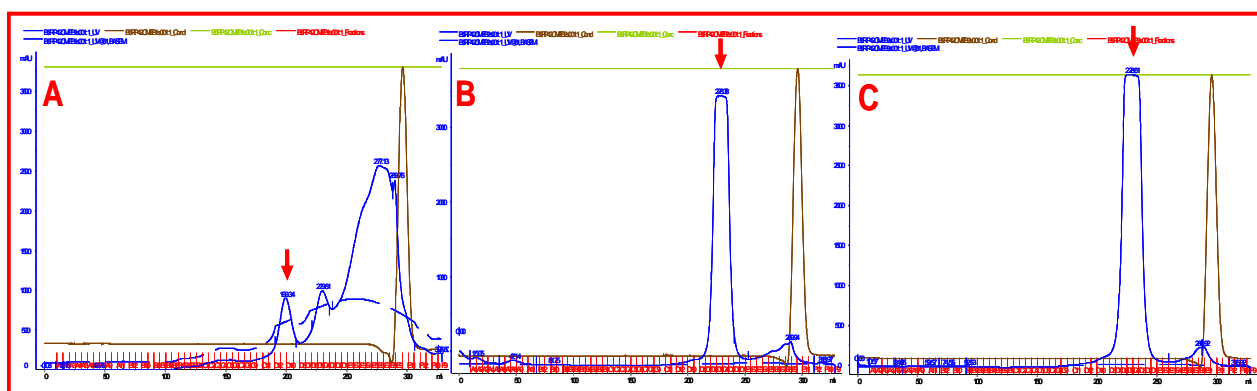


Figura III.16. Nivel de péptido producido por *P. olsonii* RP42C a la semana (A), dos semanas (B) y tres semanas (C) de incubación en MEB a 25°C.

La concentración de la proteína producida se estimó en función de la concentración de nitrógeno del compuesto purificado (véase apartado II.2.3.3).

A las dos semanas de incubación se duplica aproximadamente la concentración de la proteína con respecto a la obtenida a la semana de incubación (Tabla III.20). Al aumentar una semana más el periodo de incubación no se obtiene un incremento proporcional de la concentración del compuesto antifúngico (Tabla III.20).

Tabla III.20. Concentración del compuesto antifúngico purificado ($\mu\text{g N/ml}$) producido por *P. olsonii* RP42C según el tiempo de incubación.

TIEMPO de INCUBACIÓN	$\mu\text{g N/ml}$
1 semana	54
2 semanas	118
3 semanas	130

III.3.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, pH Y ACTIVIDAD DEL AGUA.

P. olsonii RP42C se desarrolló en todas las combinaciones de condiciones ensayadas a valores de a_w de 0,99 y 0,96, excepto en este último caso al incubar a pH 4,5 a temperaturas de 15 y 30°C (Tabla III.21).

Aunque en general se produjo un mayor crecimiento del moho al incubar a a_w de 0,96 (Tabla III.21), en ningún caso se detectó por cromatografía de filtración en gel el pico correspondiente a la proteína antifúngica. Por el contrario, sí pudo purificarse dicho compuesto a partir de los medios de cultivo con a_w 0,99 y pHs 4,5, 5,5 y 6,5, en los que se incubó el moho durante 15 días a temperaturas de 15, 20, 25 y 30°C (Tabla III.21).

La concentración de la proteína purificada obtenida fue similar en todos los casos, aunque generalmente se detectaron concentraciones más altas al incubar el microorganismo a pH 4,5 (Tabla III.21).

RESULTADOS

Tabla III.21. Efecto de las condiciones de incubación en el crecimiento de *P. olsonii* RP42C y en la producción de la proteína antifúngica a los 15 días de incubación.

CONDICIONES de INCUBACIÓN			PROTEÍNA PURIFICADA				
Aw	pH	T ^a	PESO (gr) MICELIO	Tiempo de Retención (ml)	Área (mAU/ml)	Absorbancia máxima (mAU)	µgN/ml
0,99	4,5	15°	0,7104	228,05	9700	2052	69
	5,5		1,2252	227,48	4418	967	46
	6,5		0,742	227,58	4603	1026	50
0,99	4,5	20°	1,3257	227,67	6633	1425	59
	5,5		1,3472	227,61	8935	1917	63
	6,5		1,177	227,94	6299	1332	51
0,99	4,5	25°	1,2683	227,7	6278	1357	74
	5,5		1,301	227,74	6442	1493	58
	6,5		1,2115	227,46	4582	979	50
0,99	4,5	30°	1,4455	227,68	7799	1690	68
	5,5		1,4393	228,27	2802	650	41
	6,5		1,3169	228,52	2150	466	43
0,96	4,5	15°	- ^a				
	5,5		0,8961	nd ^b			
	6,5		1,2492	nd			
0,96	4,5	20°	3,3923	nd			
	5,5		3,9864	nd			
	6,5		3,5103	nd			
0,96	4,5	25°	2,751	nd			
	5,5		4,7214	nd			
	6,5		3,974	nd			
0,96	4,5	30°	-				
	5,5		3,6509	nd			
	6,5		4,1463	nd			

^a -: no se detecta crecimiento de *P. olsonii* RP42C.

^b nd: no se detecta el pico correspondiente a la proteína antifúngica purificada mediante cromatografía de filtración en gel.

III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDA POR *P. olsonii* RP42C.

III.4.1. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA.

La proteína producida por *P. olsonii* RP42C, una vez purificada por cromatografía de filtración en gel, se analizó mediante electroforesis capilar en zona para obtener el espectro de absorbancia de 190 a 300 nm (véase apartado II.2.4.1).

A las tres longitudes de onda analizadas se detectó un único pico con un tiempo de retención de 9,1 min (Figura III.17).

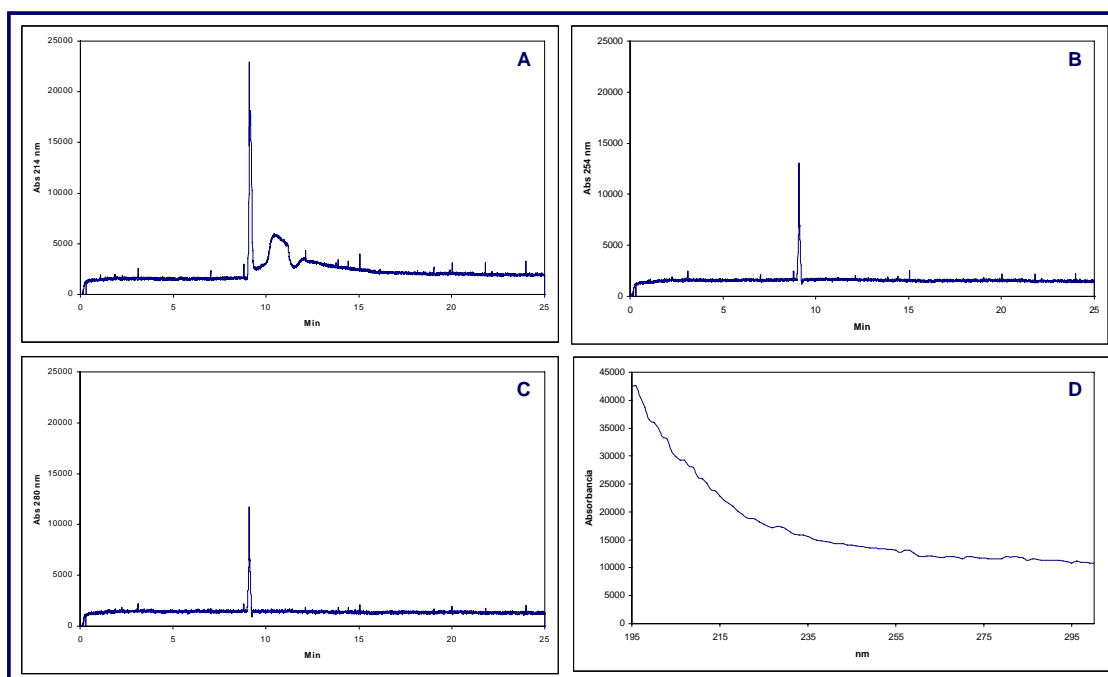


Figura III.17. Electroferogramas de la proteína antifúngica obtenidos por electroforesis capilar en zona a longitudes de onda de 214 (A), 254 (B) y 280 nm (C), y espectro de absorbancia de 190 a 300 nm (D).

Tabla III.22. Absorbancia de la proteína antifúngica a diferentes longitudes de onda recogidas en el análisis por electroforesis capilar en zona.

LONGITUD DE ONDA	MI GRACI ÓN (min)	ABSORBANCIA (mAU)
214 nm	9,1	22.911
254 nm	9,1	13.071
280 nm	9,1	11.716

El espectro de la proteína en tampón de carrera mostró un aumento continuo de absorbancia al aproximarse a los 190 nm (Figura III.17).

III.4.2. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ISOELECTROENFOQUE.

Para determinar el punto isoelectrico de la proteína antifúngica se realizó un análisis mediante electroforesis capilar de isoelectroenfoque (véase apartado II.2.4.2). Se utilizó un patrón comercial constituido por una mezcla de péptido CCK, β -lactoglobulina, anhidrasa carbónica II y ribonucleasa A, con puntos isoelectricos de 2,75, 5,1, 5,9 y 9,45 respectivamente (Figura III.18).

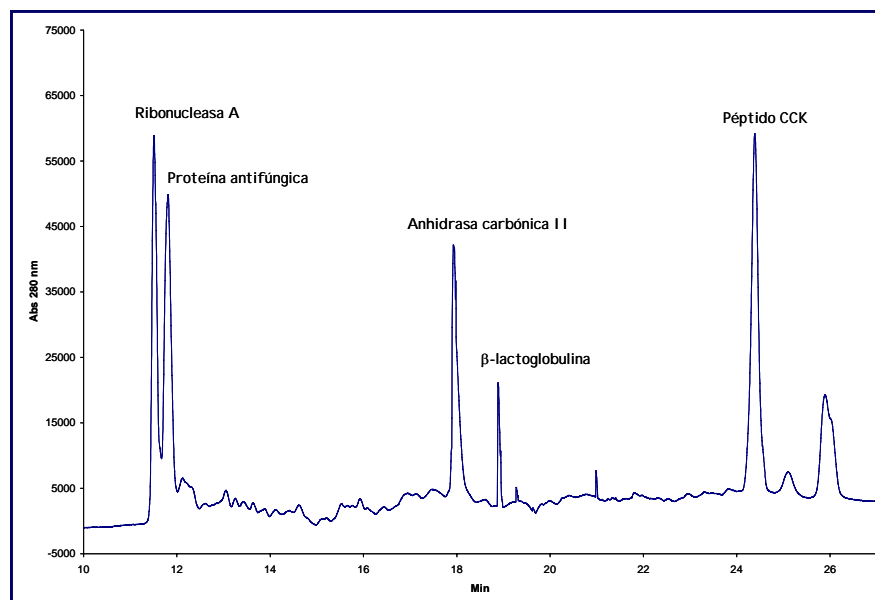


Figura III.18. Electroferograma de la proteína antifúngica junto al patrón comercial a 280 nm obtenido mediante electroforesis capilar de isoelectroenfoque.

Se calculó la ecuación de la recta con los puntos isoelectricos y la migración de las proteínas patrón, de la que se extrapoló el punto isoelectrico de la proteína antifúngica (Tabla III.23).

Tabla III.23. Datos utilizados para la estimación del punto isoelectrico de la proteína con actividad antifúngica.

PROTEÍNA	PUNTO ISOELÉCTRICO	MIGRACIÓN (min)
Ribonucleasa A	9,45	11,5
Anhidrasa carbónica II	5,9	18
β -lactoglobulina	5,1	9
Péptido CCK	2,75	24,5
Proteína antifúngica	-	11,7

El punto isoelectrico estimado para la proteína con actividad antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C es 9,22.

III.4.3. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA MEDIANTE HPLC-UV.

De forma previa al análisis mediante espectrometría de masas, la fracción activa obtenida por cromatografía de filtración en gel se analizó mediante HPLC-UV para confirmar su pureza, detectándose a 214 nm de longitud de onda un único pico a los 60,30 min de carrera (Figura III.19).

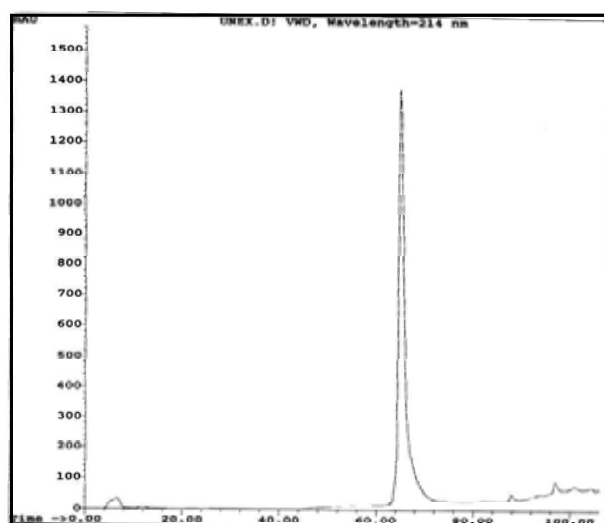


Figura III.19. Cromatografía líquida de alta resolución en columna de fase reversa de la fracción activa obtenida por cromatografía de filtración en gel a partir de *P. olsonii* RP42C.

III.4.4. ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Para caracterizar la proteína activa en cuanto a su pureza y peso molecular, la fracción purificada en columnas de filtración en gel se envió para su análisis a laboratorios especializados en espectrometría de masas para proteínas.

ANÁLISIS POR MALDI-TOF.

En el espectro obtenido mediante el análisis por espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz asociada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), se puede observar un pico de mayor intensidad a 6488 Da, otro mucho más pequeño a 3242 Da, que es aproximadamente la mitad de éste, y un pico aun menor a 12980 Da, que es el doble y el cuádruple respectivamente de los otros dos (Figura III.20).

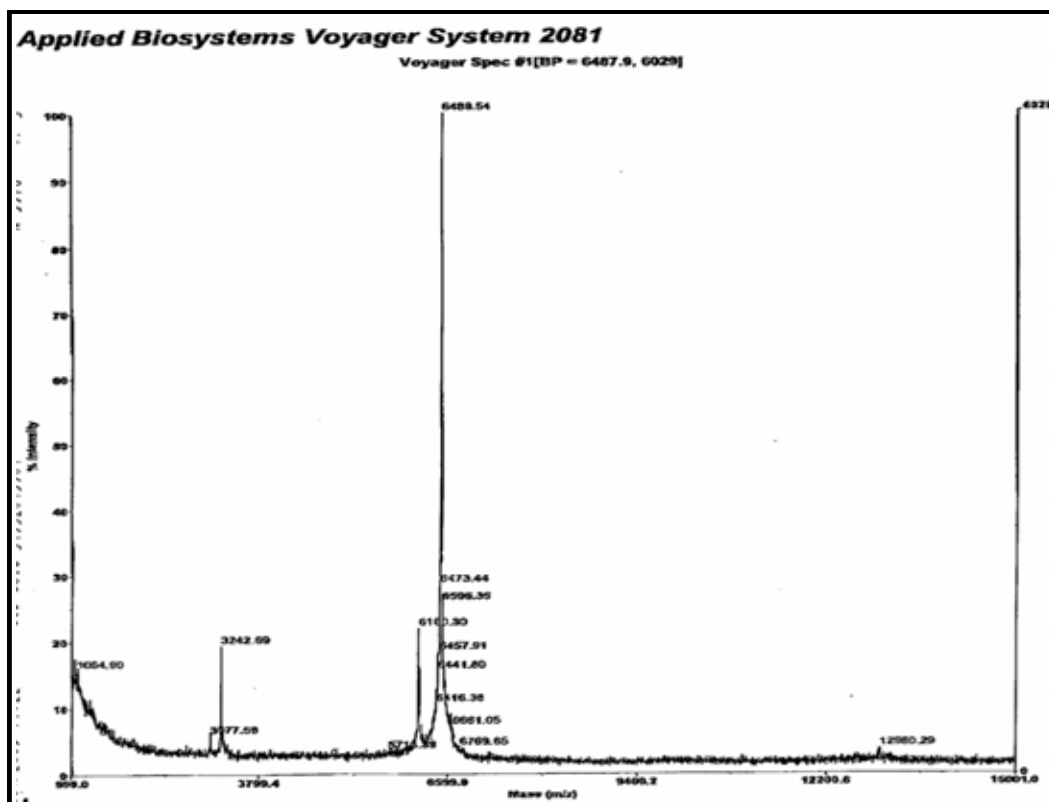


Figura III.20. Espectro MALDI-TOF de la proteína antifúngica obtenido en el Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC, Barcelona.

En el Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid, se realizó una digestión de la proteína antifúngica con tripsina de forma previa al análisis por MALDI-TOF. Los espectros de fragmentación obtenidos no resultaron ser lo suficientemente buenos para su análisis por MALDI-TOF y posterior búsqueda en bases de datos. No obstante, las diferentes masas que se consiguieron detectar parecían tener el mismo extremo: Thr-Leu-Thr-Pro-Val. Puesto que el paso previo al análisis fue la digestión con tripsina y ésta corta detrás de arginina o lisina, el extremo de cinco aminoácidos común a todas las masas detectadas tras la digestión debe corresponder al extremo carboxilo terminal de la proteína, ya que si no fuera así su último residuo debería ser tripsina o lisina.

ANÁLISIS POR SELDI-TOF.

Los espectros obtenidos mediante el análisis por espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser intensificada por superficie asociada a un analizador de tiempo de vuelo (SELDI-TOF) con las dos matrices utilizadas (CHCA y SPA) son muy similares (Figura III.21). Se observan picos cuyas masas están relacionadas entre sí una cantidad fija que parece estar alrededor de 3250.

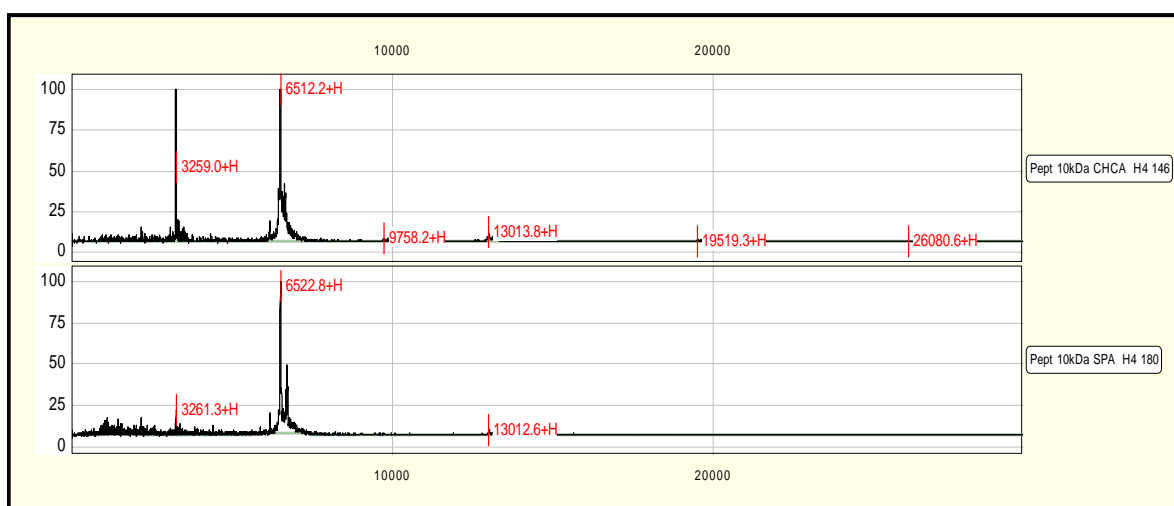


Figura III.21. Espectros obtenidos con las matrices CHCA y SPA (Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, Madrid).

III.4.5. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS N- TERMINAL DE LA PROTEÍNA.

Para la determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína, ésta se transfirió de un gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF y se tiñó con azul de Comassie (Figura III.22). Las bandas se secuenciaron por degradación de Edman en la Plataforma de Proteómica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. Se obtuvieron los primeros 12 aminoácidos:

Leu-Ser-Leu-Phe-Gly-Gly-Glu-Lys-Ser-Leu-Lys-His
(LSLFGGEKSLKH)

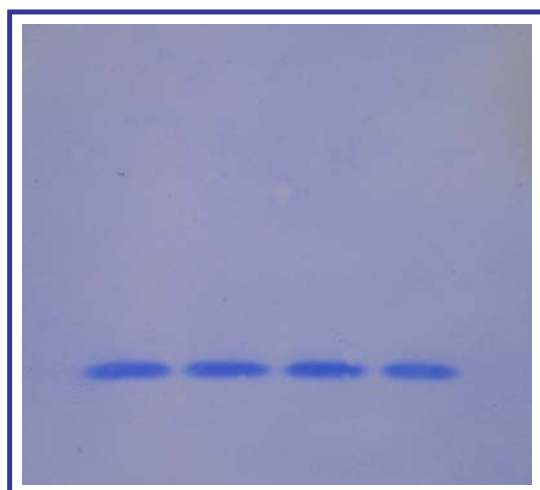


Figura III.22. Proteína activa (2 μ l/banda) de *P. olsonii* RP42C transferida a la membrana de PVDF y teñida con azul de Comassie.

Posteriormente se realizó una búsqueda de homología por BLAST (Altschul y col., 1990), pero no se encontró homología completa con esta secuencia.

III.4.6. CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA EN PLACAS MULTIPOCILLO.

Para evaluar el espectro de inhibición y la concentración mínima activa de la proteína purificada se ensayaron diferentes concentraciones de la proteína (60 a 0,47 $\mu\text{gN/ml}$) frente a 14 cepas de referencia (véase Tabla II.4) cultivándolas en placas multipocillo (véase apartado II.2.1.4).

En la Tabla III.24 se detallan los resultados obtenidos al comparar el crecimiento de cada cepa de referencia en ausencia de la proteína con el desarrollo de las mismas en presencia de diferentes concentraciones de la proteína activa (60 a 0,47 $\mu\text{gN/ml}$). El estudio estadístico se realizó con los incrementos en la absorbancia registrados cada 24 h a lo largo de 96 h.

Los resultados revelaron diferentes patrones de sensibilidad por parte de las cepas de referencia en función tanto de la concentración de proteína ensayada como del tiempo de incubación. Concretamente, en algunos casos la actividad de la proteína no se apreció hasta el final del periodo de incubación, y en otros, el tiempo de incubación derivó en la pérdida de dicha actividad (Tabla III.24).

La proteína resultó muy activa ($p < 0,001$) frente a las cepas de *A. niger* An261 y *A. flavus* Af2687 prácticamente a todas las concentraciones ensayadas y a lo largo de todo el periodo de incubación. En el caso de *P. chrysogenum* Pg222 se observó un efecto similar, aunque a concentraciones inferiores a 30 $\mu\text{gN/ml}$ las diferencias significativas ($p < 0,001$) sólo se apreciaron a partir de las 48 h de incubación (Tabla III.24).

En el caso de *P. solitum* Ps321 y *P. griseofulvum* Pg2919, se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,001$) a lo largo de las 96 h de incubación excepto a concentraciones de proteína de 0,47y 0,94 $\mu\text{gN/ml}$ respectivamente (Tabla III.24).

La proteína también resultó activa frente a *A. versicolor* Av2664, *A. parasiticus* Ap2682 y *P. echinulatum* Pe321 ($p < 0,001$), aunque el efecto se fue perdiendo por una parte conforme aumentaba el tiempo de incubación, y por otra conforme disminuía la concentración de proteína ensayada (Tabla III.24).

Por otro lado, las cepas de *P. commune* Pc332, *P. restrictum* Pr341 y *P. nalgiovense* Pj261, resultaron muy sensibles ($p < 0,001$) a todas las concentraciones de proteína ensayadas, si bien el efecto sólo se observó a partir de las 48 h de incubación, o de las 72 h en el caso de *P. nalgiovense* Pj261 (Tabla III.24).

Finalmente, apenas se observaron diferencias significativas en el desarrollo de *P. commune* Pc131, *P. polonicum* Pp51 y *P. aurantiogriseum* Pa2918 a las concentraciones de proteína ensayadas, salvo un crecimiento ligeramente menor a las 72 h de incubación con las concentraciones de proteína más altas (Tabla III.24).

Tabla III.24. Efecto de diferentes concentraciones de la proteína producida por *P. olsonii* RP42C sobre el crecimiento de las cepas de referencia.

	Tiempo incubac.	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (µgN/ml)							
		60	30	15	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47
Pe321	24 h	++ ^a	+++	++	- ^b	-	-	-	-
	48 h	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	72 h	++	++	++	++	++	++	+++	+
	96 h	+	+	++	++	+	++	++	-
Ps321	24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Pc332	24 h	-	++	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	+	+	+	+	+	+
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
An261	24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pr341	24 h	-	+++	+++	++	+++	++	+	-
	48 h	-	-	-	-	+	+	-	-
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pc131	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	+	++	++	++	+	-	-	-
	96 h	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp51	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	96 h	-	-	-	-	-	-	-	-

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

RESULTADOS

Tabla III.24 (continuación). Efecto de diferentes concentraciones de la proteína producida por *P. olsonii* RP42C sobre el crecimiento de las cepas de referencia.

	Tiempo incubac.	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (µgN/ml)							
		60	30	15	7,5	3,75	1,88	0,94	0,47
Af2687	24 h	+++ ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pg2919	24 h	+++	+++	+++	+++	+++	++	- ^b	-
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Av2664	24 h	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	72 h	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	96 h	+++	+++	+	+	-	-	-	-
Pa2918	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	++	++	+	+	-	-	-	-
	96 h	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap2682	24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
	48 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	72 h	++	+++	+++	++	+	-	-	-
	96 h	-	++	++	+	-	-	-	-
Pg222	24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	48 h	+++	+++	++	+	+	++	++	+
	72 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pj261	24 h	-	+++	+++	++	+++	++	+	+
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	++	++	+++	+++	++	++	++
	96 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

^a diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^b - no hay diferencias significativas con respecto al control.

III.4.7. CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA EN MEDIO SÓLIDO.

El extracto purificado inhibió el desarrollo de *P. commune* Pc332, *A. niger* An261, *A. flavus* Af2687, *A. versicolor* Av2664 y *P. chrysogenum* Pg222 en placas de agar (Figura III.23). Sin embargo, en las placas inoculadas con *P. commune* Pc131 y *P. aurantiogriseum* Pa2918 no se observaron cambios.

Tras 72 h de incubación desaparece el halo de inhibición de la placa inoculada con *A. niger* An261, y tras 9 días el de la placa inoculada con *P. commune* Pc332. Por el contrario, en el caso de las placas inoculadas con *A. flavus* Af2687, *A. versicolor* Av2664 y *P. chrysogenum* Pg222, los halos permanecen visibles incluso después de 17 días.

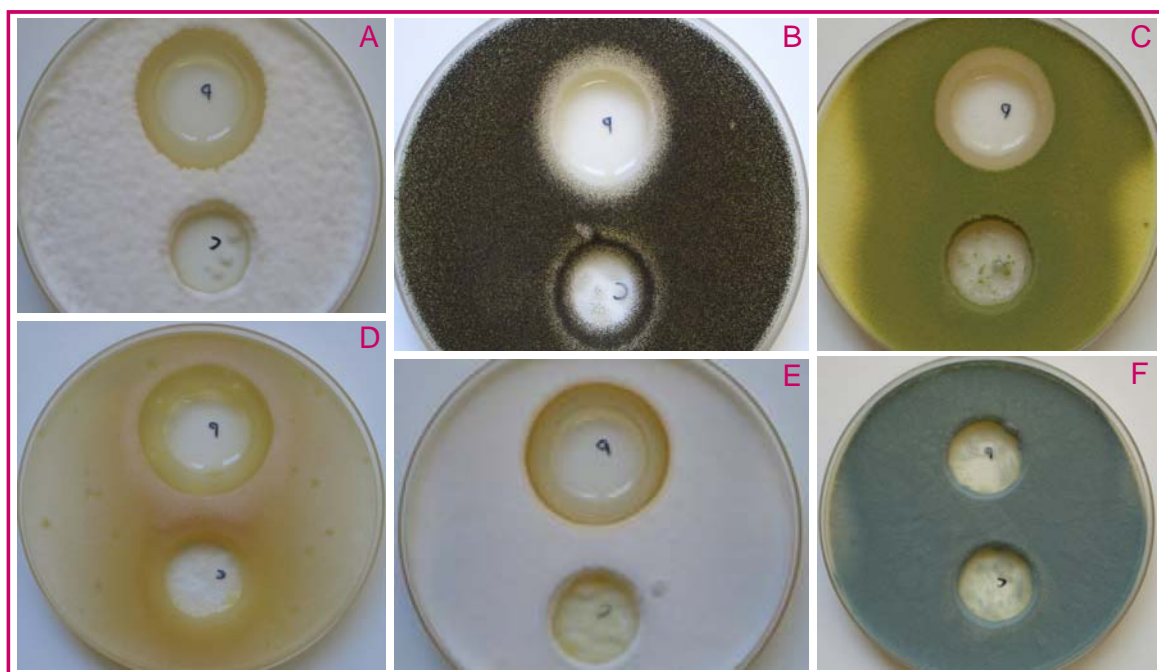


Figura III.23. Halos de inhibición producidos por la proteína purificada (130 μ g de N/ml) en placas inoculadas con *P. commune* Pc332 (A), *A. niger* An261 (B), *A. flavus* Af2687 (C), *A. versicolor* Av2664 (D), *P. chrysogenum* Pg222 (E) y *P. commune* Pc131 (F) tras 48 h de incubación.

III.4.8. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PROTEÍNA AL TRATAMIENTO CON DIFERENTES ENZIMAS.

Para evaluar la sensibilidad de la proteína activa frente a distintos enzimas, se llevó a cabo un ensayo de inhibición en placas multipocillo con algunas de las cepas de referencia (véase apartado II.2.4.7), que se seleccionaron en función de los resultados obtenidos al caracterizar la actividad inhibidora (véase apartado III.4.5). Se utilizaron las cepas de *A. niger* An261 y *A. flavus* Af2687 porque fueron las que mostraron mayor sensibilidad a todas las concentraciones de proteína ensayadas y a lo largo de todo el periodo de incubación (Tabla III.24). También se seleccionó *P. restrictum* Pr341, que resultó sensible a todas las concentraciones de proteína, aunque el efecto sólo se observó a partir de las 48 h de incubación (Tabla III.24). Además, se utilizó la cepa de *P. griseofulvum* Pg2919, que redujo su crecimiento a lo largo de las 96 h de incubación pero sólo en presencia de concentraciones de proteína superiores a 0,94 µgN/ml (Tabla III.24).

En primer lugar se comprobó que ni los tampones ni los enzimas ensayados modificaban el crecimiento de los mohos indicadores de la inhibición de manera significativa. Sólo en el caso de la lisozima se produjo un retraso ($p < 0,05$) en el crecimiento de *P. restrictum* a las 96 h de incubación (Figura III.24).

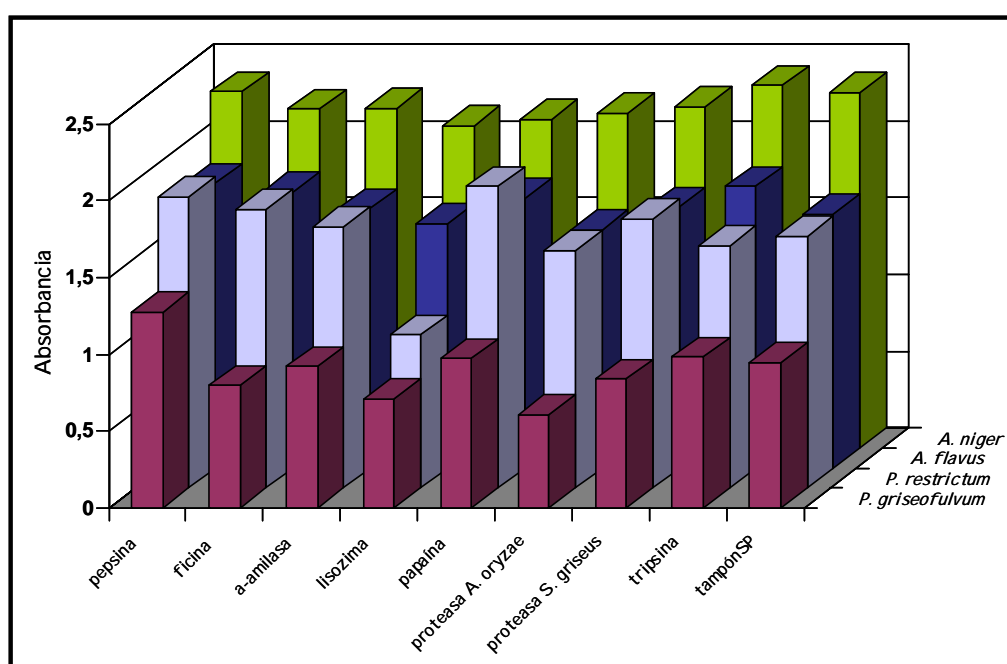


Figura III.24. Crecimiento de los mohos indicadores en presencia de los diferentes enzimas utilizados y sin enzimas ni proteína antifúngica (en tampón SP) a las 96 h de incubación.

Por el contrario, las diferentes concentraciones de proteína ensayadas redujeron significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento de las diferentes cepas de referencia (Figura III.25).

El extracto purificado se trató primero con enzimas de actividad diversa en las condiciones de pH y temperatura óptimas para cada enzima, y posteriormente se evaluó la actividad inhibidora en las placas multipocillo (véase apartado II.2.4.7).

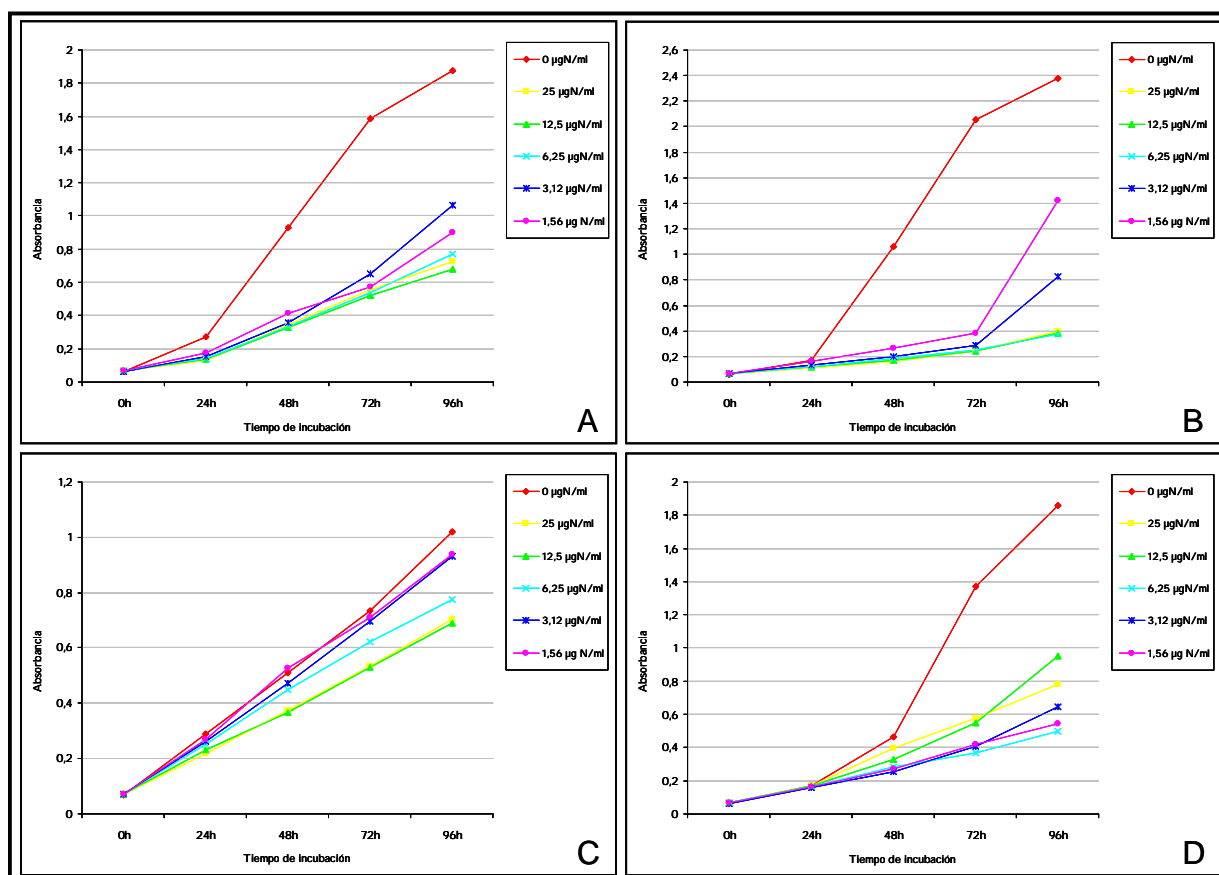


Figura III.25. Crecimiento de *A. flavus* Af2687 (A), *A. niger* An261 (B), *P. griseofulvum* Pg2919 (C) y *P. restrictum* Pr341 (D) en presencia de diferentes concentraciones de la proteína antifúngica (25 µgN/ml a 0 µgN/ml) a lo largo de 96 h de incubación.

En la Tabla III.25 se detalla el efecto del tratamiento con diferentes enzimas en la actividad inhibidora de distintas concentraciones de la proteína antifúngica (25 µgN/ml a 1,56 µgN/ml) frente a *A. flavus* Af2687, *A. niger* An261, *P. griseofulvum* Pg2919 y *P. restrictum* Pr341.

En general, el tratamiento con enzimas influyó más en la actividad de la proteína sobre las cepas de *Aspergillus* ensayadas que sobre las de *Penicillium* (Tabla III.25).

Tabla III.25. Pérdida de actividad de la proteína antifúngica frente a las cepas de referencia tras el tratamiento con diferentes enzimas (absorbancia debida al desarrollo de las cepas de referencia en presencia de la proteína sin tratar y tratada con los distintos enzimas a las 96 h de incubación).

CEPAS de REFERENCIA	ENZIMAS (0,5 mg/ml)	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (µgN/ml)				
		25	12,5	6,25	3,12	1,56
<i>A. flavus</i> Af2687	Pepsina	0,79	0,93	1,09	1,25	1,76
	Ficina	1,07	1,40	1,67	1,69	1,80
	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>	0,96	0,88	1,33	1,52	1,67
	Lisozima	0,70	1,15	1,09	1,15	1,44
	Papaína	0,66	0,98	1,28	1,53	1,73
	Proteasa Tipo II de <i>A. oryzae</i>	1,28	1,23	1,44	1,61	1,63
	Proteasa de <i>S. griseus</i>	1,86	1,76	1,69	1,73	1,78
	Tripsina	1,50	1,54	1,65	1,69	1,75
	Proteína sin tratar	0,61	0,66	0,71	0,95	0,86
<i>A. niger</i> An261	Pepsina	0,50	0,49	0,64	1,31	1,89
	Ficina	0,46	0,93	1,67	1,89	1,95
	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>	0,84	1,05	1,79	1,93	2,05
	Lisozima	1,23	0,86	1,85	1,99	2,06
	Papaína	0,53	0,74	2,04	1,86	1,90
	Proteasa Tipo II de <i>A. oryzae</i>	1,77	1,93	1,91	2,06	2,17
	Proteasa de <i>S. griseus</i>	2,31	2,29	2,27	2,19	2,24
	Tripsina	1,70	1,68	1,78	1,95	2,25
	Proteína sin tratar	0,31	0,32	0,33	0,76	1,35

Los colores indican diferencias significativas ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) y ($p < 0,001$) respectivamente, con respecto a la inhibición producida por la proteína sin tratar con enzimas.

La proteasa de *S. griseus* fue la más activa frente a la proteína en todos los casos. De hecho, ocasionó la pérdida de actividad frente a las cuatro cepas ensayadas incluso con la concentración de proteína más alta (Tabla III.25).

Tabla III.25. (continuación). Pérdida de actividad de la proteína antifúngica frente a las cepas de referencia tras el tratamiento con diferentes enzimas (absorbancia debida al desarrollo de las cepas de referencia en presencia de la proteína sin tratar y tratada con los distintos enzimas a las 96 h de incubación).

CEPAS de REFERENCIA	ENZIMAS (0,5 mg/ml)	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (µgN/ml)				
		25	12,5	6,25	3,12	1,56
<i>P. griseofulvum</i> Pg2919	Pepsina	0,67	0,74	0,81	0,89	1,12
	Ficina	0,94	0,96	0,88	1,05	0,95
	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>	0,89	0,76	0,82	1,11	0,88
	Lisozima	0,83	0,78	0,77	0,81	0,86
	Papaína	0,79	0,88	0,82	0,83	1,00
	Proteasa Tipo II de <i>A. oryzae</i>	0,78	0,70	0,79	0,74	0,62
	Proteasa de <i>S. griseus</i>	1,39	1,22	1,13	1,11	1,07
	Tripsina	0,88	0,94	0,81	0,90	0,84
	Proteína sin tratar	0,66	0,62	0,70	0,86	0,87
<i>P. restrictum</i> Pr341	Pepsina	1,07	1,03	1,01	0,96	1,37
	Ficina	0,52	0,41	0,54	0,95	1,24
	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>	0,53	0,95	0,91	1,24	0,88
	Lisozima	0,69	1,08	0,60	0,75	0,84
	Papaína	0,58	0,67	0,88	1,20	1,41
	Proteasa Tipo II de <i>A. oryzae</i>	1,11	0,87	1,25	1,34	0,94
	Proteasa de <i>S. griseus</i>	1,88	1,88	1,72	1,83	1,81
	Tripsina	0,83	1,39	1,14	1,21	1,45
	Proteína sin tratar	0,72	0,88	0,43	0,58	0,48

Los colores indican diferencias significativas (p<0,05), (p<0,01) y (p<0,001) respectivamente, con respecto a la inhibición producida por la proteína sin tratar con enzimas.

La tripsina y la proteasa de *A. oryzae* también provocaron una pérdida de actividad en la proteína que incluso a las concentraciones más altas alcanzaba

significación estadística ($p < 0,05$), pero exclusivamente para las cepas de referencia del género *Aspergillus*. La actividad frente a las cepas de *Penicillium* utilizadas en este ensayo sólo se ve ligeramente afectada por el tratamiento con tripsina, mientras que la proteasa de *A. oryzae* no tuvo un efecto apreciable (Tabla III.25).

La ficina, la papaína y la lisozima originaron una pérdida significativa de actividad ($p < 0,001$) frente a las cepas de *Aspergillus* a concentraciones intermedias de proteína. Sin embargo, frente a las cepas de *Penicillium* sólo se observó una pérdida de actividad de forma esporádica y con menor significación estadística, llegando a no apreciarse efecto alguno con la lisozima (Tabla III.25).

La pepsina sólo mostró un efecto importante con bajas concentraciones de la proteína, observándose su efecto fundamentalmente frente a *P. griseofulvum* Pg2919 y *A. flavus* Af2687 (Tabla III.25).

Por último, la α -amilasa originó una pérdida de actividad a concentraciones intermedias de la proteína, pero este efecto sólo se apreció de forma clara frente a las cepas de *Aspergillus* ensayadas (Tabla III.25).

En la Figura III.26 se representa el crecimiento de las cepas de referencia en presencia de la proteína (1,56 $\mu\text{gN/ml}$) tras ser tratada con los diferentes enzimas a lo largo de 96 h de incubación. Se puede apreciar que el tratamiento con cualquiera de los enzimas permite un desarrollo más rápido de *A. flavus* Af2687 y *A. niger* An261, mientras que en el caso de *P. restrictum* Pr341 las diferencias con respecto al control sólo son evidentes tras tratar la proteína con proteasa de *S. griseus*, tripsina, pepsina y papaína incluso a las 72 h de incubación (Figura III.26). Por otro lado, el desarrollo de *P. griseofulvum* Pg2919 muestra pocas diferencias claras, que se limitan a un desarrollo ligeramente superior al final del periodo de incubación al tratar la proteína con pepsina, proteasa de *S. griseus*, papaína y ficina (Figura III.26).

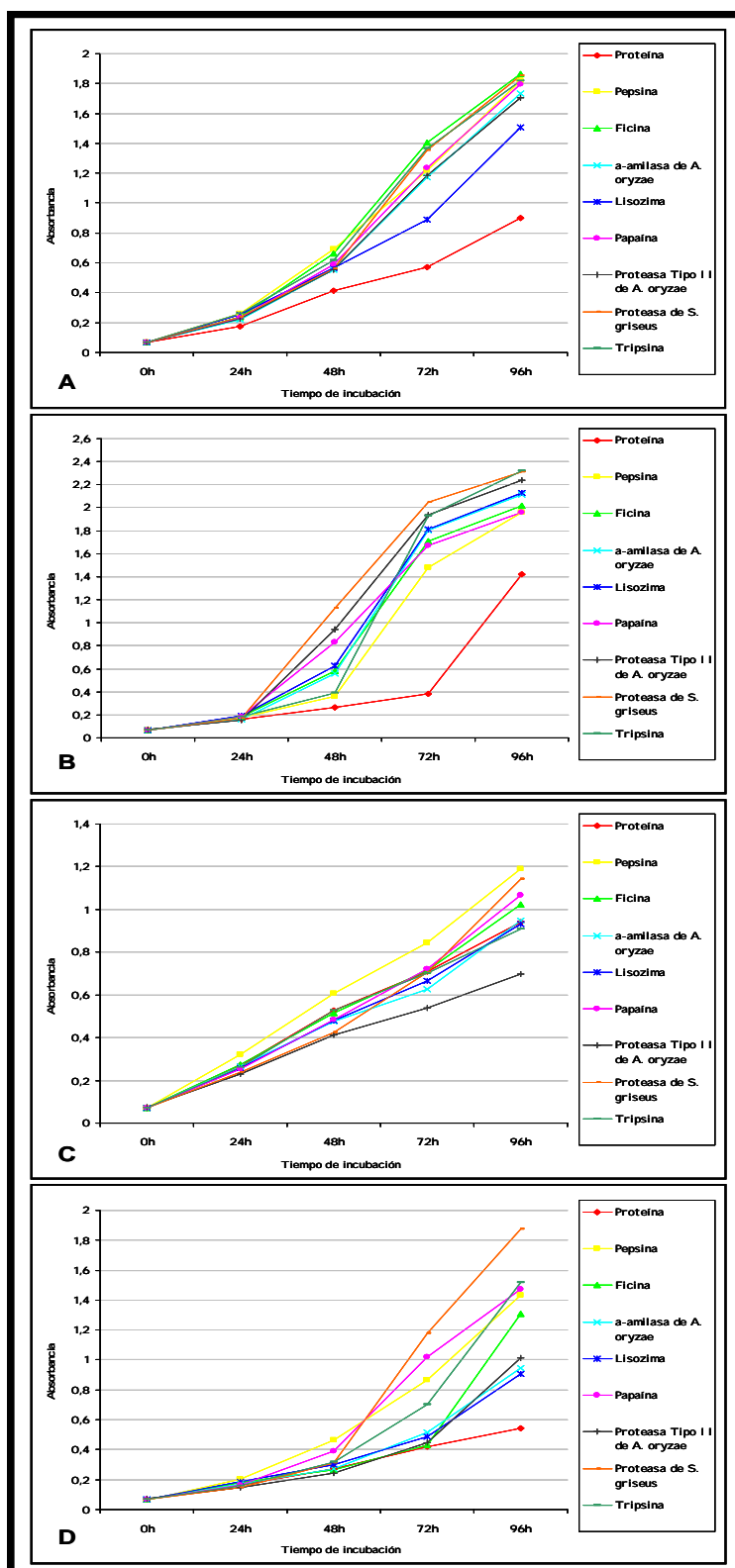


Figura III.26. Efecto del tratamiento con diversos enzimas sobre la actividad de la proteína antifúngica (1,56 µgN/ml) frente a *A. flavus* Af2687 (A), *A. niger* An261 (B), *P. griseofulvum* Pg2919 (C) y *P. restrictum* Pr341 (D).

III.5. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA.

La metodología utilizada se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN extraído del moho (véase apartado II.2.5). Se utilizaron cebadores degenerados diseñados a partir tanto de la secuencia amino terminal obtenida por degradación de Edman, como de la secuencia carboxilo terminal deducida de los resultados obtenidos mediante degradación del péptido con tripsina y su posterior análisis por MALDI-TOF.

Se utilizó un primer grupo de cebadores degenerados, PepFor y AnF, para amplificar por PCR los fragmentos de ADN. Aunque se realizaron modificaciones tanto en la temperatura de hibridación como en las de extensión y extensión final y se emplearon diferentes concentraciones de MgCl₂ y de ADN (véase apartado II.2.5.2; Tabla II.7), en ningún caso se obtuvieron bandas de amplificación en las condiciones ensayadas.

En las reacciones de PCR que se realizaron a continuación se empleó otro grupo de cebadores compuesto por dos cebadores directos derivados de la secuencia del PepFor utilizado previamente, y como cebador reverso se utilizó el mismo AnF del grupo anterior. En este caso se obtuvieron buenos resultados de amplificación tanto a 50 como a 55°C de temperatura de hibridación.

El resultado obtenido con los cebadores PepFor1+AnF y PepFor2+AnF se muestra en la Figura III.27.

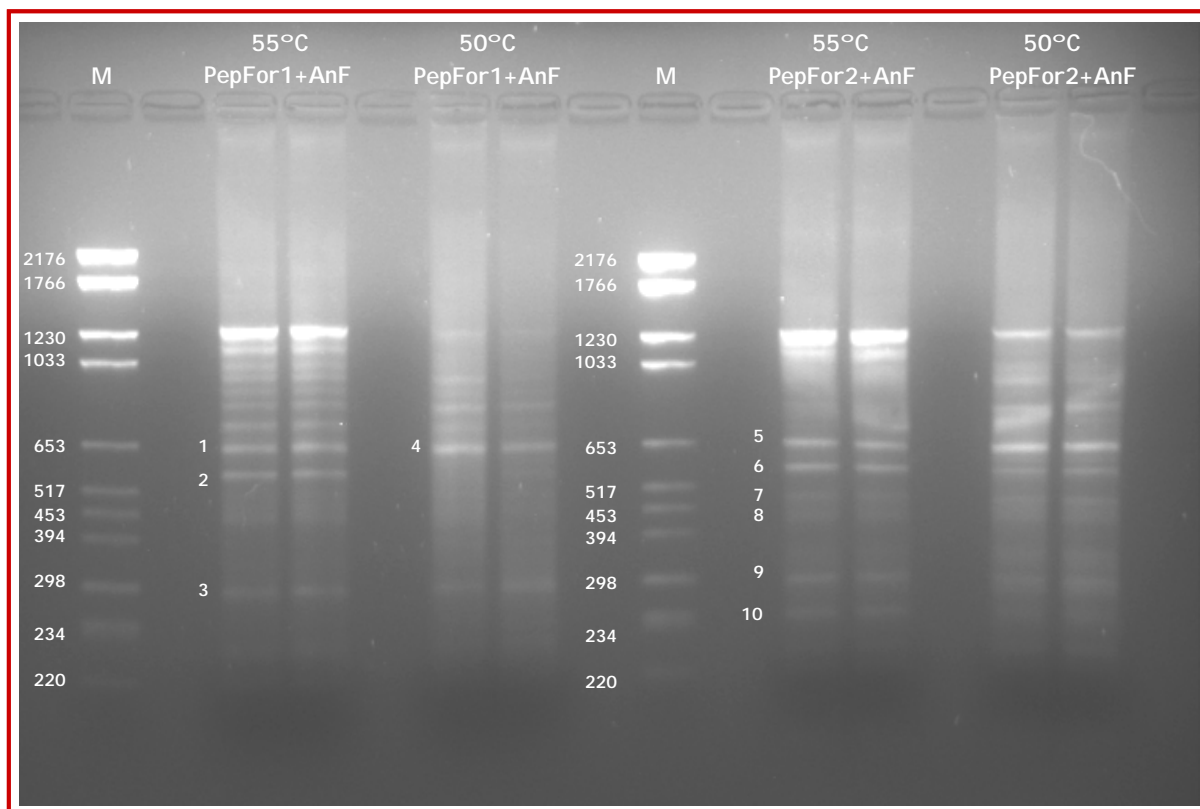


Figura III.27. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las PCRs realizadas con los cebadores PepFor1+AnF y PepFor2+AnF a 50 y 55°C de temperatura de hibridación. M, marcador de pesos moleculares. Los números (1 al 10) corresponden a las bandas que se purificaron para su posterior inserción en el vector.

Con los cebadores PepFor1 y AnF se obtuvo un mayor número de bandas a una temperatura de hibridación de 55°C. En el caso de los cebadores PepFor2 y AnF se obtuvieron resultados muy similares independientemente de la temperatura de hibridación utilizada. Se seleccionaron 10 de los fragmentos de ADN amplificados tanto con los cebadores PepFor1+AnF como con PepFor2+AnF (Figura III.28), en función del tamaño esperado según la longitud del péptido. A continuación, los fragmentos fueron purificados del gel (véase apartado II.2.5.3) e insertados en el vector pCR 2.1 (véase apartado II.2.5.4). Posteriormente se transformaron las células competentes de *E. coli* (véase apartado II.2.5.5). Los transformantes obtenidos formaron colonias blancas en las placas de agar LB con ampicilina y X-gal (Figura III.28).

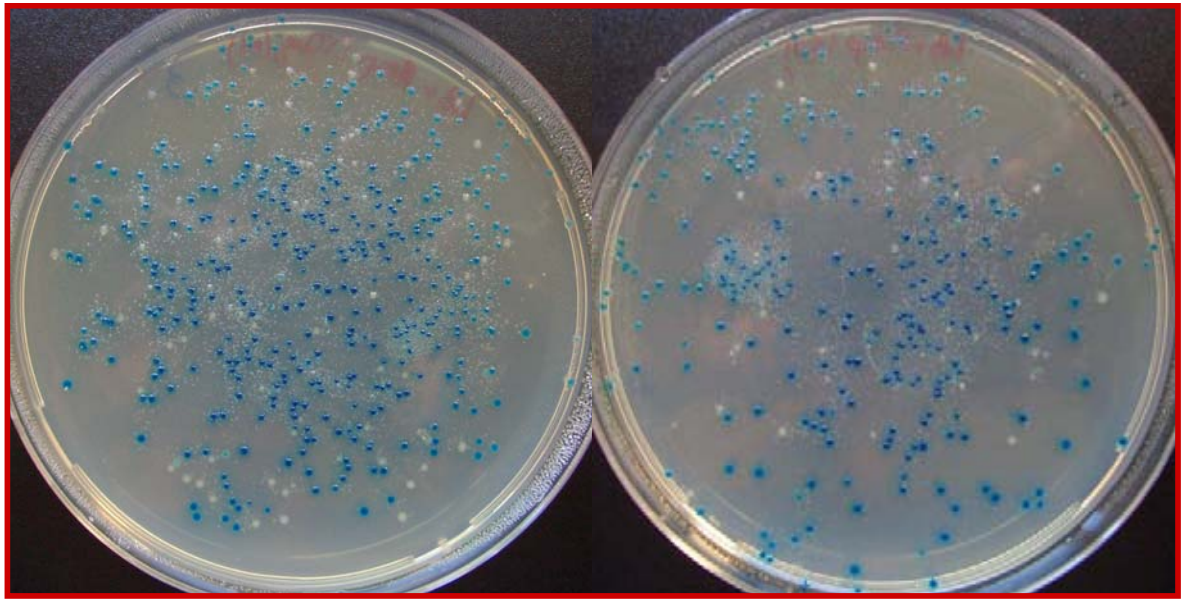


Figura III.28. Placas de LB con ampicilina y X-gal. Las colonias blancas son las células de *E. coli* en las que se ha insertado el vector pCR 2.1.

Para comprobar que realmente las colonias seleccionadas tenían insertado el vector, se extrajeron los plásmidos y se sometieron a una digestión con el enzima de restricción EcoRI (véase apartado II.2.5.6). Los plásmidos con inserto se visualizaron en los geles de agarosa como dos bandas bien definidas: una de 3,9 kb correspondiente al vector, y otra de diferente peso molecular correspondiente en cada caso a uno de los fragmentos de ADN purificados del gel e insertados en el plásmido (Figura III.29).

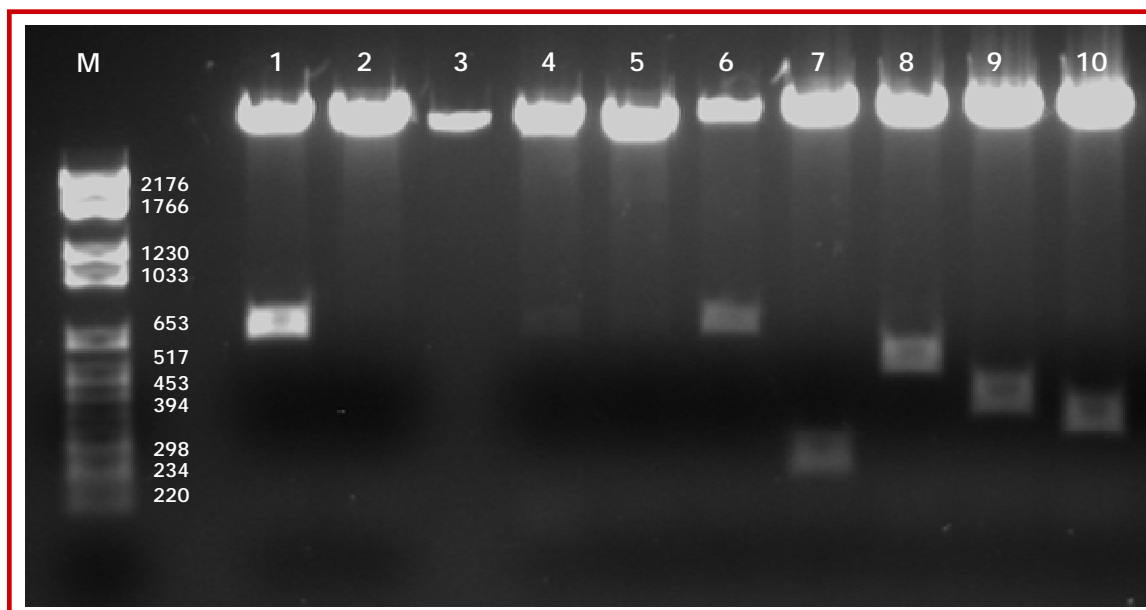


Figura III.29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos tras la digestión con el enzima de restricción EcoRI. M, marcador de pesos moleculares. Líneas 1-10, distintos plásmidos con y sin inserto.

A partir de los 10 fragmentos de ADN seleccionados, se obtuvieron 8 transformantes positivos con inserto que fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de ADN SECUGEN S.L. utilizando los cebadores f17 y r19 del vector pCR 2.1. La secuenciación reveló que 3 de los fragmentos de ADN correspondían a secuencias amplificadas por un único cebador. El resultado para las otras 5 secuencias obtenidas se detalla a continuación:

INSERTO DE 664 pb.

```

1 TTGTGGTTTT TTGGGGGTAT GAATAGTATC GACCGGGGCC TCAAACACGT GGGCACCGTC
61 GGTCGGCAGT TCTGGCTTAT AATACCCAAG CTCAGGCTAA GAACCGTATC CTATATTTTG
121 GGTTGTTGCT TTTCGTTGTC AAGTTTACTA GATAGCTGCT AGCGTAATGA AGGCAAAGGC
181 AACCACGGCT CCAACTACAG GACCAGCAAT CCATGCTTTC GAAGATTTTC CATCAGTCTC
241 GGTGTTACTG GAAGATGTAG CCGCGGGCGA TAATATAGAC GATGGCGCGG TAGATGCTGT
301 CCAGTACTAG TAGCGGTTCCG CGTTGCAGTG TCTGACGGTT GCCAACGAAT GAAGATGGCC
361 TTAGATTAA TGCCGTTAGC AGTCCTTATA CTAGATGTGG TGCCGGCTTT TGTGAATTTT
421 TATAGGTGAT TAAGGTCGGT ATTAGTCGAG GTGCACCGGT TAGCTGAGTA CCAAACATG
481 CCATTTTCGG TTTGGGCACT ATAGCCTCTG GTCAAACGAT TCGCAGTCG TAAGTAGATT
541 GTCAGAGGG CATATAGGGG TTAAACTCAC TCTGGACAAC AGGTCGCCCC GGTCCTCGACA
601 TTATCGTTAC TAGAATCAAC CGATTGGTCT GCTGTCCAAT AGCCCGATGG ACCCTCACAC
661 CGTG

```

INSERTO DE 662 pb.

```

1 GAGAAGTGGT TTAAGCAGGG AACTGATTCC ACAGCAACCG GTAAGAACGA CAAGGTCAGT
61 AAGGTTACTG CAAACAGAGC TCCTTCTGCA TCGGCAACGC AGGAAGGTGG TGCTTACGCT
121 GTGACTGTCA GCTCGCCAGC TACTGAGCGC TTGCTCGCTG GATCTCTACT GCTGTCTGGC
181 CTGCTGGGTG TCGTTGCGAT CTGGCTTTGA TTTTGTTTTG TTCTTACTCG TCAATTGACG
241 ATTGCGGCTC AAGCCATTCA TTGTATTGAT AGCATCACGA ATTTGGGATA GACGAGTTCG
301 GCCAAGCGAT TGCATGATAT ATTGAAGTTG GCGTGCTTGT TTGTATACAG GTTATGTTAT
361 CCCAGGTCTG TCTTTCACGA AGCATGAAGT GTACACAAGA AATGAATTAT TAGTCCGAAG
421 TATGTACCTA GATCGGTCAT TGGTCCGTCA AAGCATTATC ATTATCGTAC ATCTCCTTAA
481 TTATTAACG ACAGACCTTC TATCCCAGTA ATGTTTATGT CCAAATCTGG CAGATACAGC
541 TGAGGAGAGA CCTGCTCCAC CCGTCTCTCA GGCTCTTCGA CCTCCGAAAC ATTCTCTTCT
601 TCCTCGATAT CAACATCAAC ACGATCTCCA TCCTCAACAT TACTCTCACC CTCACCCAG
661 TA

```

INSERTO DE 482 pb.

```

1 GAGAAGAGTT TTAAGCAACA CACTGCAGTC GCCCGTTTTG ACACCATCGC AAGCTCACCG
61 TTCACGATCT GTCTCACCAC TACGGCCGAC CTCTAGTCGC TCCGCCTCGG CCACCAGCCT
121 TGCTCTGTCT CCGCTATCCG CACGAGTACC CAGCCAGAAA CAAACCTGGC AACCAGTCTG
181 CAAGTCGCTT AAAGACCTGG AAGAGGAATA CCATGATTTC GACGATGAAC TACCGGATGA
241 TGCAAGTCTG TGGAATATCC CTATTTCTCC GCGCCAGTG CAAGATCGGA CTCCGTACAG
301 CCCTGCCAGT CCAAATGGCC GCAGCCCCGG GCGGCGACCA CTGCCTATCC AGCACACCAT
361 AGCAGGAAGC GATAAGTCAC TCGAAAACAC AGCCAAGGCA TCCCGCATGA AGCGTGTACA
421 GCGATCGAGC TCCGCAGGGC CGGAGCGTGG ACAAATCTCG CCACGCAACC CTCACACCAG
481 TA

```

INSERTO DE 346 pb.

```

1 GAGAAGTCGT TTAAGCATGA CTAGTTCCTG TGGGTTAGTA GTCTAACGTA ACCTCCAGGG

```

RESULTADOS

```
61 CTTAGAAAACC GTCCAGTGGC GCCGGACGAG TGCCGATCGA GTGCCGATTC CCGAGGTGAA
121 CTCCACGAGT GACACCGTCC AGTCTATGCC GGAGAATCAG TATGTAAGAT TCGAGGGCTA
181 ATGGGATTTA ATGGACACTG ATGCCATCGA TGGATCGAAA CTATCCCCTA TTTACAACGT
241 TGTATGCACG GGAGTAATGG AATATCAATC GTCTGTTCGC CCATTGCCAC TGGTAGATTC
301 TTGCCATTGG TCCCCACATT AATCCACGTC GACCCTAACT CCCGTT
```

INSERTO DE 178 pb.

```
1 GAGAAGTCGT TTAAGCAATC GCGTACCTCA TACTGTTCTC GAACAACCGG CCTTGCCCGT
61 GGTAATCCAA TCAACCCCTC GGACACCTCA GAACAGATTT TGTGCACTTG TGTCTGCCGA
121 CAACTCTCCT GACGCATGCA TTTCACGTGG ATCTCCGGCG GTCACACTCA CCCAGTA
```

Al igual que ocurrió con respecto a las secuencias de aminoácidos de los extremos carboxilo y amino terminal, no se encontraron homologías con secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas antimicrobianas descritas en bases de datos.

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN.

Son numerosos los autores que han descrito el efecto protector de los mohos frente a microorganismos patógenos o alterantes, tanto en productos cárnicos madurados (Lücke y Hechelmann, 1987; Geisen y col., 1992; Leistner, 1994; Singh y Dincho, 1994; Berwal y Dincho, 1995) como en quesos (Larsen y Knöchel, 1997; Nielsen y col., 1998). De los diversos tipos de actividad que pueden verse implicadas, se han descrito tres proteínas con actividad antifúngica producidas por mohos (Nakaya y col., 1990; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999). Sin embargo, no se conoce la incidencia de estos microorganismos en productos cárnicos madurados.

IV.1. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

IV.1.1. OBTENCIÓN DE MOHOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS SOLUBLES.

La composición de la población fúngica en productos cárnicos madurados sin adición de cultivos iniciadores, como el jamón, parece estar relacionada tanto con la situación geográfica de las instalaciones de procesado como con el tipo de elaboración al que se sometan las piezas (Leistner y Ayres, 1968, Peintner y col., 2000; Comi y col., 2004). Además, la evolución de las condiciones ecológicas durante el largo proceso de maduración hace que la población fúngica también vaya evolucionando hacia especies cada vez más resistentes a actividades de agua bajas (Huerta y col., 1987; Núñez y col., 1996b).

Por lo tanto, para conseguir una diversidad de aislados suficiente para obtener posibles cepas de mohos productores de péptidos antifúngicos, es preciso partir de diferentes establecimientos y fases del procesado. En el presente estudio se realizaron tomas de muestras en 9 industrias, en distintas localizaciones

geográficas y en las diferentes fases del procesado. En cuanto a los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de mohos, tras los primeros resultados se seleccionó el agar CSN debido a que permite obtener una mayor proporción de mohos del género *Penicillium* que el medio DG18 (véase Tabla III.1). Asimismo, su capacidad para cambiar de color en función de los cambios de pH producidos por el desarrollo de los microorganismos (Pitt, 1993) contribuye a seleccionar una mayor diversidad de mohos.

Se obtuvo un total de 298 aislados, procedentes de las 9 industrias y de las distintas etapas, lo cual puede considerarse aceptable para la búsqueda de mohos con actividad antifúngica. La distribución según la etapa del procesado, con 50 de la fase de postsalado, 109 de secadero y 139 de bodega, corresponde a lo esperable en productos cárnicos madurados como el jamón curado, ya que la evolución de las condiciones ecológicas a lo largo de estas etapas favorece fundamentalmente el desarrollo y la diversidad de la población fúngica (Huerta y col., 1987; Núñez y col., 1996b).

Dado que el número de mohos obtenido era considerable, fue preciso utilizar un ensayo rápido y sencillo para la detección de la actividad antifúngica. Se llevaron a cabo ensayos de inhibición radial en medio sólido porque son sencillos de realizar y permiten conocer en sólo 48 h la actividad antifúngica de los diferentes aislados frente a distintas cepas de referencia utilizando un número reducido de placas de agar (véase apartado II.2.1.2).

Con el ensayo de inhibición radial se detectó actividad antifúngica frente a alguna de las cepas de referencia en el 59% de los aislados, que a su vez procedían de distintas fases del procesado e industrias (véase Tabla III.2), por lo que estos factores no muestran una relación estrecha con la presencia de mohos con actividad antifúngica (véase Figura III.2).

Para asegurar una selección de mohos lo más variada posible para los estudios posteriores, los aislados que mostraron actividad en los ensayos de inhibición radial se agruparon en función de pruebas morfológicas y fisiológicas (Pitt, 1979; Pitt, 1993; Pitt y Hocking, 1997). La caracterización preliminar de los aislados que mostraron algún efecto inhibitor puso de manifiesto una considerable variedad de mohos. Se diferenciaron 18 especies del género *Penicillium* capaces de inhibir el crecimiento de alguna cepa de referencia (véase Tabla III.3). Además, prácticamente en todas las especies de mohos se obtienen aislados que inhiben a diversas cepas de referencia. Dado que las especies de *Penicillium* caracterizadas corresponden a las descritas como habituales para diferentes tipos de jamón (Sutic y col., 1972; Monte y col., 1986; Huerta y col., 1987; Lacey, 1989; Spotti y col., 1989; Rojas y col., 1991; Núñez y col., 1996b; Peintner y col., 2000; Comi y col., 2004), se puede esperar la presencia de mohos con actividad antifúngica en los distintos tipos de jamones madurados.

Las especies que mostraron un espectro de inhibición más amplio, como *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. griseofulvum* y *P. aurantiogriseum* (véase Tabla III.3), se obtuvieron en todas las fases del procesado y en un número considerable (véase Figura III.2). Otras con actividad similar, como *P. commune*, fueron aumentando su recuento a lo largo del proceso de maduración. El alto porcentaje de mohos con actividad antifúngica y la diversidad en cuanto a especies inhibitoras, podría tener una implicación directa en la selección de la población fúngica que se desarrolla en los productos cárnicos madurados, junto a otros factores como la evolución en las características ecológicas a lo largo del proceso de maduración (Huerta y col., 1987; Núñez y col., 1996b).

El porcentaje de aislados activos en cada una de las especies refleja inequívocamente que la capacidad para inhibir a otros mohos no se restringe a especies determinadas. Adicionalmente, las especies que aportaron un mayor número de aislados activos incluían tanto individuos con un amplio espectro de inhibición, como otros activos únicamente frente a 3 ó menos cepas de referencia

(Figura IV.1). Por lo tanto, la actividad antifúngica no parece deberse a una sola característica, sino que está relacionada con diversos factores que se traducen en una actividad heterogénea incluso entre individuos de una misma especie.

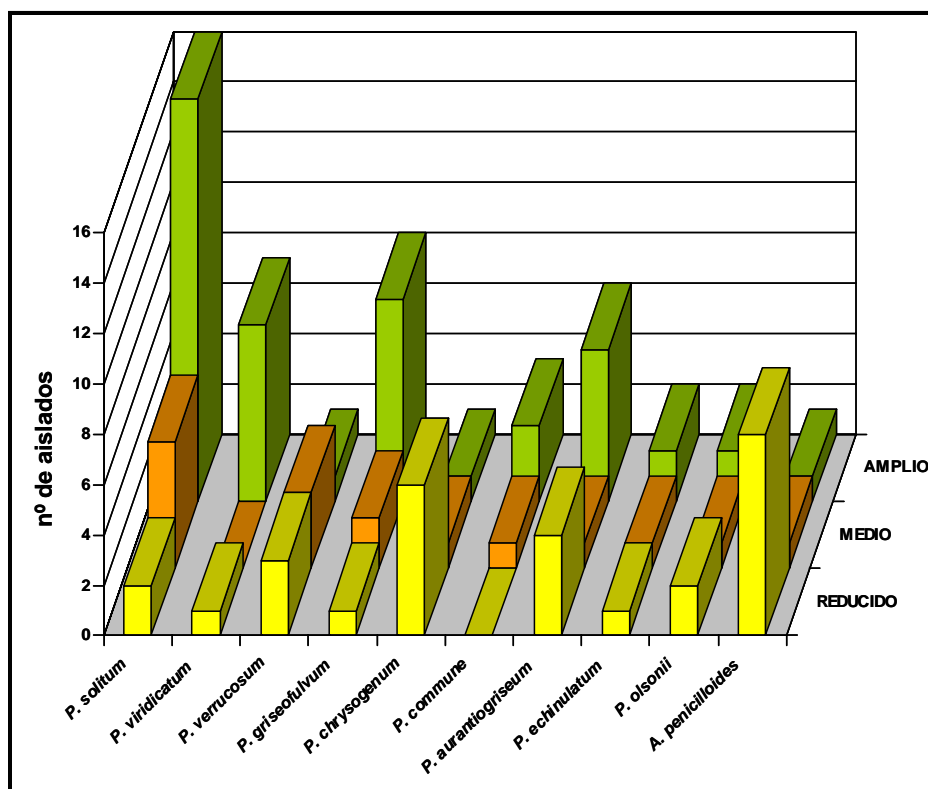


Figura IV.1. Distribución de los aislados de las especies con mayor número de cepas activas según su espectro de inhibición, sea amplio (de 4 ó 5 cepas de referencia), medio (de 3 cepas de referencia) o reducido (1 ó 2 cepas de referencia).

De las cepas utilizadas como referencia, *A. niger* sólo fue inhibido por 14 aislados, siendo la más resistente. El resto resultaron sensibles a la mayoría de los mohos activos (véase Tabla III.3). De los 14 aislados que inhibieron el desarrollo de *A. niger*, 9 se incluyeron en 7 especies diferentes, y los 5 restantes sólo se caracterizaron a nivel de género. De estos 14 mohos activos frente a *A. niger*, 8 inhibieron el desarrollo de las cinco cepas de referencia (Tabla IV.1). Es decir, la máxima capacidad para inhibir a otros mohos se obtiene en aislados pertenecientes a distintas especies. Además, ninguna especie muestra una proporción destacada de individuos con actividad de amplio espectro.

La inhibición observada en medio sólido puede deberse a la liberación al medio de compuestos solubles de distinta naturaleza, pero también a una competición por nutrientes. Para detectar y determinar la naturaleza de los compuestos responsables de la inhibición se efectuaron diferentes ensayos en placas multipocillo. Estos ensayos permitieron además cuantificar la actividad inhibidora, ya que el desarrollo de las cepas indicadoras se determina en función de la variación de la densidad óptica de los pocillos a lo largo del periodo de incubación (véase apartado II.2.1.4).

Para detectar la actividad debida a compuestos antifúngicos liberados al medio se planteó un primer ensayo con 90 de entre los 121 aislados que produjeron inhibición en los ensayos realizados en medio sólido. Dichos mohos se seleccionaron tratando de obtener la mayor diversidad posible en función de la procedencia (industria y fase del procesado), de la caracterización preliminar realizada, y sobre todo englobando los diferentes tipos de actividad observados en los ensayos de inhibición radial en medio sólido. Cada aislado se incubó durante 15 días a 25°C en caldo extracto de malta (MEB). Posteriormente se eliminó el micelio, y el medio libre de células se sometió a una extracción con cloroformo. A continuación se evaluó la actividad en placas multipocillo tanto del extracto clorofórmico como del resto acuoso frente a las mismas cepas de referencia utilizadas en el ensayo de inhibición radial: *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261 (véase apartado II.2.1.4; Figura II.2).

En la Tabla IV.1 se recogen ejemplos de los diferentes tipos de actividad antifúngica mostrada por algunos de estos 90 aislados tanto en los ensayos realizados en medio sólido como en las placas multipocillo.

Tabla IV.1. Espectro de inhibición mostrado por algunos aislados en los ensayos de inhibición radial en medio sólido (IR) y en los ensayos en placas multipocillo realizados con el extracto clorofórmico (C) y el resto acuoso (A) obtenidos a partir de MEB tras la eliminación del micelio.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	IR	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. olsonii</i>						
RP42C	IR	1 ^a	0	1	1	0
	A	+++ ^b	-	+	+++	+
	C	- ^c	-	-	-	-
AMB62	IR	1	1	4	6	1
	A	+	-	+	-	+
	C	+++	+++	+++	-	-
<i>P. griseofulvum</i>						
AMSI131	IR	10	5	5	7	0
	A	+	-	-	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
RB52D	IR	7	5	7	6	0
	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
<i>P. solitum</i>						
AMSI31	IR	10	6	4	7	0
	A	-	-	+	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
CSI52	IR	1	1	1	1	1
	A	-	+	-	-	-
	C	+	-	+	-	-
<i>P. camemberti</i>						
AMP61	IR	1	0	1	0	0
	A	+++	-	+	-	+
	C	-	-	-	-	-
<i>P. commune</i>						
DBI13	IR	7	3	2	1	0
	A	-	-	+	-	-
	C	+	+++	+++	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a radio (mm) de la corona que constituye el halo de inhibición alrededor del cilindro de agar con el aislado inhibidor (véase Figura III.1).

^b diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^c - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla IV.1 (continuación). Espectro de inhibición mostrado por algunos aislados en los ensayos de inhibición radial en medio sólido (IR) y en los ensayos en placas multipocillo realizados con el extracto clorofórmico (C) y el resto acuoso (A) obtenidos a partir de MEB tras la eliminación del micelio.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	IR	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. verrucosum</i>						
ABI 1 C	IR	1 ^a	0	1	1	0
	A	+ ^b	-	+	-	+
	C	- ^c	-	-	-	-
DBI 52	IR	1	1	2	3	0
	A	-	-	+	-	++
	C	-	-	+	-	-
<i>P. echinulatum</i>						
CSI 132	IR	1	0	6	3	2
	A	-	-	+	-	-
	C	-	-	+	-	-
DBI 14	IR	1	1	1	1	0
	A	+++	-	+++	-	-
	C	+++	+++	+++	-	-
<i>P. viridicatum</i>						
DBI 23	IR	9	7	13	7	3
	A	+++	+	+	+++	-
	C	-	-	-	-	-
<i>P. aurantiogriseum</i>						
CBI 154	IR	7	5	6	10	1
	A	-	+++	-	-	-
	C	+	+	+	-	-
FMS35	IR	0	2	0	1	0
	A	-	+++	+	-	-
	C	-	+	+	+++	-
<i>P. crustosum</i>						
AMP51	IR	3	2	2	2	1
	A	+	-	-	+	-
	C	-	-	+	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a radio (mm) de la corona que constituye el halo de inhibición alrededor del cilindro de agar con el aislado inhibidor (véase Figura III.1).

^b diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^c - no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla IV.1 (continuación). Espectro de inhibición mostrado por algunos aislados en los ensayos de inhibición radial en medio sólido (IR) y en los ensayos en placas multipocillo realizados con el extracto clorofórmico (C) y el resto acuoso (A) obtenidos a partir de MEB tras la eliminación del micelio.

AISLADOS	CEPAS de REFERENCIA *					
	IR	Px121	Pe321	Pc332	As161	An261
<i>P. chrysogenum</i>						
AS51D	IR	1 ^a	0	1	1	0
	A	+++ ^b	+	+	+++	-
	C	- ^c	-	-	-	-
AMB11	IR	1	0	0	1	0
	A	++	-	+	+++	-
	C	-	-	-	-	-
RB41C	IR	1	0	0	1	0
	A	+++	-	+++	+++	+
	C	-	-	-	-	-
<i>Penicillium spp.</i>						
AMSI 123A	IR	1	0	0	0	1
	A	+	-	+	-	++
	C	+	-	-	-	-
CBI 23	IR	0	0	2	7	1
	A	-	+	-	-	-
	C	-	-	+	-	-
CBI 159	IR	1	3	3	1	1
	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	+	-
SNB41	IR	5	6	4	4	1
	A	++	+	+	++	++
	C	+	+	-	-	-
<i>A. penicilloides</i>						
NS21D	IR	1	0	0	1	0
	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus spp.</i>						
AP51C	IR	5	3	3	12	3
	A	+	-	-	-	-
	C	-	+++	+	-	-

* *P. expansum* Px121, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. sydowii* As161 y *A. niger* An261.

^a radio (mm) de la corona que constituye el halo de inhibición alrededor del cilindro de agar con el aislado inhibidor (véase Figura III.1).

^b diferencias significativas + (p<0,05), ++ (p<0,01) y +++ (p<0,001) con respecto al control.

^c - no hay diferencias significativas con respecto al control.

De forma general puede observarse que a partir de los aislados que produjeron en medio sólido una inhibición intensa frente a la mayoría de las cepas de referencia, como *P. olsonii* AMB62, *P. griseofulvum* AMSII31, *P. solitum* AMSI31 o *P. commune* DBI13, se obtuvieron extractos clorofórmicos muy activos (Tabla IV.1). Por lo tanto, su actividad parece estar más relacionada con la producción de compuestos liposolubles como las micotoxinas que con compuestos de naturaleza peptídica. Una excepción es el caso de *P. viridicatum* DBI23, del que se obtuvo una fase acuosa muy activa y un extracto clorofórmico inactivo (Tabla IV.1). En otros casos, como *P. echinulatum* DBI14, *P. aurantiogriseum* CBII54 o *Penicillium spp.* SNB41, la inhibición observada en medio sólido puede deberse a una combinación de sustancias de distinta naturaleza, ya que se obtiene actividad tanto en el extracto clorofórmico como en el resto acuoso (Tabla IV.1).

En algunas ocasiones la inhibición radial observada en medio sólido no se reprodujo frente a ninguna cepa de referencia en los ensayos realizados en placas multipocillo, como es el caso de *P. griseofulvum* RB52C y *A. penicilloides* NS21D (Tabla IV.1). Esto puede deberse a que el aislado activo compita de manera muy eficaz con el moho sensible por los nutrientes del medio, limitando así el desarrollo de la cepa de referencia. Por otra parte, dado que en los ensayos en placas multipocillo se aumentó el tiempo de incubación del aislado activo desde los 4 a los 15 días, es posible que se produzca una degradación suficiente del compuesto responsable de la inhibición por enzimas liberadas por el propio moho inhibidor durante la extensión de la incubación. De hecho, muchos de los mohos aislados tanto en jamón como en otros productos cárnicos madurados han mostrado una intensa actividad proteolítica (Trigueros y col., 1995; Rodríguez y col., 1998; Martín y col., 2002), produciendo alguno de ellos proteasas extracelulares (Benito y col., 2002), por lo que podrían degradar péptidos activos. En cualquier caso, ninguna de las dos situaciones anteriores propiciaría la selección del moho en cuestión para el presente estudio.

No obstante, en este primer ensayo en placas multipocillo se evaluó la actividad del resto acuoso resultante de la extracción con cloroformo. Por lo tanto, si el o los compuestos activos fuesen sensibles al tratamiento con cloroformo podría perderse la actividad durante la extracción (Khmelnitsky y Rich, 1999). Para conocer la posible interferencia ocasionada por la extracción con cloroformo, en los siguientes ensayos de inhibición en placas multipocillo se evaluó la actividad del medio de cultivo filtrado, además del extracto clorofórmico y del resto acuoso (véase apartado II.2.1.4).

Por otra parte, 11 de los 14 aislados que resultaron activos en medio sólido frente a *A. niger* se seleccionaron para los ensayos preliminares realizados en placas multipocillo. En 7 de estos 11 aislados incluyendo *P. solitum* CSI52, *P. echinulatum* CSII32 o *P. viridicatum* DBI23, no logró reproducirse en las placas la inhibición observada en medio sólido (Tabla IV.1). Esto indica que la actividad de estos mohos frente a *A. niger* puede estar más relacionada con una competición por los sustratos del medio que con un efecto de la concentración de los compuestos activos. Además, los extractos clorofórmicos de 10 de estos 11 aislados, como *P. olsonii* AMB62 o *P. aurantiogriseum* CBII54, resultaron activos frente a alguna cepa de referencia (Tabla IV.1) por lo que no fueron seleccionados para los ensayos posteriores.

Por otro lado, cepas como *P. olsonii* RP42C, *P. echinulatum* DBI14, *P. chrysogenum* AS51D y RB41C o *P. aurantiogriseum* FMS35, que produjeron una inhibición radial débil, mostraron gran actividad al incubar en las placas multipocillo (Tabla IV.1), posiblemente debido a que al aumentar el periodo de incubación también se incrementó la producción de los compuestos responsables de la inhibición, ya sean o no de naturaleza proteica. También es posible que si la actividad se debe a péptidos catiónicos, éstos interaccionen con los grupos funcionales de carga negativa del agar (Kunin y Edmondson, 1968), lo que conllevaría la reducción de la difusión y por tanto la disminución de la actividad (Holowachuk y col., 2003).

En cualquier caso, para los ensayos posteriores se seleccionaron los aislados que resultaron activos al incubar con la fase acuosa y cuyos extractos clorofórmicos no inhibieron el desarrollo de ninguna cepa de referencia en las placas multipocillo, ya que esto último podía suponer la producción de algún compuesto no deseado como las micotoxinas. Concretamente, se seleccionaron 7 de los 90 aislados estudiados: *P. olsonii* RP42C, *P. camemberti* AMP61, *P. verrucosum* AB11C, *P. viridicatum* DBI23 y *P. chrysogenum* AS51D, AMB11 y RB41C.

IV.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.

Los resultados obtenidos en los primeros ensayos en placas multipocillo plantearon distintas posibilidades respecto a la actividad de los extractos, como la competición por sustratos o la sensibilidad de los compuestos activos al tratamiento con cloroformo, que explicarían la actividad mostrada por algunos aislados como *P. griseofulvum* RB52C, *P. echinulatum* CSII32 o *P. crustosum* AMP51 (Tabla IV.1). Para dilucidar estas cuestiones, los siguientes ensayos en placas multipocillo se realizaron incorporando una prueba más, en la que se evaluaba la actividad del medio de cultivo sin más manipulación que un filtrado para eliminar el micelio y las esporas (véase apartado II.2.1.4; Figura II.3).

Estos ensayos de inhibición en placas multipocillo para caracterizar los compuestos responsables de la inhibición se llevaron a cabo con 37 mohos. Se seleccionaron los 7 mohos que inhibieron a 3 o más cepas de referencia al incubar con la fase acuosa pero que no produjeron extractos clorofórmicos activos en los ensayos preliminares en placas multipocillo (Tabla IV.1). También se incluyeron 25 de entre los 31 aislados caracterizados que mostraron actividad en las pruebas de inhibición radial y que no habían sido seleccionados anteriormente. Se utilizaron además 2 cepas de *Penicillium nalgiovense* con actividad antifúngica: BFE66 y BFE67 (Geisen, 2000), facilitadas por el Dr. Rolf Geisen (Centro

Federal de Investigación, Instituto de Higiene y Toxicología. Karlsruhe, Alemania), y 3 mohos no toxigénicos con actividad proteolítica aislados de productos cárnicos madurados: *Penicillium chrysogenum* Pg131, *P. chrysogenum* Pg341 y *P. nalgiovense* Pj261 (Núñez y col., 1996b; Rodríguez y col., 1998).

En estos ensayos, además del caldo extracto de malta (MEB) se utilizó también el caldo de patata y dextrosa (PDB), donde se incubó cada aislado durante 15 días a 25°C. De cada medio de cultivo se obtuvieron tres fracciones: 1) el medio de cultivo filtrado 2) el extracto clorofórmico de dicho medio junto con el micelio del moho y 3) la fase acuosa obtenida tras extraer con cloroformo (véanse apartado II.2.1.4; Figura II.3).

Con el fin de establecer si el efecto inhibitor observado en los ensayos de inhibición radial se debía a compuestos presentes en el medio de cultivo o si por el contrario requería que el moho activo se desarrollase en presencia de la cepa sensible, se evaluó la actividad del medio de cultivo filtrado. De esta manera, se podría eliminar cualquier actividad debida a una competencia por sustratos que llegase a afectar de manera crítica a un determinado nutriente esencial para la cepa de referencia. Del mismo modo, la evaluación de la actividad en el medio filtrado evitaría cualquier interferencia debida a la extracción con cloroformo.

Para discriminar si la actividad antifúngica podía deberse a compuestos de naturaleza proteica o si por el contrario se debía a otro tipo de compuestos liposolubles, como las micotoxinas, se evaluó la actividad inhibitora del extracto clorofórmico obtenido a partir del medio de cultivo junto con el micelio del moho. La comparación de la actividad de dicho extracto clorofórmico con la de la fase acuosa y la del medio de cultivo antes de la extracción, permitiría descartar a aquellos aislados que no produjeran péptidos de interés. De esta manera, a partir de los mohos de interés por la posible producción de péptidos antifúngicos se obtendría un medio de cultivo filtrado activo, pero extractos clorofórmicos inactivos. Adicionalmente, la evaluación de la actividad inhibitora de la fase

acuosa restante tras la extracción con cloroformo, aportaría información adicional sobre la estabilidad de los compuestos activos ante el cloroformo.

Se emplearon como cepas de referencia a *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261, que también se habían utilizado como indicadores en el ensayo de inhibición radial en medio sólido y en los primeros ensayos en placas multipocillo, incorporándose así mismo *Penicillium solitum* Ps321, igualmente aislado de productos cárnicos madurados (Núñez y col.; 1996b) y seleccionado por producir micotoxinas (Díaz, 1999). También se prestó especial atención al hecho de que la especie caracterizada con mayor frecuencia en todas las fases del procesado fuera *P. solitum* (véase Figura III.2). Además, a partir de los 12 aislados de *P. solitum* seleccionados para los primeros ensayos en placas multipocillo se obtuvieron extractos clorofórmicos activos (véase Tabla III.4), lo que podría relacionarse con la producción de alguna micotoxina. Las cepas de *A. sydowii* As161 y *P. expansum* Px121 se descartaron debido a la poca capacidad de discriminación mostrada en los ensayos realizados en medio sólido, similar a la revelada por *P. commune* Pc332 (véase Tabla III.3).

Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron agrupar a los aislados en función de la actividad observada con las distintas fracciones frente a las cuatro cepas de referencia (véase Tabla III.5). Las cepas que pueden producir péptidos antifúngicos de interés han de inhibir a la mayoría de las cepas de referencia, tanto con el medio de cultivo como con la fase acuosa, y son las que se han clasificado en esta memoria como Tipo P, P-nig, P-MEB y P-PDB (véase Tabla III.5). Los aislados Tipo P, concretamente *P. viridicatum* DBI23, *P. camemberti* AMP61; *P. olsonii* RP42C y *P. chrysogenum* RB41C, muestran una notable actividad frente a la mayoría de las cepas de referencia independientemente de que se cultiven en MEB o PDB (véase Tabla III.5). La diferencia fundamental entre los aislados Tipo P y P-nig fue la ausencia de actividad de las cepas P-nig frente a *A. niger* An261, lo que puede estar relacionado con la producción de distintos niveles de compuesto activo o bien con la liberación de compuestos antifúngicos diferentes.

En este sentido, entre los péptidos antifúngicos producidos por mohos que se describen en la bibliografía, algunos afectan únicamente a determinadas especies mientras que otros muestran espectros de inhibición amplios (Lacadena y col., 1995; Lee y col., 1999). Así, un péptido producido por *Aspergillus niger* muestra una intensa actividad frente a diversos mohos de especies e incluso géneros diferentes (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Trichosporon spp.*), levaduras y bacterias (Lee y col., 1999). Por el contrario, una proteína secretada por *Aspergillus giganteus*, además de no resultar activa frente a bacterias o levaduras, únicamente inhibe a determinadas especies de mohos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma*, no resultando activa frente a cepas del género *Aspergillus* (Lacadena y col., 1995).

En cuanto al aislado *P. verrucosum* AB11C, clasificado como Tipo P-MEB, mostró mayor actividad al ser incubado en PDB, mientras que de los mohos clasificados como P-PDB, concretamente de *P. chrysogenum* AS51D y AMB11, mostraron mayor actividad las fracciones obtenidas al incubarse en MEB (véase Tabla III.5). Estas diferencias en la actividad no se deben a un menor desarrollo del moho en el medio de cultivo en el que resulta menos activo, pues en ambos casos fue similar. La composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación pueden desempeñar un papel decisivo en la formación de péptidos antifúngicos por mohos (Marx y col., 1995; Meyer y col., 2002). De hecho, los promotores de los genes involucrados en la producción de los metabolitos secundarios fúngicos están sujetos a una regulación positiva o negativa mediante efectores intracelulares o proteínas que interactúan con el ADN, que responden a limitaciones de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo (Martín y Liras, 1989; Kulmburg y col., 1993; Marzluf, 1993; Marín y col., 1998). Concretamente, una proteína antifúngica producida por *P. chrysogenum* no se detecta en medios de cultivo en los que se sustituye como fuente de carbono la sacarosa por glucosa (Marx y col., 1995). Por el contrario, la expresión de la proteína antifúngica producida por *A. giganteus* no está regulada por la fuente de carbono o nitrógeno, pero sí por las condiciones de pH o por la presencia en el medio de NaCl o etanol

(Meyer y col., 2002). No obstante, las diferencias observadas no se deben simplemente a que sólo se obtenga actividad a partir de uno de los dos medios, pues el medio donde se produce menor actividad también inhibe a alguna cepa de referencia, como es el caso de *P. chrysogenum* AS51D o *P. verrucosum* AB11C (véase Tabla III.5). Por lo tanto, estas diferencias pueden deberse a que no se forme alguno de los compuestos activos o a que se produzca en menor concentración. Además, en el único aislado Tipo P-MEB, *P. verrucosum* AB11C, se pierde gran parte de la actividad al extraer con cloroformo (véase Tabla III.5), fenómeno similar al que se describe a continuación para las cepas Tipo SC.

En los aislados clasificados como Tipo SC, como *P. aurantiogriseum* CSII52 y CSII42, *P. chrysogenum* Pg341 o *Penicillium spp.* CP32, la inhibición producida por el medio de cultivo no se recuperó con la fase acuosa, pero el extracto clorofórmico tampoco reproducía toda la actividad observada en el medio de cultivo sin tratar (véase Tabla III.5). El hecho de no recuperar la actividad inhibidora tras la extracción con cloroformo puede atribuirse a que algunos de los principales compuestos responsables de la inhibición puedan haberse desnaturalizado como consecuencia del tratamiento con cloroformo (Khmelnitsky y Rich, 1999). Por otro lado, en el caso de *Penicillium spp.* DBI44, se recuperó parte de la actividad inhibidora en el extracto clorofórmico (véase Tabla III.5), lo que puede suponer que la actividad se deba a micotoxinas u otros compuestos antifúngicos solubles en solventes orgánicos. En este sentido, algunas cepas de *Bacillus subtilis* producen unos lipopéptidos con actividad antifúngica, concretamente la familia de las iturinas, solubles tanto en solventes orgánicos como en medios acuosos (Klich y col., 1991; Moyne y col., 2001; Bernal y col., 2002). También se han descrito lipopéptidos producidos por *Aspergillus rugulosus* y *A. nidulans* con actividad antifúngica, concretamente la familia de las equinocandinas (Benz y col., 1974; Keller-Juslin y col., 1976; Roy y col., 1987). Desafortunadamente, la mayoría de estos lipopéptidos son hemolíticos (Latoud y col., 1986; Iwamoto y col., 1994a,b) lo que reduce considerablemente la posibilidad de ser utilizados en la industria alimentaria.

Por otro lado, en los aislados clasificados como Tipo SC+A, como *P. viridicatum* DBI32 y CSI44 o *P. solitum* CBI42, CSI54 y DBI41, además de una actividad que se pierde al extraer con cloroformo como en el caso de los aislados Tipo SC, se observa actividad en la fase acuosa obtenida de PDB frente a *P. commune* Pc332 (véase Tabla III.5). A partir de algunos aislados incluidos en este grupo, como *P. solitum* CBI25, CSII33 o FMP21, además se obtuvieron fases acuosas activas frente a varias cepas indicadoras a partir de los dos medios (véase Tabla III.5). Es decir, en este grupo se obtienen extractos con compuestos que pierden actividad al extraer con cloroformo, junto a compuestos que no la pierden.

Además de las características específicas de cada tipo de actividad se obtuvieron algunos resultados difíciles de interpretar que afectaban a aislados con diferente actividad. Por ejemplo, en casos excepcionales, como *P. chrysogenum* AMB11 y *P. camemberti* AMP61, la actividad observada en la fase acuosa no fue detectada con el medio de cultivo sin tratar (véase Tabla III.5). Esto podría deberse a que en el medio de cultivo haya alguna sustancia soluble en cloroformo o sensible al tratamiento con el mismo, que impide la actividad del compuesto antifúngico frente a la cepa indicadora de la inhibición. En cualquier caso, este comportamiento es puntual y su discusión se aleja de los objetivos de este trabajo.

Finalmente, los aislados que fueron seleccionados en los primeros ensayos en placas multipocillo (Tabla IV.1), concretamente *P. olsonii* RP42C, *P. camemberti* AMP61, *P. verrucosum* AB11C, *P. viridicatum* DBI23 y *P. chrysogenum* AS51D, AMB11 y RB41C, mostraron mayor actividad tanto en la fase acuosa como en el medio de cultivo sin tratar en el segundo ensayo (véase Tabla III.5). Esto se debe a que en el segundo ensayo tanto el medio de cultivo como la fase acuosa fueron concentrados antes de la evaluación de su actividad, a diferencia de en los primeros ensayos en los que no se llevó a cabo esta concentración (véase apartado II.2.1.4).

IV.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS ACTIVOS.

La caracterización preliminar de los 37 aislados seleccionados permitió establecer que 31 aislados correspondían a 11 especies distintas pertenecientes al género *Penicillium* subgénero *Penicillium*. Los 6 aislados restantes sólo pudieron identificarse a nivel de género. La caracterización de mohos basada en las características macroscópicas y microscópicas en medios de cultivo se ha utilizado de forma clásica para la identificación de mohos (Pitt, 1979; Pitt, 1993; Pitt y Hocking, 1997). Aunque la morfología de estos microorganismos puede variar considerablemente dentro de una especie en función de su estado fisiológico (Wiley, 1981), estas técnicas siguen siendo utilizadas por lo general acompañadas de otras pruebas complementarias tendentes a una identificación adecuada (Lund y Frisvad, 1994; Lund, 1995a,b; Larsen y Frisvad, 1995a,b). Para la identificación de ciertas especies del género *Penicillium* subgénero *Penicillium* tienen gran valor algunas de las características que se observan en los medios de cultivo, como por ejemplo la morfología microscópica típica de *P. olsonii* (Pitt, 1979), el crecimiento a 37°C de *P. chrysogenum* (Pitt, 1979), o las diferentes reacciones producidas en el medio CSN por especies de morfología macroscópica muy similar como *P. verrucosum* y *P. viridicatum* o *P. aurantiogriseum* y *P. solitum* (Pitt, 1993).

A pesar de que la síntesis de metabolitos secundarios está condicionada por los factores ambientales, el estudio del perfil de metabolitos secundarios aporta información valiosa para la identificación de especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, (Khachatourians, 1999). Adicionalmente, la capacidad para formar metabolitos tóxicos puede ser de gran valor para descartar cepas por su potencial toxigénico.

Los resultados del análisis mediante HPLC-UV mostraron que en los extractos obtenidos a partir de los medios de cultivo (MEB y PDB) sin inocular apenas se detectaron compuestos, ya que el cloroformo no extrae muchos de los

metabolitos primarios polares que contienen los medios, como son los hidratos de carbono o los aminoácidos. Por ello, se consideró que los compuestos detectados en los extractos clorofórmicos de los 37 aislados seleccionados eran metabolitos secundarios.

Por otra parte, los perfiles correspondientes a los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de MEB y PDB para cada aislado resultaron similares entre sí, por lo que en este caso la incubación en ambos medios no aporta ninguna ventaja adicional desde el punto de vista de la identificación.

El análisis de los extractos clorofórmicos de los 37 aislados seleccionados mediante HPLC-UV (véanse Tabla III.9; Figura III.8), permitió agrupar a 28 de estos 37 aislados en 6 patrones distintos, mientras que los 9 mohos restantes (véase Figura III.9) presentaron perfiles totalmente diferentes.

En la Tabla IV.2 se muestra la caracterización de los 37 aislados seleccionados, mediante técnicas clásicas, por el perfil de metabolitos secundarios y mediante el sistema Microstation de Biolog. También se detalla el tipo de inhibición mostrada en los ensayos realizados en placas multipocillo.

En la mayoría de los casos, la agrupación según el perfil de metabolitos secundarios se correspondió con la caracterización morfológica y fisiológica, de forma que los aislados de una misma especie mostraron un patrón común de metabolitos secundarios (Tabla IV.2). Por ejemplo, los aislados RB41C, AMB11 y AS51D identificados como *P. chrysogenum*; mostraron un perfil de metabolitos secundarios prácticamente idéntico (Figura IV.2). Algo similar sucede con los aislados CSII42 y CSII52 identificados como *P. aurantiogriseum*; o con DBI17, DBI12, DBI32 y CSI44, identificados como *P. viridicatum* (Figura IV.2).

Tabla IV.2. Caracterización preliminar, mediante el perfil de metabolitos secundarios y por el sistema Microstation de Biolog de los aislados seleccionados, y tipo de inhibición en placas multicapila de los mohos seleccionados.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN			INHIBIDOR TIPO				
	CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR	PERFIL de METABOLITOS SECUNDARIOS	Microstation BIOLOG					
RB41C AMBI I AS51D	<i>P. chrysogenum</i>	PERFIL I	<i>P. aurantiogriseum</i>	P				
				<i>P. solitum</i>	P-PDB			
				<i>P. chrysogenum</i>				
CSI I 42 CSI I 52	<i>P. aurantiogriseum</i>	PERFIL II	<i>P. polonicum</i>	SC				
DBI 17 * DBI 12 * DBI 32 *	<i>P. viridicatum</i>	PERFIL III	<i>P. solitum</i>	SC+A				
CSI 44								
DBI 141 DBI 142 * CSI 116 *					<i>P. commune</i>			P-nig
CSI 133 * CBI 25 * CBI 42 CBI 157 CSI 54 FMP21 * DBI 11 * DBI 41 * DBI 122 DBI 123 *								
DBI 112 *	<i>Penicillium spp.</i>			P-nig				
BFE66 BFE67 Pj261	<i>P. nalgiovense</i>	PERFIL V	<i>P. verrucosum</i>	F				
				<i>P. nalgiovense</i>				
Pg131 Pg341			<i>P. chrysogenum</i>	PERFIL VI	<i>P. polonicum</i>	F		
		<i>P. aurantiogriseum</i>			SC			
RP42C	<i>P. olsonii</i>	- ¹	<i>P. solitum</i>	P				
DBI 23	<i>P. viridicatum</i>	-	<i>P. viridicatum</i>	P				
AB11C	<i>P. verrucosum</i>	-	<i>P. verrucosum</i>	P-MEB				
AMP61 *	<i>P. camemberti</i>	-	<i>P. camemberti</i>	P				
CP32 DBI 44	<i>Penicillium spp.</i>	-	<i>Talaromyces spp.</i>	SC				
				<i>P. expansum</i>	SC			
DBI 114 CBI 52 FMP13	<i>Aspergillus spp./</i> <i>Eurotium spp.</i>	-	n.i ²	N				
					n.i			
					n.i			

* mohos identificados con fiabilidad por el sistema Microstation de Biolog.

¹ mohos no incluidos en los perfiles de metabolitos secundarios mayoritarios.

² mohos no identificados por el sistema Microstation de Biolog por un nivel de desarrollo insuficiente de los mohos.

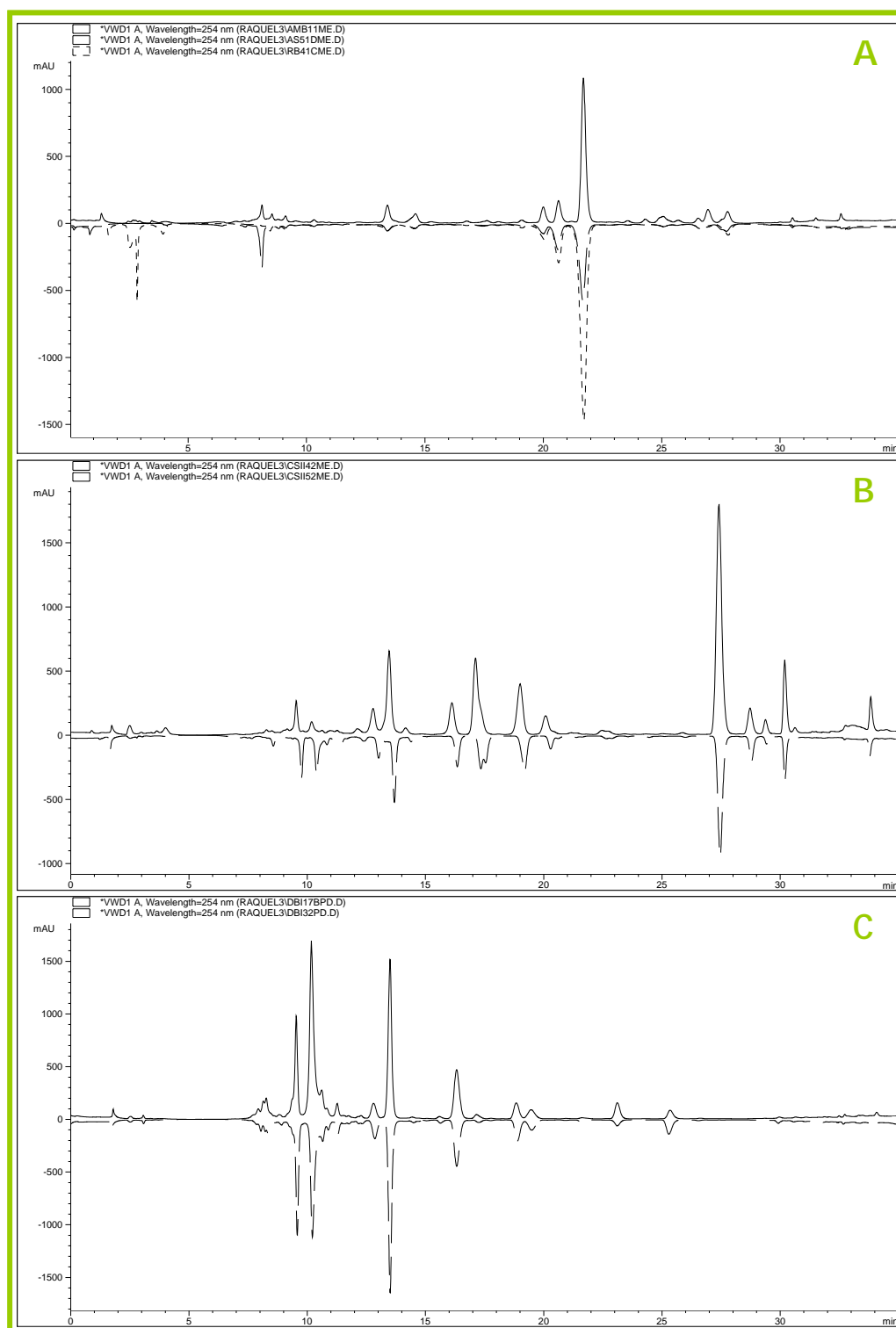


Figura IV.2. Perfil de metabolitos secundarios obtenido mediante HPLC-UV a partir de los extractos clorofórmicos de A) *P. chrysogenum* RB41C, AMB11 y AS51D; B) *P. aurantiigriseum* CSII42 y CSII52; y C) *P. viridicatum* DBI17 y DBI32.

No obstante, no todos los aislados caracterizados como de la misma especie mostraron el mismo perfil de metabolitos secundarios. Las cepas de *P. chrysogenum* Pg131 y Pg341 mostraron perfiles idénticos entre sí, pero diferentes a los de *P. chrysogenum* RB41C, AMB11 y AS51D (Figura IV.3). De hecho, en los extractos clorofórmicos de RB41C, AMB11 y AS51D se detectó ácido secalónico a diferencia de en los obtenidos de Pg131 y Pg341. De forma similar, el aislado DBI23 caracterizado como *P. viridicatum* no mostró un perfil similar al del resto de mohos caracterizados como de esa especie (Figura IV.3).

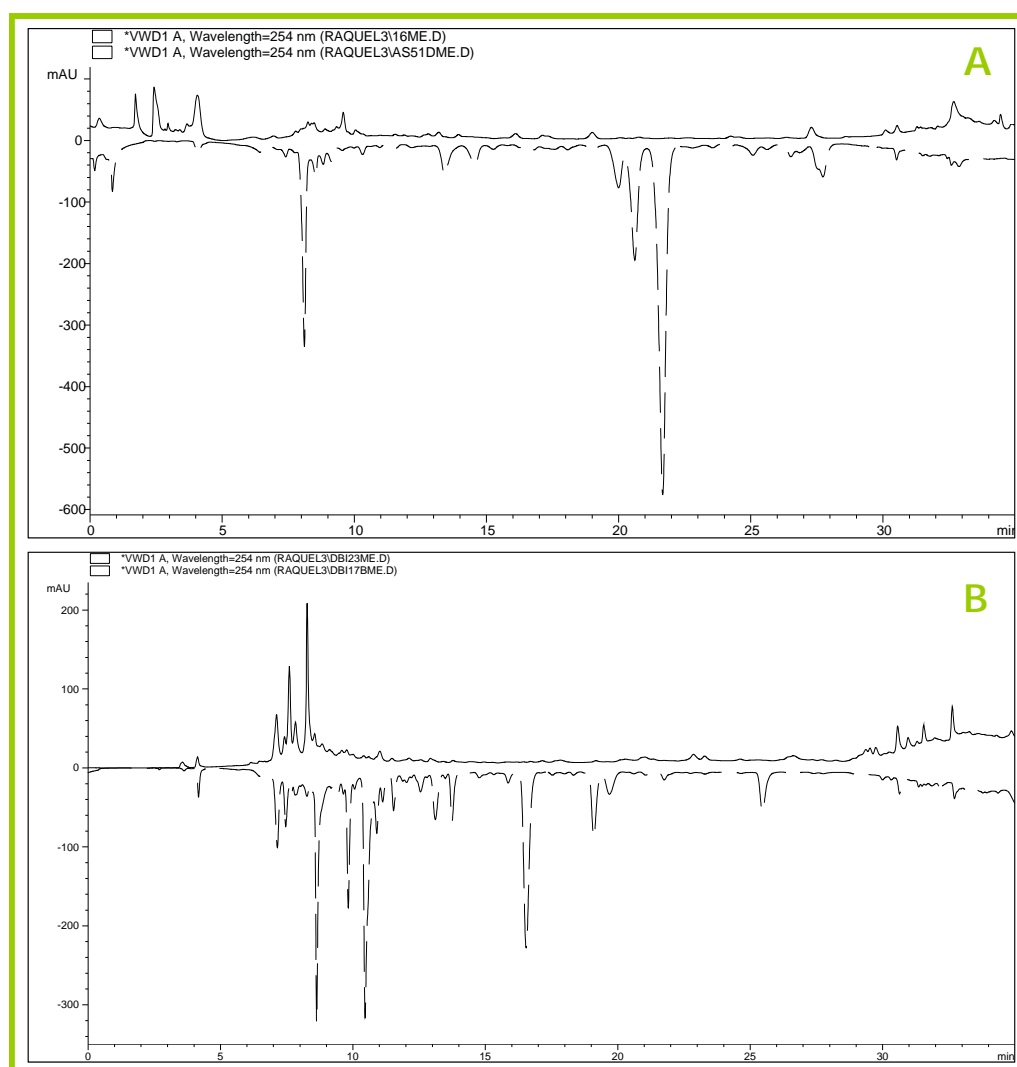


Figura IV.3. Perfil de metabolitos secundarios obtenido mediante HPLC-UV a partir de los extractos clorofórmicos de A) *P. chrysogenum* Pg131 y AS51D; y B) *P. viridicatum* DBI23 y DBI17.

Los aislados *P. chrysogenum* Pg131 y Pg341, y *P. viridicatum* DBI23, además de mostrar perfiles de metabolitos secundarios diferentes a los mostrados por el resto de mohos clasificados en su respectiva especie, también mostraron una actividad antifúngica diferente en los ensayos realizados en las placas multipocillo (Tabla IV.2).

Por otra parte, determinadas cepas caracterizadas como *P. commune* y *P. solitum* se agruparon en el perfil IV de metabolitos secundarios (Tabla IV. 2; Figura IV.4). Adicionalmente, la mayoría de estos aislados, como DBII42, CSII33 o FMP21, fueron identificados como *P. solitum* con suficiente fiabilidad por el sistema Microstation de Biolog (Tabla IV.2).

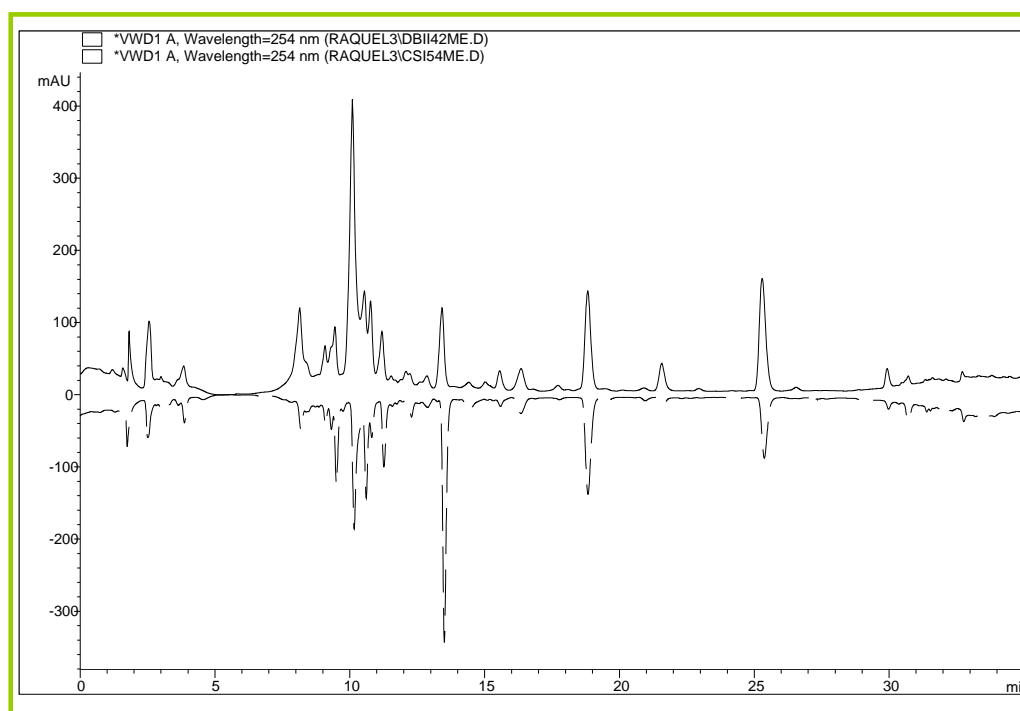


Figura IV.4. Perfil de metabolitos secundarios obtenido mediante HPLC-UV a partir de los extractos clorofórmicos de DBII42 y CSI54 caracterizados por las técnicas clásicas como *P. commune* y *P. solitum* respectivamente.

Los aislados DBII41, DBII42 y CSII16, incluidos en el perfil IV, fueron caracterizados por las técnicas clásicas como *P. commune*, y como *P. solitum* por

el sistema Microstation de Biolog. Ambas especies muestran una morfología similar en los medios de cultivo utilizados de forma clásica para la identificación de mohos y producen la misma reacción básica en el medio CSN (Pitt y Hocking, 1997; Pitt, 1993). En cambio, la mayoría de cepas de *P. commune* producen ácido ciclopiazónico a diferencia de las cepas de *P. solitum* (Lund, 1995). Esta micotoxina no se detectó en ninguno de los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de los aislados caracterizados como *P. commune* por las técnicas clásicas. Además, dichos mohos mostraron el mismo perfil de metabolitos secundarios que los aislados caracterizados como *P. solitum* tanto por las técnicas clásicas como por el sistema de Biolog, los cuales tampoco produjeron ácido ciclopiazónico en los medios de cultivo ensayados. Por ello, todos los aislados incluidos en el perfil IV de metabolitos secundarios deben considerarse como *P. solitum*.

En cuanto a los aislados DBI17, DBI12, DBI32 y CSI44, caracterizados por las técnicas clásicas como *P. viridicatum*, también fueron identificados como *P. solitum* por el sistema Microstation de Biolog. No obstante, mostraron el perfil III de metabolitos secundarios, totalmente diferente al del resto de mohos identificados como *P. solitum*, que fueron incluidos en el perfil IV. Además, produjeron una reacción ácida en el medio CSN, a diferencia de los aislados identificados como *P. solitum* que producen una reacción básica (Pitt, 1993). Esta característica hace que se consideren como cepas de *P. viridicatum* y no de *P. solitum*.

Por otra parte, los aislados CSII42 y CSII52, que mostraron el perfil II de metabolitos secundarios, fueron caracterizados por las técnicas clásicas y por el sistema de Biolog como *P. aurantiogriseum* y *P. polonicum* respectivamente. Ambas especies son prácticamente indistinguibles en función de la morfología mostrada en los medios de cultivo utilizados de forma clásica en la identificación fúngica (Lund y Frisvad, 1994). No existe un criterio unánime respecto de la identidad de *P. polonicum*. Algunos autores opinan que se trata de una variedad dentro de la especie *P. aurantiogriseum* (Pitt y Hocking, 1997), mientras que

otros afirman que son especies independientes (Samson y col., 1995, 1996; Smedsgaard y Frisvad, 1996, 1997). No obstante, la producción de verrucosidina es una característica descrita para *P. polonicum* en la bibliografía (Smedsgaard y Frisvad, 1996, 1997). Esta micotoxina fue detectada en los extractos clorofórmicos de CSII42 y CSII52, por lo que deben identificarse como *P. polonicum* y no como *P. aurantiogriseum*.

Por otro lado, el tipo de inhibición mostrada por los distintos aislados en las placas multipocillo no se corresponde totalmente con la identificación realizada. Así, las cepas caracterizadas como *P. solitum* incluidas en el perfil IV de metabolitos secundarios, como DBII42, DBI11, DBI41 o DBII23, produjeron diferentes tipos de inhibición en placas multipocillo. Algo similar sucede con los aislados del perfil I de metabolitos caracterizados como *P. chrysogenum*, que muestran tipos de inhibición diferentes (Tabla IV.2).

Al margen de que las pruebas efectuadas no sean suficientes para una identificación completa de los mohos aun habiéndose utilizado una combinación de técnicas como han propuesto algunos autores (Lund y Frisvad, 1994; Lund, 1995a,b; Larsen y Frisvad, 1995a,b), estos métodos permitieron la clasificación de las cepas y sirvieron a uno de los objetivos del trabajo: conseguir seleccionar mohos diversos para obtener diferentes compuestos con actividad antifúngica.

PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

La baja actividad de agua, unida a la alta concentración de sal y el alto contenido proteico, convierten a los productos cárnicos madurados en sustratos favorables para el desarrollo fúngico, aunque no para la producción de micotoxinas (Beuchat, 1987). No obstante, cepas de *P. polonicum* y *P. commune* aislados de jamón curado son capaces de producir verrucosidina y ácido ciclopiazónico respectivamente, en medios de cultivo constituidos fundamentalmente por extracto de carne (Núñez y col., 1999; Sosa y col., 2002).

Además, al menos durante ciertos periodos del proceso de maduración, se ha detectado la formación de micotoxinas en distintos productos cárnicos madurados (Bullerman y col., 1969; Escher y col., 1973; Halls y Ayres, 1973; Wu y col., 1974a; Cantoni y col., 1982; Skrinjar y Horvat-Skenderovic, 1989; Leistner, 1984; Gareis y Scheuer, 2000). Por todo lo anterior, resulta de gran interés estudiar el potencial toxigénico de las cepas productoras de proteínas con actividad antifúngica que puedan utilizarse como cultivos protectores en productos cárnicos madurados.

Debido al gran número de toxinas producidas por mohos del género *Penicillium* (Pohland, 1993; Sweeney y Dobson, 1998), algunos autores utilizan ensayos biológicos para estimar el potencial toxigénico de estos microorganismos (Wu y col., 1974b; Núñez y col., 1996b; López-Díaz y col., 2001). No obstante, con estos métodos no es posible relacionar el efecto tóxico con la producción de determinadas micotoxinas. Por el contrario, los análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS; Núñez y col., 2000; Rundberget y Wilkins, 2002) y por electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC; Nielsen y col., 1996; Martín y col., 2004) permiten la separación y detección de múltiples micotoxinas en un único análisis. Los resultados obtenidos en este estudio fueron prácticamente idénticos con las dos técnicas utilizadas.

La mayoría de las especies del género *Penicillium* analizadas están consideradas como potencialmente toxigénicas (Frisvad y Thrane, 1995). De hecho, se detectaron ácido secalónico, ácido ciclopiazónico, ocratoxina A y verrucosidina, producidas por 7 de los 37 aislados seleccionados, identificados como *P. chrysogenum*, *P. camemberti*, *P. verrucosum* y *P. polonicum* (Tabla IV.3).

DISCUSIÓN

Tabla IV.3. Micotoxinas detectadas en los extractos clorofórmicos de los 37 aislados seleccionados mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS) y por electroforesis capilar micelar electrocinética (MECC).

AISLADO	MICOTOXINA	HPLC-MS			MECC	
		Masa	Tiempo de retención (min)	Área (UAA)	Tiempo de retención (min)	Máximos de absorbancia (λ)
<i>P. chrysogenum</i> RB41C	ácido secalónico	639,5	21,60	1,7x10 ¹⁰		
<i>P. chrysogenum</i> AS51D	ácido secalónico	639,3	21,50	3x10 ⁹	10,0	246 343 363 ^c
<i>P. chrysogenum</i> AMB11	ácido secalónico	639,5	21,54	7,1x10 ⁹		
<i>P. verrucosum</i> AB11C	ocratoxina A	404,1	17,01	1,4 x10 ⁹	13,2	e ^c , 217, 381
<i>P. camemberti</i> AMP61	ácido ciclopiazónico	337,6	22,74	1,2x10 ¹⁰	13,9	225 ^c 262 283
<i>P. polonicum</i> CSI142	verrucosidina	417,2	27,42	1,6 x10 ⁶		nd
<i>P. polonicum</i> CSI152	verrucosidina	417,4	27,34	4,5 x10 ⁵		nd

^c Longitud de onda a la que se detectó la máxima absorbancia.

e, máximo de absorción por debajo de 190 nm.

nd: micotoxina no detectada.

El número de aislados capaces de producir micotoxinas *in vitro* detectado, contrasta con los resultados obtenidos en estudios sobre la población fúngica de productos cárnicos madurados como el chorizo (López-Díaz y col., 2001) o el jamón curado (Díaz, 1996, 1999). No obstante, no debe extrañar el bajo porcentaje de mohos productores de micotoxinas por diversas razones. En primer lugar, el aislamiento de mohos no ha sido representativo de la población, ya que el

objetivo fue el de obtener la mayor diversidad de especies posible. En segundo lugar, en los diferentes procesos de selección no se favoreció a los aislados que mostraron actividad antifúngica en los extractos clorofórmicos, la cual podría deberse a la producción de metabolitos tóxicos.

A diferencia de *P. chrysogenum* Pg131 y Pg341 (Núñez y col., 1996b), los otros tres aislados caracterizados como *P. chrysogenum* seleccionados, RB41C, AS51D y AMB11, produjeron ácido secalónico, que se detectó por ambas técnicas. Aunque la producción de roquefortina C y ácido secalónico ha sido descrita en cepas de *P. chrysogenum* (Frisvad y Filtenborg, 1989), en estudios realizados con mohos de esta misma especie aislados de jamón curado, entre los que se encuentran *P. chrysogenum* Pg131 y Pg341, no se detectó la producción ninguna de estas micotoxinas (Díaz, 1999; Martín y col., 2004).

Por otra parte, en los extractos correspondientes al aislado caracterizado como *P. camemberti* AMP61 se detectó mediante ambas técnicas ácido ciclopiazónico (Figura IV.5). De hecho, este moho se ha descrito en la bibliografía como uno de los mayores productores de esta micotoxina (Engel y Teuber, 1989; Le Bars, 1979, 1990).

P. verrucosum se considera uno de los principales productores de ocratoxina A (Frisvad y col., 1999) y de otras micotoxinas como citrinina (El-Banna y col., 1987), de hecho en los extractos clorofórmicos del único aislado caracterizado de esta especie se detectó ocratoxina A. Además, en alimentos como quesos y productos cárnicos con un alto contenido en grasas y proteínas, en los que puede desarrollarse este moho, se ha detectado dicha micotoxina (Gareis y Scheuer, 2000).

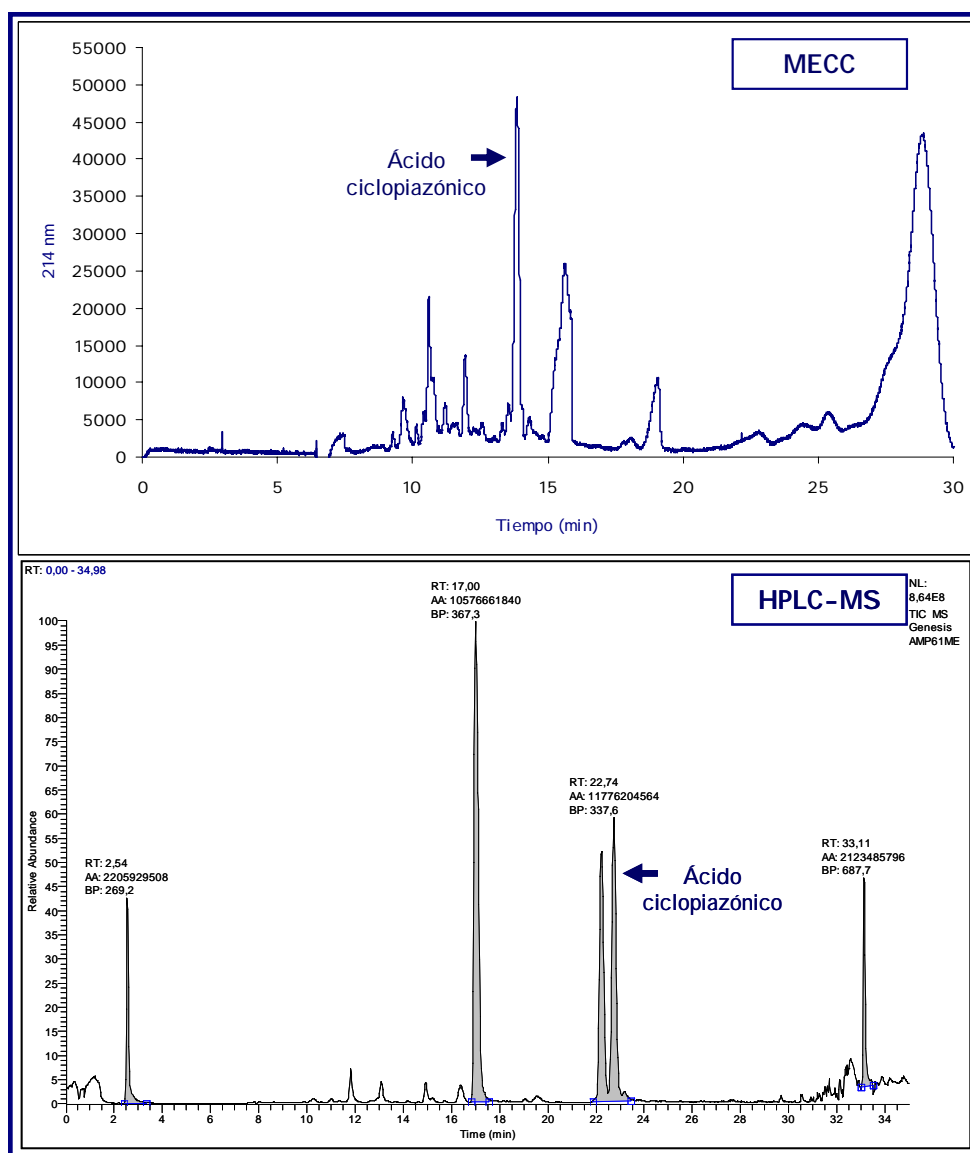


Figura IV.5. Electroferograma y cromatograma obtenidos mediante MECC y HPLC-MS a partir del extracto clorofórmico de *P. camemberti* AMP61 incubado en MEB durante 15 días a 25°C.

A diferencia de lo ocurrido con las demás micotoxinas, la verrucosidina producida por los dos aislados caracterizados como *P. polonicum*, concretamente CSII42 y CSII52, únicamente pudo detectarse mediante HPLC-MS, posiblemente debido a que ambos mohos la produjeron en pequeñas cantidades (Tabla III.7). La gran mayoría de los aislados de alimentos de esta especie producen verrucosidina

(Lund y Frisvad, 1994), incluyendo los procedentes de jamón curado (Díaz, 1999; Núñez y col., 2000).

En los extractos de los aislados caracterizados como *P. viridicatum* no se detectaron micotoxinas. En cambio, se han descrito cepas de *P. viridicatum* que producen octatoxina A en cereales (Pohland y col., 1992), citrinina en jamón (Wu y col., 1974a), o ácido ciclopiazónico en medios de cultivo constituidos únicamente por extracto de levadura y sacarosa (Tabuc y col., 2004).

La bibliografía recoge abundantes evidencias de que *P. solitum* produce gran variedad de metabolitos secundarios tóxicos de las familias de las ciclopeninas, viridicatinas y compactinas (Frisvad y Filtenborg, 1989; Svendsen y Frisvad, 1994; Lund, 1995b; Pitt y Hocking, 1997). Incluso se han detectado dichas toxinas en extractos obtenidos *in vitro* a partir de cepas de *P. solitum* aisladas de jamón (Díaz, 1999). No obstante, estas toxinas no pudieron detectarse en los extractos de los aislados caracterizados como *P. solitum* (Tabla IV.2). Por otra parte, estos mohos no produjeron en cantidad detectable ninguna de las micotoxinas estudiadas (Tabla III.6).

En los extractos clorofórmicos obtenidos de *P. olsonii* RP42C no se detectó ninguna de las 22 micotoxinas analizadas, lo que corresponde con los resultados obtenidos en un estudio realizado con cepas de *P. olsonii* aisladas de chorizo (López-Díaz y col., 2001). De manera similar, en los extractos de las 3 cepas de *P. nalgiovense* seleccionadas tampoco se detectó ninguna micotoxina, si bien era lo esperable dado que se incluyeron en el presente estudio precisamente porque habían sido descritas como no toxigénicas en la bibliografía (Núñez y col., 1996b; Díaz, 1999; Geisen, 2000).

Finalmente, el hecho de que por el objetivo del presente estudio se hayan descartado la mayoría de mohos del género *Aspergillus/Eurotium*, hacía poco probable que se obtuviesen aislados productores de aflatoxinas, dado que dicho

género incluye las especies productoras aisladas de productos cárnicos madurados (Strzelecki y col., 1969; Escher y col., 1973; Rojas y col., 1991).

La producción de micotoxinas depende de factores como el tipo de sustrato, temperatura, actividad de agua, pH o disponibilidad de oxígeno (Lacey, 1989; Núñez y col., 1999; Sosa y col., 2002), por lo que el hecho de no haber detectado ninguna micotoxina en los extractos no implica necesariamente la inocuidad de estas cepas de mohos. No obstante, para el cultivo de los microorganismos se emplearon medios de cultivo con un alto contenido en hidratos de carbono, sustrato óptimo para la producción de micotoxinas (Beuchat, 1987), lo que permite ser optimistas respecto al potencial toxigénico de las cepas seleccionadas, especialmente *P. olsonii* RP42C.

IV.2. OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN.

Para obtener los compuestos de naturaleza proteica responsables de la inhibición se utilizó en primer lugar la cromatografía de intercambio iónico, técnica empleada por numerosos autores para la obtención de péptidos con actividad antifúngica (Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Lee y col., 1999; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y col., 2003). Además, el fraccionamiento con columnas de intercambio catiónico permitió descartar las proteínas de carácter más aniónico o hidrofóbico que pudieran estar presentes en el medio de cultivo, cuya actividad está más relacionada con la toxicidad para células de mamíferos que con el efecto antifúngico (Broekaert y col., 1992; Koo y col., 1998; Hong y col., 2001).

Para la obtención de los compuestos responsables de la inhibición, se seleccionaron 15 cepas incluyendo mohos de los diversos tipos de inhibición descritos en los ensayos realizados en placas multipocillo (véase Tabla III.5). La mayoría de los aislados clasificados como Tipo SC fueron descartados, ya que la

actividad mostrada por el medio de cultivo no se recuperaba íntegramente en la fase acuosa, por lo que dicha actividad podría deberse a compuestos que no fueran de naturaleza proteica.

Cada microorganismo se incubó durante 15 días a 25°C en MEB y PDB. Posteriormente se obtuvieron 28 fracciones por cromatografía de intercambio catiónico a partir del medio libre de células. La actividad de cada fracción se evaluó en placas multipocillo frente a *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332, *A. niger* An261 y *P. solitum* Ps321 (véase apartado II.2.2.1).

De igual manera, la actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de los medios de cultivo incubados sin inocular, fueron evaluadas en placas multipocillo frente a las cepas de referencia. Cabía la posibilidad de que la cromatografía de intercambio catiónico concentrara en determinadas fracciones algunos de los constituyentes de los medios, provocando un mayor o menor desarrollo de las cepas de referencia. Del mismo modo, el gradiente de NaCl utilizado para eluir las distintas fracciones, también podía tener un efecto negativo en el desarrollo de los mohos indicadores de la inhibición. De hecho, los resultados obtenidos confirmaron el efecto tanto del medio de cultivo como del gradiente de NaCl utilizado en la elución sobre las cepas de referencia (Figura IV.6).

Concretamente, las fracciones obtenidas a partir del medio PDB produjeron un retraso ($p < 0,05$) en el desarrollo de *P. solitum* Ps321 a las 96 h de incubación. Algo similar ocurrió con *P. echinulatum* Pe321, pero en este caso al incubar con las fracciones obtenidas de MEB. Por otra parte, aunque los medios de cultivo no influyeron significativamente en el crecimiento de *P. commune* Pc332, sí se detectó un menor desarrollo en las fracciones con mayor concentración de NaCl. Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en el desarrollo de *A. niger* An261 ni con los dos medios de cultivo ni con las distintas concentraciones de NaCl (Figura IV.6).

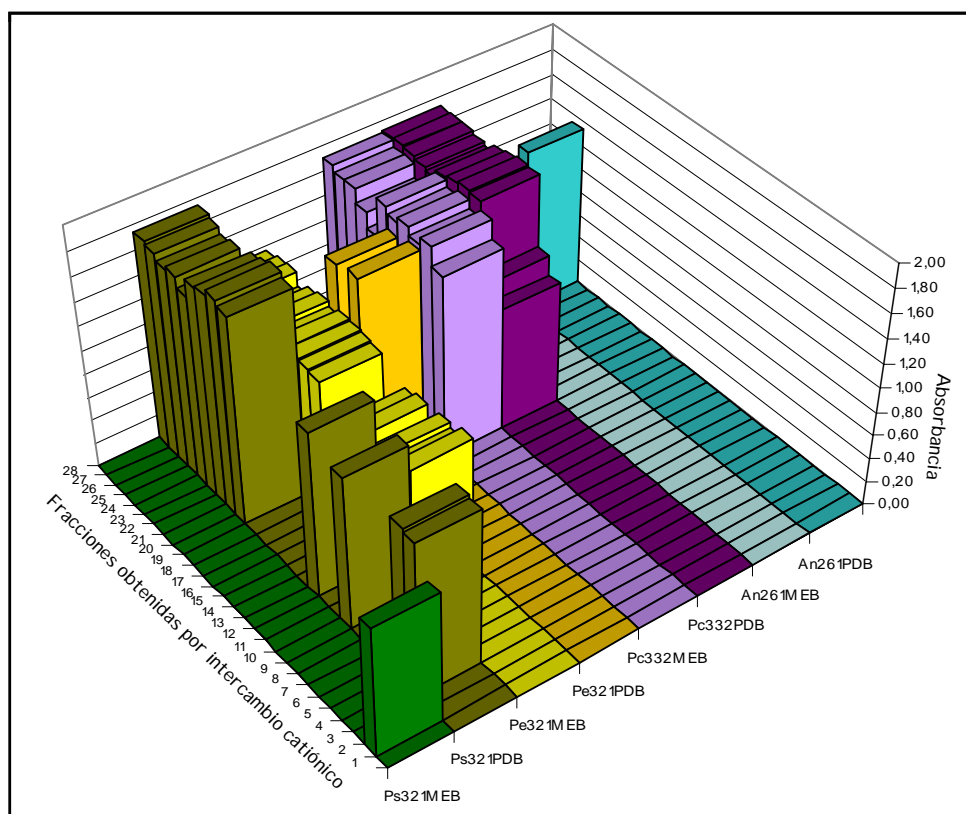


Figura IV.6. Inhibición originada por las distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de los medios de cultivo estériles sobre las cepas de referencia ($p < 0,05$) a las 96 h de incubación. Valores expresados como diferencia de absorbancia con respecto al desarrollo de las cepas de referencia en el tampón de elución A.

En las 28 fracciones obtenidas a partir de cada aislado seleccionado eluyeron los diferentes compuestos en función de su carga, y se agruparon en fracciones obtenidas con baja (fracciones A1 a A7), media (fracciones A8 a B10) y alta (fracciones B8 a C6) fuerza molar (véase apartado II.2.2.1), según la concentración de NaCl requerida para la elución.

Para la realización del estudio estadístico, se comparó el desarrollo de las cepas de referencia con cada una de las 28 fracciones obtenidas de los aislados seleccionados, con el desarrollo en presencia de las mismas fracciones obtenidas por intercambio catiónico a partir de los medios de cultivo estériles. De este modo

podía eliminarse la interferencia producida por los medios de cultivo y por el gradiente de NaCl.

En la Tabla IV.4 se muestra el tipo de inhibición en placas multipocillo mostrada por los aislados seleccionados, la fuerza molar a la que se obtuvieron las fracciones activas ($p < 0,05$) por cromatografía de intercambio catiónico a partir de los mismos, y el espectro de inhibición de las fracciones eluídas con una fuerza molar similar.

Los resultados obtenidos a partir de *P. viridicatum* DBI23 mostraron el mayor número de fracciones activas ($p < 0,05$) y fundamentalmente al ser incubado en MEB (Tabla IV.4). Esto explica los grandes halos de inhibición observados en los ensayos realizados en medio sólido (Tabla IV.1), así como la intensa actividad mostrada por la fase acuosa en los ensayos de inhibición en placas multipocillo (véase Tabla III.5).

A partir de *P. nalgiovense* BFE66, *P. camemberti* AMP61, *P. chrysogenum* AS51D y *P. olsonii* RP42C, se obtuvieron fracciones activas que eluían con baja, media y alta fuerza molar (Tabla IV.4). De manera general, las fracciones eluídas con mayor fuerza molar mostraron el espectro de inhibición más amplio, independientemente del medio de cultivo a partir del que se obtuvieron. No obstante en esos casos, la actividad de los compuestos eluídos en dichas fracciones puede estar siendo potenciada por el efecto del NaCl (Figura IV.6). Por otro lado, las que eluyeron con baja fuerza molar fundamentalmente resultaron activas frente a *P. commune* Pc332 y cuando se obtenían a partir de PDB. Las fracciones eluídas con fuerza molar media mostraron actividad en su mayoría frente a *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 (véase Tabla III.12).

Tabla IV.4. Fuerza molar de elución y espectro de inhibición de las fracciones activas obtenidas por cromatografía de intercambio iónico a partir de las cepas seleccionadas incubadas en MEB o PDB.

CEPAS	TIPO de INHIBICIÓN	FRACCIONES ACTIVAS ¹	
		Fuerza molar de elución	Espectro de inhibición ²
		B	Ps321, Pc332, An261
<i>P. viridicatum</i> DBI 23	P	M	Ps321, Pe321, Pc332, An261
		A	Ps321, Pe321, Pc332, An261
<i>P. nalgiovense</i> BFE66	F	B	Pc332
<i>P. camemberti</i> AMP61	P		
<i>P. chrysogenum</i> AS51D	P-PDB	M	Pc332, An261
<i>P. olsonii</i> RP42C	P	A	Ps321, Pe321, Pc332, An261
<i>P. solitum</i> CSI 54	SC+A	B	Pc332, An261
<i>P. solitum</i> DBI 11	SC+A		
<i>P. solitum</i> CSII 33	SC+A	M	Pc332, An261
<i>P. chrysogenum</i> RB41C	P	B	
<i>P. chrysogenum</i> AMB11	P-PDB		
<i>P. verrucosum</i> AB11C	P-MEB	M	
<i>P. commune</i> DBI I 41	P-nig		Ps321, Pe321, Pc332, An261
<i>P. solitum</i> DBI I 22	P-nig	A	
<i>P. chrysogenum</i> Pg341	SC		
<i>P. solitum</i> CBI I 57	SC+A		

¹ Fracciones activas eluidas con baja (B), media (M) y alta (A) fuerza molar obtenidas mediante cromatografía de intercambio catiónico.

² *P. solitum* Ps321, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261.

También se obtuvieron fracciones al eluir con baja y media fuerza molar a partir de las cepas de *P. solitum* DBI11, CSI54 y CSII33, activas fundamentalmente frente a *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 (Tabla IV.4). No obstante, la fase acuosa de estos tres aislados sólo produjo inhibición en los ensayos realizados en placas multipocillo frente a *P. commune* Pc332, y cuando se

obtenía a partir de PDB (véase Tabla III.5). Esto puede indicar que en las fracciones obtenidas con fuerza molar baja y media eluyen compuestos sensibles al tratamiento con cloroformo. De ser así, la intensa inhibición producida por *P. camemberti* AMP61, *P. chrysogenum* AS51D y *P. olsonii* RP42C en placas multipocillo podría deberse básicamente a los compuestos eluidos en las fracciones de alta fuerza molar, que además de mostrar un amplio espectro de inhibición, también resistirían el tratamiento con cloroformo.

Por otro lado, la actividad de la fase acuosa obtenida de las cepas de *P. solitum* DBI11, CSI54 y CSII33 al incubarse en PDB frente a *P. commune* Pc332 (véase Tabla III.5), no se recupera en este medio con la cromatografía de intercambio catiónico (véase Tabla III.12), por lo que puede ser debida o bien a compuestos de naturaleza proteica con carácter aniónico y resistentes al tratamiento con cloroformo, o bien a compuestos de naturaleza no proteica.

De forma similar, la actividad mostrada por la fase acuosa obtenida de *P. nalgiovense* BFE66 incubado en MEB en placas multipocillo (véase Tabla III.5) frente a *P. solitum* Ps321, *P. echinulatum* Pe321 y *P. commune* Pc332, se debe a los compuestos de alta fuerza molar resistentes al cloroformo. El hecho de no observar actividad de la fase acuosa obtenida a partir de PDB (véase Tabla III.5) y la obtención a partir de dicho medio de fracciones eluidas con baja y media fuerza molar activas frente a *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 (Tabla IV.4), corrobora la hipótesis de la sensibilidad de dichos compuestos al tratamiento con cloroformo.

Algunos de los aislados a partir de los que apenas se obtuvieron fracciones activas, como *P. chrysogenum* RB41C y AMB11, o *P. verrucosum* AB11C (véase Tabla III.12), mostraron una inhibición muy intensa al incubarse con la fase acuosa en los ensayos realizados en placas multipocillo (véase Tabla III.5). Esta actividad podría deberse a péptidos o proteínas de carácter aniónico o bien a compuestos hidrosolubles de naturaleza no proteica.

Estos resultados indican que la inhibición observada se debe a distintos compuestos activos que eluyen tanto con fuerza molar baja o media como alta y que muestran diferente sensibilidad al tratamiento con cloroformo y distintos espectros de inhibición. En este sentido, un mismo mohó puede liberar al medio un gran número de proteínas con actividades diversas. De hecho se ha descrito una cepa de *Aspergillus giganteus* que produce dos proteínas con actividad antimicrobiana: α -sarcina, que es una ribonucleasa citotóxica (Olson y Goerner, 1965; Wool, 1984; Wnendt y col., 1993), y una proteína con actividad antifúngica (Wnendt y col., 1994; Lacadena y col., 1995).

Por otra parte, existe una gran similitud en la actividad de los compuestos eluidos con alta fuerza molar (véase Tabla III.12), lo que sugiere que pudiera tratarse de proteínas de una misma familia producidas por mohos de diferentes especies de *Penicillium*. Así, se ha puesto de manifiesto una gran similitud en cuanto a tamaño, carga y estructura, entre proteínas con actividad antifúngica producidas por mohos incluso de diferente género (Nakaya y col., 1990; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999).

Para la siguiente etapa de purificación se seleccionaron las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio catiónico que mostraron mayor actividad (véase Tabla III.13), señaladas con flechas en las Figuras IV.7, IV.8 y IV.9. Se empleó la cromatografía de filtración en gel, técnica utilizada por diversos autores para la purificación de proteínas con actividad antifúngica (Lacadena y col., 1995; Martínez-Ruiz y col., 1997; Wang y Ng, 2001a,b, 2003; Chu y col., 2003; Gomes y col., 2005).

A partir de la fracción B5 eluída con alta fuerza molar obtenida de *P. olsonii* RP42C incubado en MEB o PDB (Figura IV.7), se purificó por filtración en gel una proteína de aproximadamente 9 kDa (véanse Figura III.15; Tabla III.19), activa frente a *P. solitum* Ps321, *P. echinulatum* Pe321, *P. commune* Pc332 y *A. niger* An261 (véase Tabla III.14).

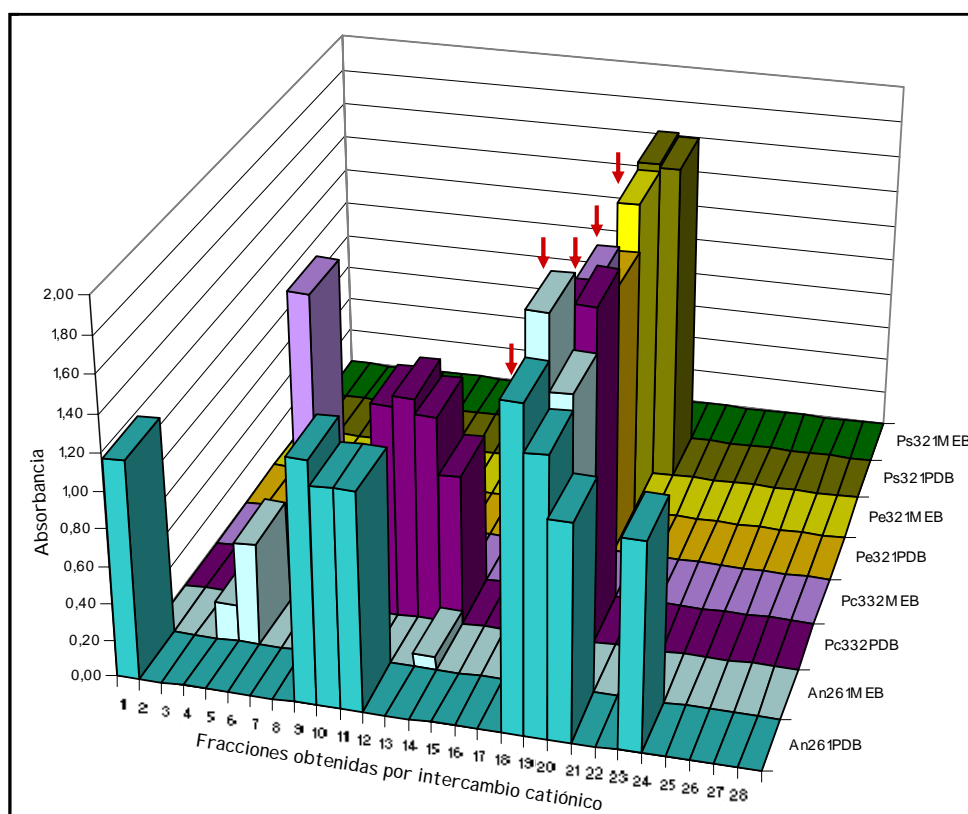


Figura IV.7. Inhibición originada por las distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de *P. olsonii* RP42C incubado en MEB y PDB sobre las cepas de referencia ($p < 0,05$) a las 96 h de incubación. Valores expresados como diferencia de absorbancia con respecto al desarrollo de las cepas de referencia con la misma fracción obtenida a partir del medio correspondiente estéril. Las flechas indican las fracciones activas ($p < 0,001$) seleccionadas para la purificación por cromatografía de filtración en gel.

Esta proteína se seleccionó para los estudios posteriores debido en primer lugar al mayor espectro de inhibición mostrado. También resultó de gran interés el hecho de que fuera la proteína de mayor carácter catiónico purificada, característica relacionada por un lado con una mayor actividad antifúngica y por otro con un menor efecto tóxico para las células de mamíferos (Hong y col., 2001). Finalmente, su menor peso molecular podría conferir una mayor resistencia frente al ataque de proteasas presentes en los productos cárnicos madurados, ya sean liberadas por mohos desarrollados en la superficie de estos productos (Trigueros y col., 1995; Rodríguez y col., 1998; Benito y col., 2002; Martín y col.,

2002), o bien utilizadas para acelerar el proceso de elaboración (Roncalés, 1998; Fernández y col., 2000).

Por otro lado, a partir de la fracción A11 eluída con fuerza molar media obtenida de *P. chrysogenum* AS51D incubado en MEB (Figura IV.8), se purificó una proteína de aproximadamente 38 kDa (véanse Figura III.15; Tabla III.19) activa frente a *P. commune* Pc332 (véase Tabla III.16). Esta proteína podría ser también responsable de la actividad frente a *A. niger* An261 mostrada tanto por la fase acuosa (véase Tabla III.5), como por la fracción A11 que eluye con fuerza molar media (véase Tabla III.12).

Se ha descrito una proteína antifúngica de 12 kDa producida por una cepa de *P. chrysogenum* que muestra actividad frente a *A. niger* (Marx y col., 1995), al igual que la producida por *P. chrysogenum* AS51D. No obstante, no puede tratarse de la misma proteína ya que la de 12 kDa no se detecta al cultivar en medios con un 2% de glucosa, como es el caso del agar o caldo extracto de malta, al estar su expresión regulada por la fuente de carbono (Marx y col., 1995).

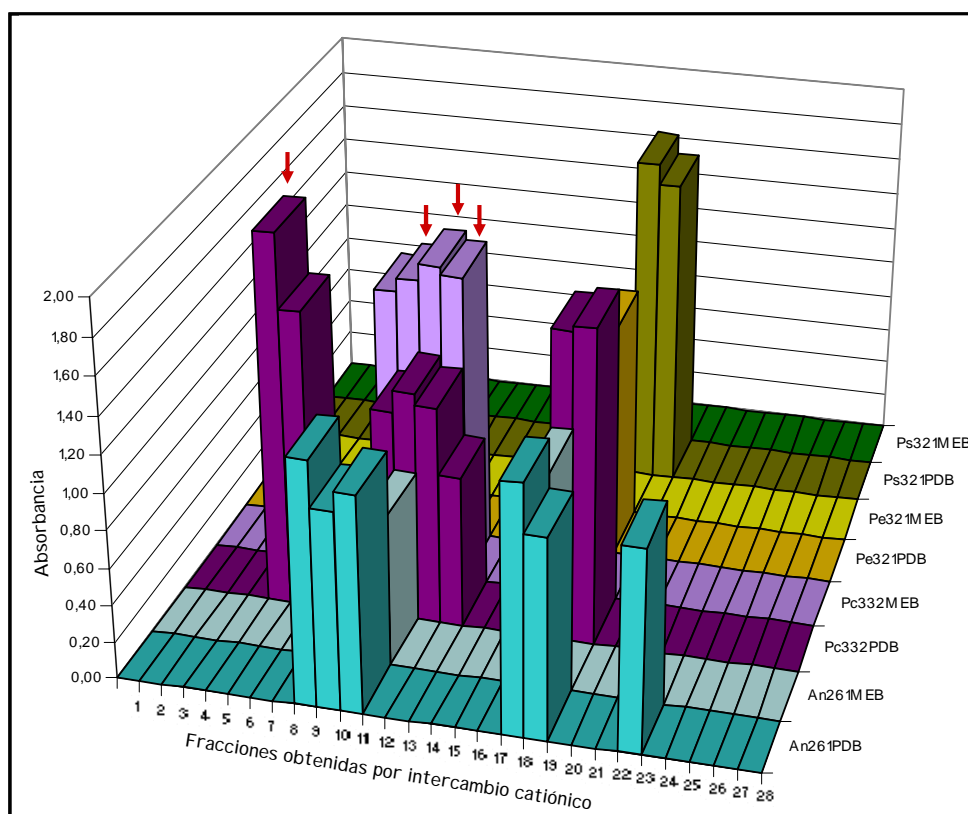


Figura IV.8. Inhibición originada por las distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de *P. chrysogenum* AS51D incubado en MEB y PDB sobre las cepas de referencia ($p < 0,05$) a las 96 h de incubación. Valores expresados como diferencia de absorbancia con respecto al desarrollo de las cepas de referencia con la misma fracción obtenida a partir del medio correspondiente estéril. Las flechas indican las fracciones activas ($p < 0,001$) seleccionadas para la purificación por cromatografía de filtración en gel.

Por otra parte, a partir la fracción A4 eluída con baja fuerza molar obtenida de *P. nalgiovensis* BFE66 incubado en PDB (Figura IV.9), se obtuvo una fracción activa frente a *P. commune* Pc332 (véase Tabla III.17), en la que eluyeron 3 compuestos de 75, 69 y 62 kDa aproximadamente (véanse Figura III.15; Tabla III.19).

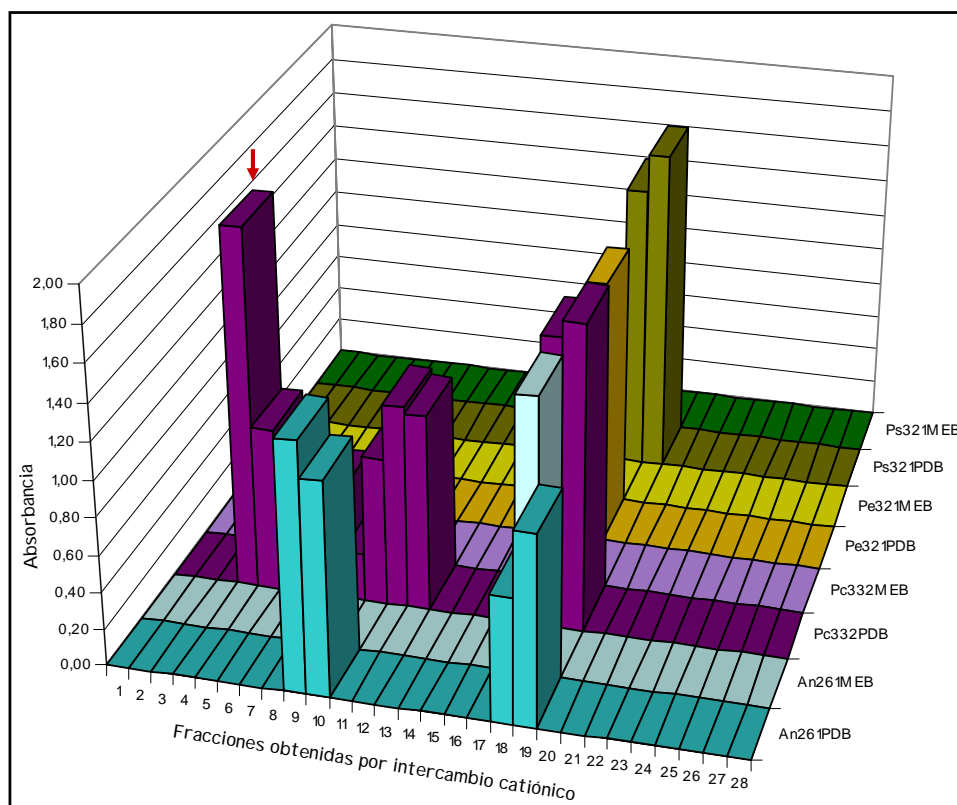


Figura IV.9. Inhibición originada por las distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de *P. nalgiovensis* BFE66 incubado en MEB y PDB sobre las cepas de referencia ($p < 0,05$) a las 96 h de incubación. Valores expresados como diferencia de absorbancia con respecto al desarrollo de las cepas de referencia con la misma fracción obtenida a partir del medio correspondiente estéril. La flecha indica la fracción activa ($p < 0,001$) seleccionada para la purificación por cromatografía de filtración en gel.

De manera similar al caso anterior, recientemente se ha secuenciado en esta misma cepa de *P. nalgiovensis* BFE66 un gen (Geisen, 2000), con alta homología con el que codifica la proteína de 12 kDa con actividad antifúngica de *P. chrysogenum* (Marx y col., 1995). Al igual que anteriormente, tampoco se ha detectado la proteína de 12 kDa en los medios donde se incubó *P. nalgiovensis* BFE66, con la diferencia de que en este caso se trata de la misma cepa. Esto puede deberse a que realmente Geisen (2000) no comprobó la producción de dicha proteína por parte de *P. nalgiovensis* BFE66, sino que lo dedujo a partir de la secuenciación del gen homólogo al de *P. chrysogenum*.

En el caso de estos dos mohos, *P. chrysogenum* AS51D y *P. nalgiovense* BFE66, los compuestos obtenidos podrían ser precursores de una proteína antifúngica de mayor peso molecular, como se ha descrito para proteínas con actividad antifúngica producidas por *P. chrysogenum* (Marx y col., 1995) y *A. giganteus* (Martínez-Ruiz y col., 1997). No obstante estos precursores, además de ser formas inactivas, suelen detectarse únicamente en las primeras 48-60 h de incubación pues son rápidamente hidrolizados por proteasas extracelulares hacia las formas activas (Martínez-Ruiz y col., 1997), de menor tamaño y extremadamente resistentes al tratamiento con proteasas (Lacadena y col., 1995).

En cualquier caso, lo más probable es que las proteínas de 38 kDa, y de 75 a 62 kDa, obtenidas de *P. chrysogenum* AS51D y *P. nalgiovense* BFE66, correspondan a proteínas de mayor peso molecular diferentes a la producida por *P. chrysogenum* (Marx y col., 1995). Se han descrito multitud de proteínas antifúngicas (Selitrennikoff, 2001) entre las que se encuentran ciertas proteínas con actividad quitinasa cuyas masas están entre 26 y 43 kDa (Nielsen y col., 1997; Watanabe y col., 1999) algunas de las cuales se han aislado a partir de mohos (Mathivanan y col., 1998; Kang y col., 1999). También se han descrito proteínas con un peso molecular aproximado de 60 kDa (Zhang y col., 1999) con actividad antifúngica, que provocan la inhibición de la síntesis de proteínas, como es el caso de la α -sarcina, una ribonucleasa producida por *A. giganteus* (Wool, 1984; Wnendt y col., 1993, 1994; Hao y col., 1998).

En este sentido, debe tenerse en cuenta que tanto *P. chrysogenum* AS51D como *P. nalgiovense* BFE66, mostraron actividad en otras fracciones eluidas con alta fuerza molar, y que por lo tanto se corresponderían con lo esperable para la proteína de fuerte carácter catiónico de 12 kDa descrita para *P. chrysogenum* (Marx y col., 1995). No obstante, estas fracciones no se analizaron por cromatografía de filtración en gel porque sus características coincidían plenamente con las fracciones obtenidas a partir de *P. olsonii* RP42C, que

mostraron mayor actividad y por ello fueron las que se seleccionaron para los estudios posteriores.

Por otra parte, el aislado *P. chrysogenum* AS51D produjo ácido secalónico en cultivos *in vitro*, lo que resulta inaceptable para su utilización como cultivo protector. No obstante, esto no implica que sea capaz de producir esta micotoxina en productos cárnicos madurados, sustrato menos óptimo por su alto contenido proteico (Beuchat, 1987), ya que además a producción de metabolitos tóxicos depende de múltiples factores como ya se ha apuntado anteriormente (Lacey, 1989; Núñez y col., 1999; Sosa y col., 2002). Por todo esto, no se descarta la caracterización de las proteínas antifúngicas producidas por *P. chrysogenum* AS51D y *P. nalgiovense* BFE66 en trabajos futuros.

Finalmente, aunque las fracciones obtenidas por intercambio iónico a partir de *P. viridicatum* DBI23 (Figura IV.10), mostraron una gran actividad antifúngica (véase Tabla III.12), cuando se intentaron purificar los compuestos responsables de la inhibición mediante cromatografía de filtración en gel no se obtuvieron fracciones activas (véase Tabla III.18). Para descartar la posibilidad de que los compuestos activos no fueran detectados a 214 nm, se ensayó la actividad en placas multipocillo de todas las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel. En ese caso volvieron a obtenerse los mismos resultados. Por ello, en cada fracción obtenida por intercambio catiónico deben eluir diferentes compuestos activos (detectados o no a 214 nm), que al ser purificados por filtración en gel no reproducen por sí solos la actividad mostrada por el conjunto de estos compuestos. Asimismo, puede haber ocurrido un fenómeno similar en el caso de la fracción A5 eluida con baja fuerza molar obtenida a partir de *P. chrysogenum* AS51D incubado en PDB (Figura IV.8), a partir de la que tampoco se purificaron proteínas activas (véase Tabla III.15).

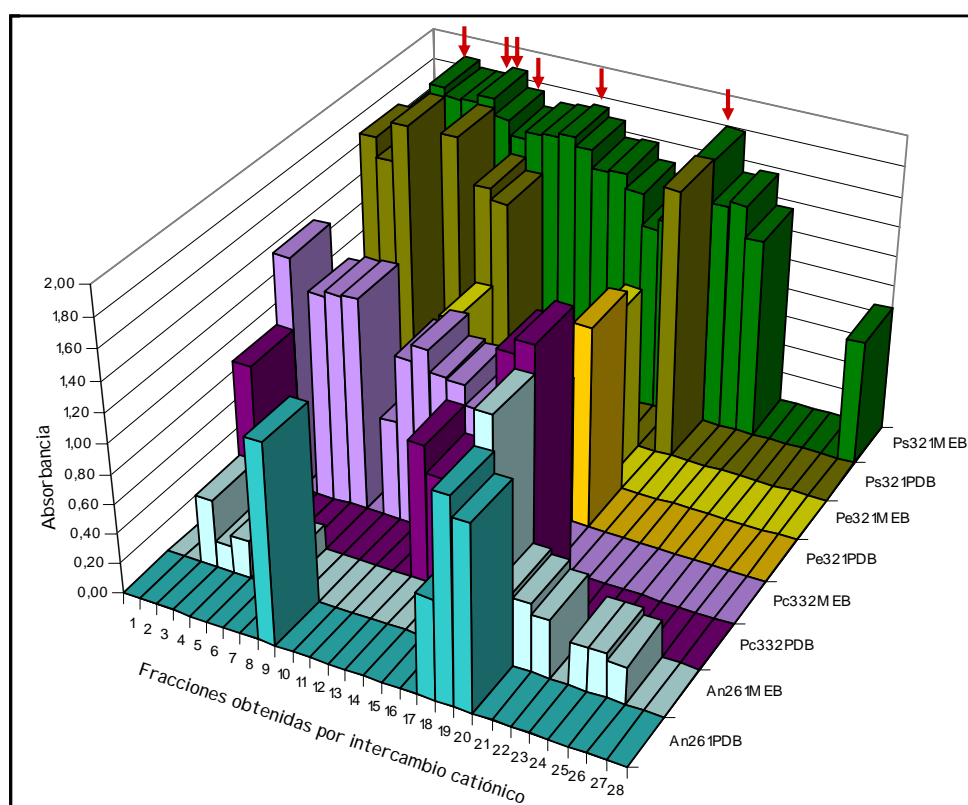


Figura IV.10. Inhibición originada por las distintas fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico a partir de *P. viridicatum* DBI23 incubado en MEB y PDB sobre las cepas de referencia ($p < 0,05$) a las 96 h de incubación. Valores expresados como diferencia de absorbancia con respecto al desarrollo de las cepas de referencia con la misma fracción obtenida a partir del medio correspondiente estéril. Las flechas indican las fracciones activas ($p < 0,001$) seleccionadas para la purificación por cromatografía de filtración en gel.

IV.3. UTILIZACIÓN DE *P. olsonii* RP42C COMO CULTIVO PROTECTOR.

La producción de una proteína con actividad antifúngica podría suponer para *P. olsonii* RP42C una ventaja adicional para competir frente al resto de mohos que se desarrollan en la superficie de los productos cárnicos madurados, lo que sería de gran valor para su utilización como cultivo protector. Para ello es necesario que el moho esté adaptado a las condiciones ecológicas del producto, es decir, que sea capaz de desarrollarse en los valores de temperatura, actividad de agua (a_w) y pH que se dan a lo largo del proceso de maduración.

Entre la población fúngica que se ha aislado de la superficie de distintos productos cárnicos madurados, se encuentra con frecuencia *P. olsonii* (Andersen, 1995; López-Díaz y col., 2001; Ludemann y col., 2004). De hecho, en el presente trabajo se obtuvieron aislados de *P. olsonii* tanto en postsalado, como en secadero y bodega (véase Figura III.2), lo que refleja una adecuada capacidad de desarrollo durante el proceso de maduración. Además, en un estudio realizado recientemente se comprobó el desarrollo de cepas de *P. olsonii* aisladas de productos cárnicos madurados en un amplio rango de temperaturas (10 a 25°C), pHs (4,5 a 6,0) y a_w (0,86 a 0,99), incluso equiparables a las de una cepa de *P. nalgiovense* utilizada frecuentemente como cultivo iniciador en productos cárnicos madurados (López-Díaz y col., 2002).

En los ensayos en los que se inoculó *P. olsonii* RP42C en el medio de extracto de carne (ECB; véase Tabla III.21), para simular las condiciones de fuente de nitrógeno, pH y temperatura que se dan durante el proceso de elaboración algunos productos cárnicos madurados (Córdoba y col., 1994; Rodríguez y col., 1994; Núñez y col., 1996a,b; López-Díaz y col., 2002), se observó que este microorganismo es capaz de crecer a pH 4,5; 5,5 y 6,5; y a temperaturas de 15, 20, 25 y 30°C, cuando la a_w del medio es de 0,99. A valores de 0,96 de a_w se registró un mayor desarrollo del moho, excepto al incubar a pH 4,5 a temperaturas de 15 y 30°C.

Sin embargo, en ninguna de las combinaciones ensayadas con a_w de 0,96 se detectó la producción de la proteína antifúngica (véase Tabla III.21). En estudios realizados con *A. giganteus* se ha comprobado que no existe correlación entre el nivel de crecimiento del moho y la producción de su proteína activa (Meyer y col., 2002). En este caso además, la expresión de la proteína antifúngica se induce en condiciones de estrés (Meyer y col., 2002), lo que podría explicar la mayor concentración de proteína activa obtenida con *P. olsonii* RP42C a a_w de 0,99, cuando el desarrollo del micelio es menor.

Generalmente se detectó una mayor concentración de proteína activa al incubar a pH 4,5, siendo este uno de los factores que mayor influencia tienen en la producción de metabolitos secundarios en mohos (Espeso y col., 1993; Tilburn y col., 1995; Then Bergh y Brakhage, 1998; Denison, 2000; Schmitt y col., 2001). De hecho, la proteína antifúngica producida por *A. giganteus* no se detecta en condiciones ácidas de cultivo, y su concentración va aumentando conforme se incrementa el pH hasta alcanzar los niveles máximos a pH 8 (Meyer y col., 2002).

A partir de *P. olsonii* RP42C se obtuvo aproximadamente el doble de proteína activa al cultivarse en MEB (véase Tabla III.20) que al ser cultivado en ECB (véase Tabla III.21), por lo que la producción de la proteína activa podría estar regulada por la fuente de N o C presente en el medio (Marzluf, 1993; Ruijter y Visser, 1997; Wilson y Arst, 1998). Las condiciones de cultivo pueden modular la producción de determinados metabolitos (Cortassa y col., 2000). De hecho, la regulación de la expresión de proteínas en función de la fuente de N o C se ha descrito para cepas de *P. chrysogenum* (Haas y Marzluf, 1995; Haas y col., 1995) y *A. nidulans* (Kulmburg y col., 1993; Cubero y Scazzochio, 1994; Mathieu y Felenbok, 1994; Strauss y col., 1999; Mathieu y col., 2001) respectivamente. Del mismo modo, la expresión de una proteína con actividad antifúngica producida por *P. chrysogenum* está regulada por el metabolismo del C y del N (Marx y col., 1995), a diferencia de otra purificada a partir de *A. giganteus* en cuya expresión toma más importancia el pH del medio de cultivo (Meyer y col., 2002).

Para bajar la a_w de 0,99 hasta 0,96 se incrementó la concentración de extracto de carne de un 2,5% hasta un 20%, y además se añadió un 5% de NaCl. Este incremento en la fuente de N puede ser el responsable de que no se produzca la proteína activa aun habiendo un mayor desarrollo fúngico en comparación con el detectado a a_w de 0,99 (véase Tabla III.21). A diferencia de las observaciones realizadas con *A. giganteus* (Meyer y col., 2002), el aumento en la concentración de NaCl no conlleva un incremento en la producción de proteína activa en *P.*

olsonii RP42C (véase Tabla III.21), si bien en ese caso se incrementó simultáneamente la concentración de extracto de carne.

Los resultados obtenidos apuntan a la necesidad de comprobar directamente en carne a distintos valores de a_w la capacidad de *P. olsonii* RP42C de producir la proteína con actividad antifúngica, ya que las condiciones de cultivo ejercen una gran influencia en la producción.

Finalmente, el cultivo simultáneo de *A. giganteus* con diferentes microorganismos altera la producción de la proteína con actividad antifúngica, pudiendo tanto desencadenarla como suprimirla (Meyer y Stahl, 2003). Este hecho resulta de gran importancia si el moho productor va a destinarse a la utilización como cultivo protector para la elaboración de productos cárnicos madurados, en los que la población de mohos en la superficie es muy diversa y alcanza un gran desarrollo. Por ello, no sólo es necesario comprobar la producción de proteína antifúngica por parte de *P. olsonii* RP42C en los productos cárnicos madurados, sino también cómo se ve influida por la presencia de otros microorganismos que puedan desarrollarse en las condiciones de maduración de los mismos.

Por otra parte, algunas cepas identificadas como *P. olsonii* que han sido aisladas de productos cárnicos madurados, mostraron actividad proteolítica y lipolítica (Ludemann y col., 2004), aptitudes deseables en mohos utilizados como cultivos iniciadores para la elaboración de productos cárnicos madurados. Además, *P. olsonii* es una especie fúngica considerada como no toxigénica (Frisvad, 1988; Pitt y Hocking, 1997). De hecho, cepas aisladas de productos cárnicos madurados no producen micotoxinas como ácido ciclopiazónico, ácido micofenólico, patulina, ocratoxina A o roquefortina en cultivos *in vitro*, ni muestran toxicidad frente a larvas de *Artemia salina* (López-Díaz y col., 2001). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo, pues en los

extractos obtenidos a partir de *P. olsonii* RP42C no se detectó ninguna de las 22 micotoxinas estudiadas.

Por todo ello, aunque sea necesario comprobar la producción de la proteína antifúngica por parte de *P. olsonii* RP42C de forma directa en productos cárnicos madurados, este moho es posible que reúna las características deseables para ser utilizado como cultivo protector en productos cárnicos madurados.

IV.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

La cantidad de proteína necesaria para la caracterización, se obtuvo a partir de *P. olsonii* RP42C incubado en MEB a pH 4,5 durante 15 días a 25°C, ya que fueron las condiciones en las que se lograron las concentraciones más altas de proteína (véanse Figuras III.11 y III.16; Tabla III.20).

En la caracterización de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica tiene gran interés la determinación del punto isoelectrico, ya que el carácter catiónico está relacionado con la actividad antifúngica (Broekaert y col., 1992; Nielsen y col., 1997; Koo y col., 1998; Hong y col., 2001). En los últimos años se han descrito gran cantidad de proteínas y péptidos con actividad antifúngica, que se caracterizan por su fuerte carga catiónica y por la formación de estructuras anfipáticas (Maloy y Kari, 1995). La presencia de aminoácidos catiónicos sugiere la capacidad de interaccionar con los fosfolípidos aniónicos de membrana (Sitaram y Nagaraj, 1999), pudiendo provocar alteraciones en la permeabilidad de la misma. Este mecanismo de acción ha sido descrito para péptidos antimicrobianos elaborados por algunos invertebrados (Dimarcq y col., 1998) y también para algunas defensinas de plantas (Thevissen y col., 1999). Las defensinas son un grupo de proteínas y péptidos antimicrobianos producidos por mamíferos (Ganz y col., 1990), insectos (Lamberty y col., 1999) y plantas (Broekaert y col., 1995), muy similares a las proteínas antifúngicas producidas por

mohos en cuanto a su estructura, pequeño tamaño, carácter catiónico y presencia de puentes bisulfuro en su estructura. Las defensinas producidas por mamíferos e insectos, son de menor tamaño (3 a 5 KDa) y forman canales iónicos en la membrana plasmática provocando la pérdida de minerales y metabolitos esenciales (Lehrer y col., 1989; White y col., 1995). Las purificadas a partir de plantas, en cambio, provocan alteraciones en la permeabilidad de las membranas. Por otra parte, algunas de estas defensinas producidas por plantas interactúan con la membrana plasmática fúngica a través de receptores (Thevissen y col., 1997).

El análisis de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C mediante electroforesis capilar de isoelectroenfoque reveló un punto isoeléctrico de 9,22 (véase Tabla III.23), lo que indica un alto contenido en aminoácidos de carga neta positiva (histidina, lisina o arginina). Por otra parte, la electroforesis capilar en zona no mostró un máximo de absorbancia a 280 nm (véase Tabla III.22) lo que revela un bajo contenido en aminoácidos con anillos aromáticos (fenilalanina, tirosina o triptófano).

Hasta el momento sólo se han descrito tres proteínas con actividad antifúngica producidas por mohos: *Anafp* de *A. niger* (Lee y col., 1999), *afp* de *A. giganteus* (Wnendt y col., 1994; Lacadena y col., 1995) y *paf* de *P. chrysogenum* (Marx y col., 1995), con una masa aproximada de 6,6, 5,8 y 12 kDa respectivamente. Estas tres proteínas se caracterizan por su pequeño tamaño, por tener un alto contenido en residuos de cisteína y por su marcado carácter catiónico. Además, sus estructuras terciarias se encuentran estabilizadas por 3 ó 4 puentes bisulfuro formando estructuras fuertemente anfipáticas (Nakaya y col., 1990; Campos-Olivas y col., 1995; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999). Estas estructuras compactas podrían permitir la migración a través de los poros de la pared celular posibilitando la interacción de los péptidos con la membrana plasmática impidiendo de este modo el desarrollo fúngico (Huang y col., 2000; Huang y col., 2002). No obstante, también se han descrito péptidos que

no provocan la formación de canales iónicos o poros en las membranas, sino que inhiben la síntesis del ADN mediante la interacción con proteínas diana (Tailor y col., 1997). En cuanto a las proteínas antifúngicas elaboradas por mohos, únicamente ha sido detallado el mecanismo de acción de la producida por *A. giganteus*, que provoca la permeabilización de las membranas fúngicas mediante la interacción con la pared celular (Theis y col., 2003, 2005).

Como ya se ha detallado anteriormente, tanto la secuencia de aminoácidos como la conformación espacial de las proteínas con actividad antifúngica, resultan de gran interés para el estudio del mecanismo de acción. Para analizar la secuencia de aminoácidos de proteínas antifúngicas producidas por mohos, se ha utilizado la digestión con enzimas proteolíticas, análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas y secuenciación mediante degradación de Edman (Lee y col., 1999). Los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas, también pueden analizarse mediante espectrometría de masas, comparando los espectros de fragmentación en bases de datos. De este modo, se puede evaluar su similitud con proteínas recogidas en dichas bases de datos. En un primer análisis de la proteína producida por *P. olsonii* RP42C en el Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid, se realizó una digestión con tripsina previa al análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La fragmentación no fue lo suficientemente buena como para comparar los espectros obtenidos en bases de datos. No obstante, las distintas masas detectadas parecían terminar en los aminoácidos TLTPV. Puesto que el paso previo al análisis fue la digestión con tripsina, y ésta corta detrás de arginina o lisina, la secuencia de estos cinco aminoácidos debe corresponder al extremo carboxilo terminal. Los tres últimos aminoácidos, TPV, coinciden con el final de la secuencia de la proteína antifúngica producida por *A. niger* (Lee y col., 1999). El motivo de la deficiente fragmentación de la proteína con tripsina puede ser que la proteína tenga en su secuencia pocos residuos de arginina o lisina, o bien por su resistencia al tratamiento con dicha enzima. Se han descrito péptidos antifúngicos producidos por mohos muy resistentes al tratamiento con enzimas proteolíticas

(Lacadena y col., 1995), lo que se atribuye a su compacta estructura estabilizada por puentes bisulfuro (Nakaya y col., 1990; Campos-Olivas y col., 1995; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999). Por otra parte, en un análisis posterior de la proteína mediante degradación de Edman se obtuvo la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal: LSLFGGEKSLKH, que al igual que en el caso de la secuencia obtenida mediante MALDI-TOF, no mostró homologías con secuencias de aminoácidos de proteínas antimicrobianas descritas en bases de datos.

Por otra parte, los análisis realizados con la proteína sin digerir tanto en el Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC en Barcelona mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como en el Laboratorio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en Madrid mediante SELDI-TOF, mostraban un pico de mayor intensidad de unos 6 kDa, otro mucho más pequeño sobre 3 kDa, y otro aún mucho más pequeño de aproximadamente 13 kDa (véanse Figuras III.20 y III.21). Esto es congruente con la masa aproximada de 9 kDa observada en los geles de poliacrilamida (véanse Figura III.15; Tabla III.19). Según los espectros de MALDI-TOF y SELDI-TOF la masa molecular del péptido producido por *P. olsonii* RP42C es de unos 13 kDa (aproximadamente 103 aminoácidos), y las otras dos señales a 6 y 3 kDa corresponderían a iones moleculares con dos o cuatro cargas respectivamente, ya que el espectrómetro de masas mide relaciones masa/carga. En este caso, la especie molecular que se produce en las condiciones en las que se realizaron los análisis (matriz, fuerza del láser, etc.) es la de carga 2+. Por otro lado, los resultados obtenidos con las matrices CHCA y SPA mediante SELDI-TOF fueron muy similares entre sí (véase Figura III.21). En la espectrometría de masas SELDI-TOF, la matriz no sólo sirve para absorber el exceso de energía producida por el láser, sino que se selecciona para un analito concreto. Concretamente, las matrices CHCA y SPA se utilizan respectivamente para análisis de pequeñas proteínas o de más de 10 kDa. El hecho de obtener los mismos resultados con ambas matrices indica que la proteína está purificada.

ESPECTRO DE INHIBICIÓN.

Aunque las tres proteínas antifúngicas producidas por mohos que se describen en la bibliografía manifiestan grandes similitudes en cuanto a tamaño, carga y estructura (Nakaya y col., 1990; Campos-Olivas y col., 1995; Lacadena y col., 1995; Marx y col., 1995; Lee y col., 1999), muestran grandes diferencias con respecto al espectro de inhibición. Concretamente, el péptido producido por *A. niger* muestra una intensa actividad frente a diversos mohos de especies e incluso géneros diferentes (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Trichosporon spp.*), levaduras y bacterias (Lee y col., 1999). Por el contrario, la proteína producida por *A. giganteus*, además de no resultar activa frente a bacterias o levaduras, únicamente inhibe a determinadas especies de mohos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma*, no resultando activa frente a cepas del género *Aspergillus* (Lacadena y col., 1995).

En los ensayos realizados con la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C para evaluar el espectro de inhibición y el efecto de la concentración del compuesto activo (véase Tabla III.24), se observó un comportamiento diferente según el moho de referencia utilizado (Figura IV.11).

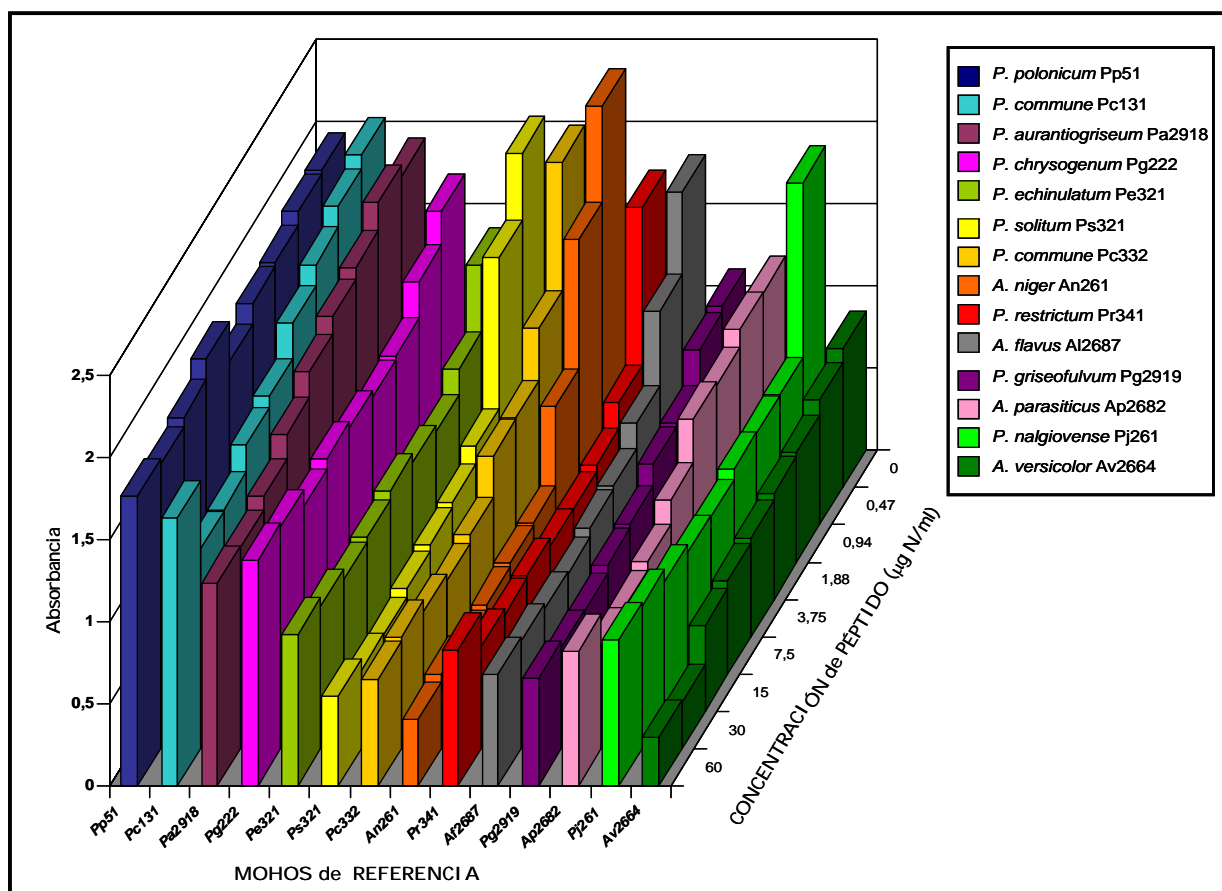


Figura IV.11. Efecto de distintas concentraciones (0 a 60 $\mu\text{gN/ml}$) de la proteína producida por *P. olsonii* RP42C sobre el desarrollo de las cepas de referencia a las 96 h de incubación.

Concretamente, se detectaron mohos, como *P. commune* Pc131, *P. polonicum* Pp51 y *P. aurantiogriseum* Pa2918, resistentes a la proteína independientemente de la concentración utilizada (véase Tabla III.24), como se muestra en la Figura IV.12. Por el contrario, otros como *A. niger* An261, *A. flavus* Af2687 y *P. chrysogenum* Pg222, mostraron una gran sensibilidad en todas las condiciones ensayadas (véase Tabla III.24), como se muestra en la Figura IV.13.

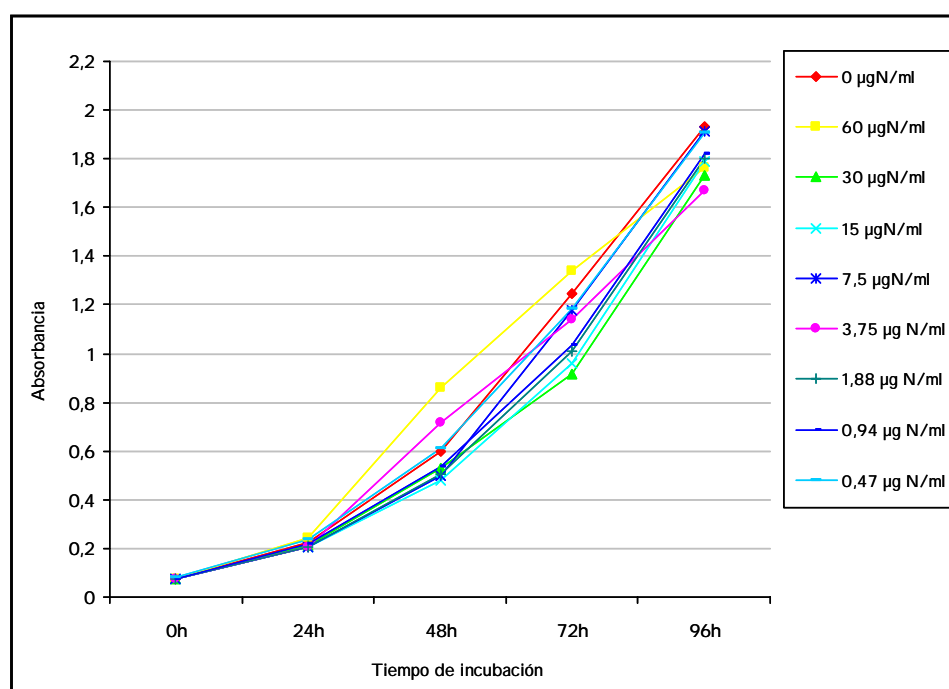


Figura IV.12. Crecimiento de *P. polonicum* Pp51 en presencia de diferentes concentraciones (0,47 a 60 µgN/ml) de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C a lo largo de 96 h de incubación.

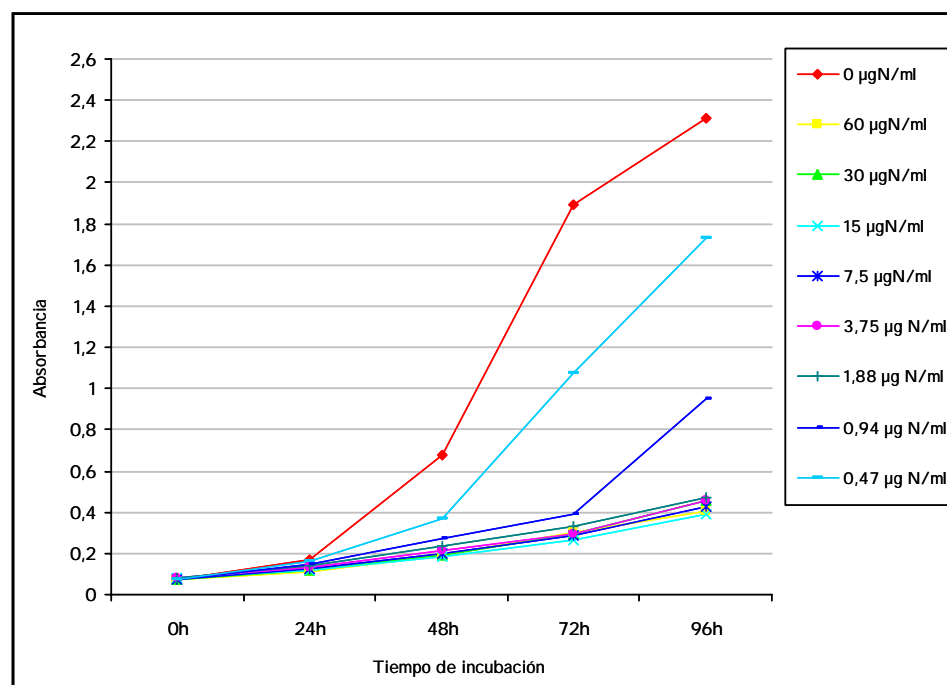


Figura IV.13. Crecimiento de *A. niger* An261 en presencia de diferentes concentraciones (0,47 a 60 µgN/ml) de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C a lo largo de 96 h de incubación.

Por otro lado, el efecto de la proteína antifúngica en algunas cepas, como *P. commune* Pc332, *P. restrictum* Pr341 y *P. jensenii* Pj261, sólo se hizo patente a partir de las 48-72 h de incubación independientemente de la concentración de proteína utilizada (véase Tabla III.24), como se muestra en la Figura IV.14. Otras cepas como *P. solitum* Ps321 y *P. griseofulvum* Pg2919, resultaron sensibles sólo a concentraciones altas de proteína pero a lo largo de todo el periodo de incubación (véase Tabla III.24), como se muestra en la Figura IV.15.

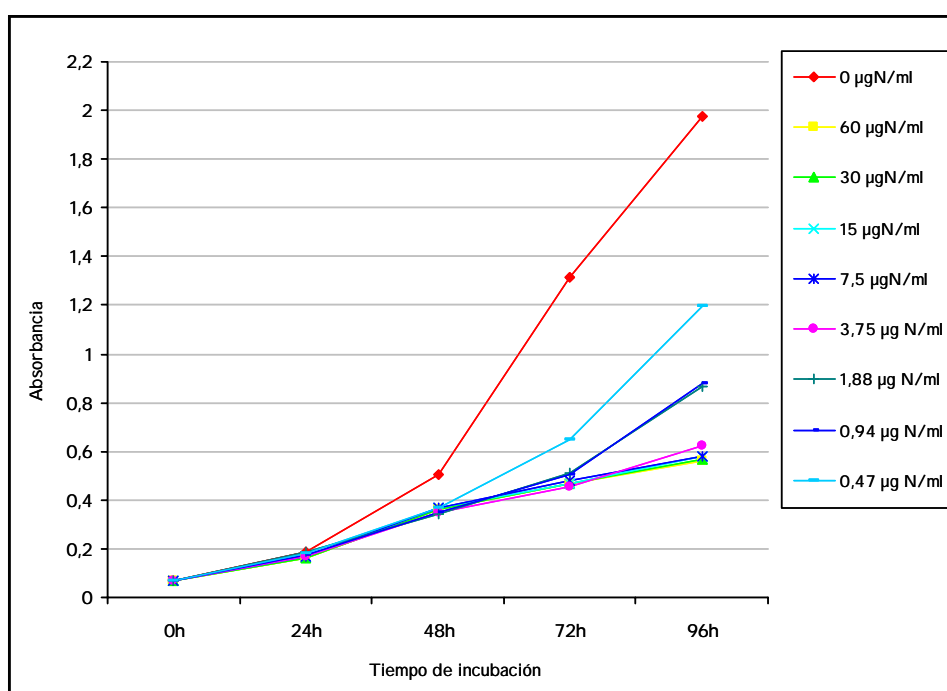


Figura IV.14. Crecimiento de *P. commune* Pc332 en presencia de diferentes concentraciones (0,47 a 60 µgN/ml) de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C a lo largo de 96 h de incubación.

Finalmente, la actividad de la proteína antifúngica frente a otros mohos, como *A. versicolor* Av2664, *A. parasiticus* Ap2682 y *P. echinulatum* Pe321, fue menor conforme disminuía la concentración utilizada y aumentaba el tiempo de incubación (véase Tabla III.24), como muestra la Figura IV.16.

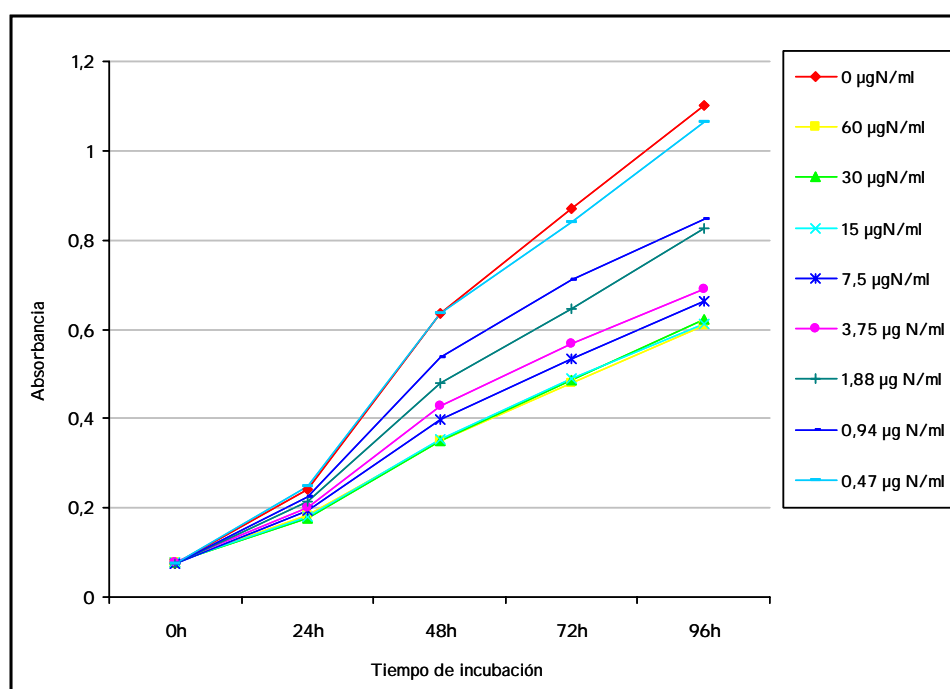


Figura IV.15. Crecimiento de *P. griseofulvum* Pg2919 en presencia de diferentes concentraciones (0,47 a 60 µgN/ml) de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C a lo largo de 96 h de incubación.

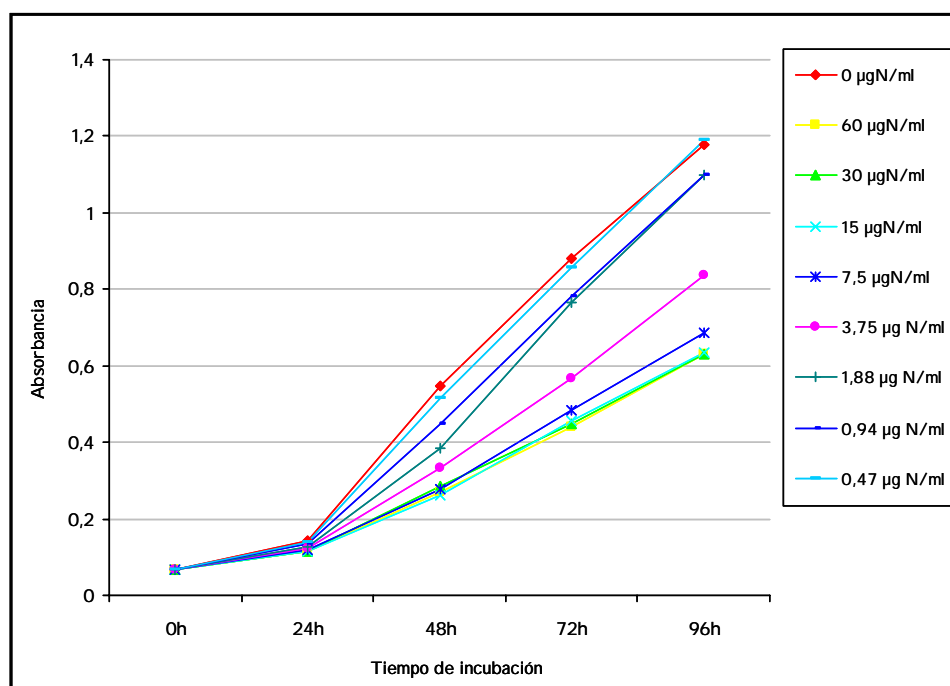


Figura IV.16. Crecimiento de *A. parasiticus* Ap2682 en presencia de diferentes concentraciones (0,47 a 60 µgN/ml) de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C a lo largo de 96 h de incubación.

Por otra parte, la actividad de la proteína activa mostrada en placas multipocillo, se comprobó en un ensayo de inhibición radial en medio sólido frente a algunas de las cepas de referencia (véase apartado II.2.4.6). Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriormente descritos. De hecho, en las placas inoculadas con *P. commune* Pc131 y *P. aurantiogriseum* Pa2918, no se apreciaban halos de inhibición (véase Figura III.23). En cambio, en las placas inoculadas con *A. niger* An261, *P. commune* Pc332, *A. flavus* Af2687, *A. versicolor* Av2664 y *P. chrysogenum* Pg222, los halos de inhibición permanecieron visibles en muchos casos incluso 17 días.

El efecto de algunas proteínas antimicrobianas, como las defensinas, se ha explicado por una interacción con los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática (Kagan y col., 1990; Cociancich y col., 1993; De Lucca y Walsh, 1999). Sin embargo, la distinta respuesta de los mohos sensibles ante la proteína producida por *P. olsonii* RP42C, parece indicar que la interacción con la membrana fúngica podría estar mediada por receptores específicos (Oberparleiter y col., 2003; Theis y col., 2003). Así, los mohos, como *P. polonicum* Pp51 (Figura IV.12), que no dispongan de dianas concretas en su membrana serían resistentes al tratamiento antifúngico (véase Tabla III.24), pudiendo incluso degradar la proteína por los procesos metabólicos normales, tal como se ha descrito para la proteína antifúngica de *A. giganteus* (Theis y col., 2003). Por otra parte, la sensibilidad moderada que muestran algunos mohos, como *P. commune* Pc131 y *P. aurantiogriseum* Pa2918 (véase Tabla III.24), puede explicarse por interacciones con dianas similares a los receptores específicos de la proteína antifúngica. De hecho, en algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* se han descrito receptores que son responsables de la sensibilidad de estas levaduras al tratamiento con determinadas defensinas de plantas, ya que mutantes que han perdido estas dianas son resistentes a dichas proteínas (Thevissen y col., 2000, 2004).

En el caso de algunas cepas, como *P. commune* Pc332 (Figura IV.14), *P. restrictum* Pr341 y *P. jensenii* Pj261, la sensibilidad al tratamiento con la proteína antifúngica sólo se hace patente a partir de las 48-72 h de incubación (véase Tabla III.24). Esto puede ser explicado por el modelo propuesto para bacterias por Huang (2000) según el cual, las proteínas con actividad antimicrobiana se van incorporando a la membrana plasmática permaneciendo en un estado inactivo. Mientras la relación proteína/lípidos de membrana es baja, el péptido tiende a ser adsorbido por los lípidos manteniéndose en un estado inactivo. Cuando se supera un determinado nivel de proteína/lípidos, que es diferente para cada microorganismo sensible, el péptido origina poros en la membrana que resultan letales para la célula. Esto podría explicar la ausencia de actividad frente a algunas cepas, como *P. solitum* Ps321 y *P. griseofulvum* Pg2919 (Figura IV.15), hasta que no se alcanzan determinadas concentraciones de proteína (véase Tabla III.24). También es posible que la conformación de la proteína sufra modificaciones en función de la concentración a la que se encuentre, pasando de un estado inactivo a otro activo. La concentración que limita estos cambios en la estructura también parece ser específica para cada una de las especies sensibles, particularmente de la composición lipídica de la membrana plasmática, lo que explicaría el efecto de las diferentes concentraciones de proteína frente a las distintas cepas de referencia (Huang, 2000).

Por otro lado, la pérdida de actividad de la proteína antifúngica conforme aumenta el tiempo de incubación que se observa en el caso de *A. versicolor* Av2664, *A. parasiticus* Ap2682 (Figura IV.16) y *P. echinulatum* Pe321 (véase Tabla III.24), puede deberse a que esté siendo hidrolizada por proteasas de la cepa sensible. En este sentido, se ha descrito que cepas de mohos resistentes a la proteína antifúngica producida por *A. giganteus*, presentan en su interior gran cantidad de dicha proteína almacenada en vacuolas (Theis y col., 2003). La hidrólisis por proteasas extracelulares, aunque es posible, es menos probable, dada la resistencia al tratamiento con enzimas proteolíticos mostrada por las proteínas antifúngicas producidas por mohos (Lacadena y col., 1995).

Estudios realizados con la proteína antifúngica producida por *A. giganteus* revelan que los determinantes para la especificidad mostrada por dicha proteína residen en la capa más externa y en la pared celular de las cepas sensibles. Además la membrana plasmática representa la principal diana para la actividad antifúngica (Theis y col., 2003, 2005). En este sentido, la composición de lípidos de la membrana fúngica, es responsable de la resistencia o sensibilidad de *S. cerevisiae* y *P. pastoris* al tratamientos con determinadas defensinas producidas por plantas (Thevissen y col., 2000, 2004). Dadas las similitudes entre estas proteínas antifúngicas y las producidas por mohos, en cuanto a tamaño, carga, estructura tridimensional y puentes bisulfuro, la diferente sensibilidad de las cepas de referencia a la proteína producida por *P. olsonii* RP42C, podría explicarse por las diferencias en la composición de la membrana fúngica.

SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE DISTINTA NATURALEZA.

Durante el proceso de elaboración de los productos cárnicos madurados tiene lugar una intensa proteólisis que origina la liberación de péptidos y aminoácidos de gran importancia en la formación del sabor y aroma del producto acabado (Ventanas y col., 1992; Ordóñez y col., 1999; Martín y col., 2001). No obstante, algunos enzimas musculares como las catepsinas, consideradas las principales responsables de la proteólisis en carne (Toldrá y Flores, 1998), pueden verse inhibidas por la sal y los agentes de curado (Sárraga y col., 1989; Rico y col., 1991; Toldrá y col., 1993) a los niveles empleados en la elaboración de algunos productos cárnicos madurados (Córdoba y col., 1994; Ordóñez y col., 1999). Por ello, se ha propuesto la utilización de diferentes enzimas exógenos para estimular la proteólisis en las primeras etapas del proceso de elaboración y acelerar la maduración de ciertos productos cárnicos (Fernández y col., 2000). Entre ellos se encuentran enzimas de plantas, como bromelina, ficina y papaína (Díaz y col., 1996; Lawrie, 1998), y de microorganismos (Díaz y col., 1993; Naes y col., 1995; Hagen y col., 1996; Zapelena y col., 1997; Ansorena y col., 2000; Benito y col., 2003b). Algunos como tripsina, papaína y una proteasa producida

por *Aspergillus oryzae*, se encuentran entre los enzimas de mayor actividad en carne (Díaz y col., 1997; Simpson y col., 1998; Zapelena y col., 1999; Gerelt y col., 2000). Por todo esto, no sólo es necesario comprobar que *P. olsonii* RP42C es capaz de producir la proteína con actividad antifúngica en los productos cárnicos madurados, sino que también resulta de gran interés el estudio de la resistencia de dicha proteína al ataque de enzimas proteolíticos que puedan ser utilizados en la elaboración de dichos productos. Por ello, se evaluó la sensibilidad de la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C al tratamiento con ficina, papaína y dos proteasas producidas por *Aspergillus oryzae* y *Streptomyces griseus*.

Por otro lado, la sensibilidad de la proteína al tratamiento con proteasas del tracto digestivo, como pepsina, lisozima o tripsina, permitiría suponer que su uso en productos cárnicos madurados resultaría aceptable ya que sería inactivada a nivel gastrointestinal, como ya se ha apuntado para bacteriocinas (Tagg y col., 1976; Daeschel y Klaenhammer, 1985; Bhunia y col., 1991; Piard y Desmazaud, 1992) y otros compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica (Nieto-Lozano y col., 2002).

Las cepas sensibles que se han utilizado para estudiar el efecto de los enzimas en la proteína activa, se seleccionaron teniendo en cuenta la sensibilidad mostrada frente al compuesto activo. Se utilizaron las cepas que mostraron mayor sensibilidad a lo largo de todo el periodo de incubación a todas las concentraciones de proteína ensayadas, es decir, *A. niger* An261 y *A. flavus* Af2687 (véase Tabla III.24). Además, se seleccionaron *P. restrictum* Pr341, sensible a todas las concentraciones de proteína utilizadas aunque únicamente a partir de las 48 h de incubación (véase Tabla III.24); y *P. griseofulvum* Pg2919, que mostró sensibilidad a lo largo de las 96 h de incubación aunque a concentraciones de proteína superiores a 1,88 µgN/ml (véase Tabla III.24).

Por otra parte, algunas proteasas microbianas pueden influir en el desarrollo fúngico (Budi y col., 2000; de Marco y Félix, 2002), por lo que era necesario comprobar si los enzimas utilizados para este estudio modificaban el crecimiento de las cepas de referencia. Únicamente se detectó un retraso ($p < 0,05$) en el crecimiento de *P. restrictum* a las 96 h de incubación al incubar con lisozima (véase Figura III.24). Del mismo modo, sólo se realizó el ensayo en un rango de concentraciones de la proteína activa que inhibían el desarrollo de las cepas de referencia, para asegurar que la pérdida de actividad se producía como consecuencia del tratamiento con los enzimas y no por un efecto de la dilución (véase Figura III.25).

En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que de manera general la proteasa de *S. griseus* fue la más activa frente a la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C. Por otra parte, el efecto del tratamiento de la proteína con el resto de enzimas dependía de la cepa utilizada como indicadora de la inhibición (véase Tabla III.25).

Tras el tratamiento con la mayoría de los enzimas ensayados, la proteína producida por *P. olsonii* RP42C pierde actividad frente a las cepas de *Aspergillus* seleccionadas, que habían mostrado la mayor sensibilidad a la proteína (véase Tabla III.24). Únicamente se mantiene el efecto inhibitor tras el tratamiento con pepsina y lisozima a las concentraciones más altas de proteína activa. Además, se observó que la proteína también pierde actividad frente a estas cepas al ser tratada con α -amilasa (véase Tabla III.25).

A diferencia de lo que ocurre frente a las cepas de *Aspergillus* ensayadas, el tratamiento de la proteína de *P. olsonii* RP42C con α -amilasa no parece afectar a su actividad antifúngica frente a las cepas de *Penicillium* (véase Tabla III.25). Por otro lado, la proteína perdió actividad frente a estas dos cepas de *Penicillium* seleccionadas al ser tratada fundamentalmente con la proteasa de *S. griseus*, si

bien a concentraciones bajas llegó a mostrar sensibilidad al tratamiento con otras enzimas (véase Tabla III.25).

Las modificaciones en la actividad de la proteína antifúngica tras el tratamiento con los diferentes enzimas sugieren un mecanismo de acción diferente según el género de las cepas sensibles. El hecho de que la proteína no se vea inactivada tras el tratamiento con α -amilasa frente a las cepas de *Penicillium* y sí pierda actividad frente a los *Aspergillus*, indica que la actividad antifúngica frente a estos últimos puede estar mediada por un grupo de naturaleza glicídica que no afecta a la actividad de la proteína frente a las cepas de *Penicillium*.

Para comprobar si se trataba de una proteína de glicosilada, la proteína activa producida por *P. olsonii* RP42C se tiñó en un gel de poliacrilamida con ácido periódico-Schiff (PAS), siguiendo el método descrito por Deepak y col. (2003). En este caso, el ácido periódico oxida a aldehídos los grupos 1,2-glicol de los polisacáridos, los cuales reaccionan con la tinción de Schiff formando bandas color magenta (Figura IV.17).

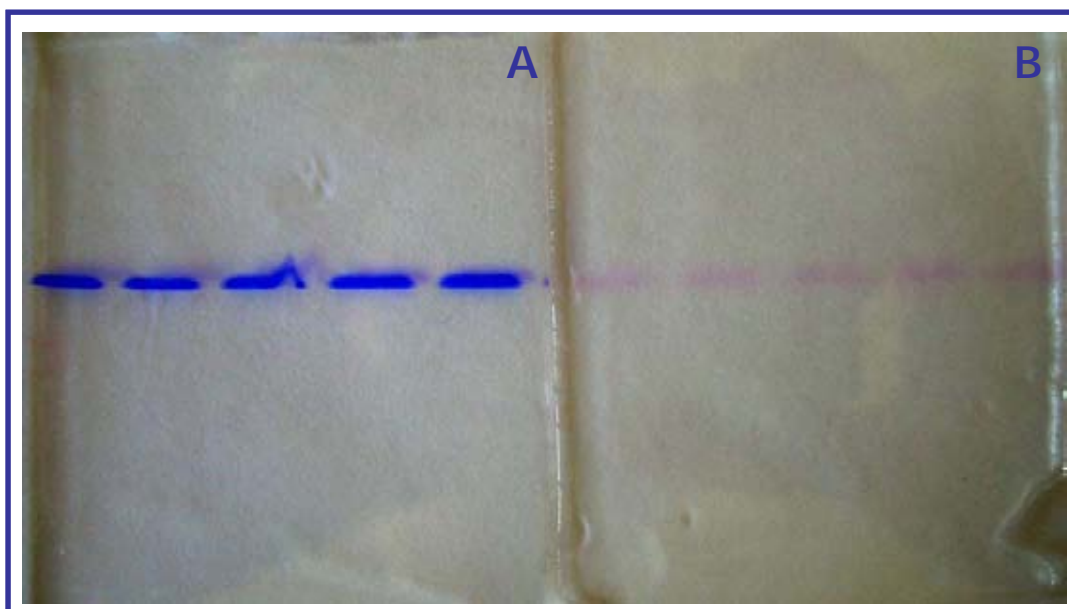


Figura IV.17. Gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) al 12% de la proteína antifúngica de *P. olsonii* RP42C, teñido con A) azul de Comassie y B) tinción de Schiff.

Por otra parte, para evaluar si el efecto de la α -amilasa originaba cambios importantes en la masa de la proteína de *P. olsonii* RP42C, se analizó mediante cromatografía de filtración en gel una preparación constituida por α -amilasa y la proteína antifúngica, que se mantuvo en agitación y en las condiciones óptimas de actuación del enzima durante 12 h (Figura IV.18).

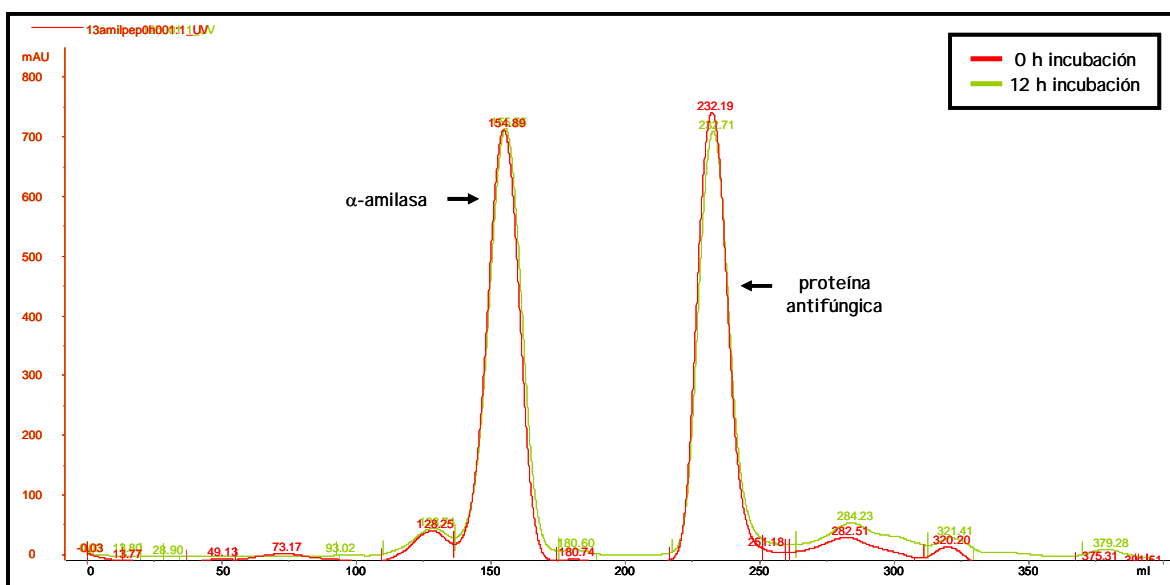


Figura IV.18. Cromatografía de filtración en gel de una preparación constituida por α -amilasa y la proteína antifúngica, antes (en rojo) y después (en verde) de un tratamiento de 12 h en las condiciones óptimas de actuación del enzima.

Los resultados obtenidos revelaron que el tratamiento con α -amilasa no origina cambios en la masa de la proteína antifúngica apreciables mediante cromatografía de filtración en gel, ya que el pico correspondiente a la proteína eluyó exactamente al mismo volumen que antes del tratamiento (Figura IV.18). También se pudo observar una ligera disminución en la absorbancia del pico correspondiente a la proteína antifúngica, por lo que es posible que la región glicídica implicada en la actividad frente a mohos del género *Aspergillus* suponga una parte mínima de la molécula.

Los carbohidratos unidos covalentemente a la cadena de un péptido pueden conferir a la glicoproteína entre otras funciones, la capacidad de interacción con el receptor (Deepak y col., 2003). Esto último explicaría la pérdida de actividad de la proteína tras el tratamiento con α -amilasa frente a las cepas de *Aspergillus* en el caso de que el mecanismo de acción frente a estos mohos estuviera mediado por receptores.

Aunque hasta el momento se desconoce la presencia de grupos glicídicos en las proteínas antifúngicas producidas por mohos, sí se ha descrito esta característica para bacteriocinas (Lewus y col., 1992; Schved y col., 1993; Keppler y col., 1994) y proteínas antifúngicas de plantas (Deepak y col., 2003), en las que se atribuye a estos carbohidratos un papel importante con respecto a la actividad antimicrobiana.

Tras el tratamiento de la proteína con enzimas proteolíticos que pueden ser utilizados en la elaboración de algunos productos cárnicos madurados (Díaz y col., 1997; Simpson y col., 1998; Zapelena y col., 1999; Gerelt y col., 2000), se apreció una pérdida de actividad frente a las cepas de referencia (véase Tabla III.25). No obstante, tanto la temperatura como el pH al que se realizó el tratamiento de la proteína (véanse apartado II.2.4.7; Tabla II.5), aún siendo condiciones óptimas de actuación de los enzimas, no son las que se dan durante el proceso de elaboración de algunos productos cárnicos madurados (Córdoba y col., 1994; Rodríguez y col., 1994; Núñez y col., 1996a,b; López-Díaz y col., 2002).

Por otra parte, la sensibilidad mostrada por la proteína al tratamiento con enzimas como tripsina, pepsina y lisozima, permite ser optimistas respecto de su uso en alimentos, ya que puede ser degradada en el tracto gastrointestinal, como ya se ha apuntado para las bacteriocinas (Sanders, 1993; Vandenberg, 1993), péptidos antimicrobianos producidos por bacterias.

IV.5. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Para obtener secuencias de ácidos nucleicos relacionadas con la síntesis de la proteína antifúngica se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del ADN extraído de *P. olsonii* RP42C. Esta técnica ha sido utilizada con la misma finalidad para un péptido antifúngico de *P. nalgiovense* (Geisen, 2000), así como para una proteasa de *P. chrysogenum* (Benito y col., 2006).

Al utilizar el primer cebador directo diseñado a partir de la secuencia amino terminal de la proteína, PepFor (36 nucleótidos), y el cebador reverso obtenido a partir de la secuencia carboxilo terminal, AnF (15 nucleótidos), no se obtuvieron productos de PCR a pesar de que se probaron distintas combinaciones tanto de concentraciones de reactivos como de temperaturas de hibridación, extensión y extensión final (véase Tabla II.7). Para optimizar la amplificación de fragmentos de ADN resulta de gran importancia tanto la temperatura óptima de unión (T_a) como la de fusión (T_m) de los cebadores utilizados. De hecho, mientras más próxima sea la temperatura de hibridación utilizada para la PCR a la T_m de los cebadores, más específica será la amplificación (Innis y Gelfand, 1990; Rychlik y col., 1990). El cebador PepFor requiere temperaturas de hibridación altas, mientras que el cebador reverso AnF, mucho más corto e inespecífico, exige temperaturas más bajas. Esto impidió la utilización de una temperatura de hibridación que resultara óptima para la amplificación con ambos cebadores y explica la ausencia de productos de PCR en estos primeros ensayos. Por ello, a partir del cebador directo PepFor se diseñaron dos nuevos cebadores más cortos, PepFor1 y PepFor2 (16 y 17 nucleótidos respectivamente), que permitieran la utilización de una temperatura de hibridación en las PCRs que resultara también adecuada para el cebador reverso AnF. En este caso se obtuvieron bandas de interés con una temperatura de hibridación de 50 y 55°C (véase Figura III.27).

Se seleccionaron 10 de los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores PepFor1+AnF y PepFor2+AnF (véase Figura III.27). A continuación, los fragmentos fueron purificados a partir del gel de agarosa (véanse apartado II.2.5.3; Figura II.8) e insertados en el vector pCR 2.1 (véanse apartado II.2.5.4; Figura II.9). Este vector posee extremos cohesivos formados por residuos de timinas, lo que favorece el anclaje de los fragmentos amplificados, ya que al ser obtenidos mediante PCR con una ADN polimerasa con actividad extendasa, poseen en los extremos colas de adeninas complementarias. Posteriormente se transformaron las células competentes de *E. coli* (véase apartado II.2.5.5). Los transformantes positivos se reconocieron como colonias blancas en las placas de agar LB con ampicilina y X-gal, donde las células sin inserto se mostraron de color azul (véase Figura III.28). El vector utilizado posee un gen de resistencia a la ampicilina, por lo que las células transformadas pueden crecer en el medio de cultivo. Además, la inserción de ADN extraño en el vector inhibe la expresión del gen *lacZ*, que codifica la producción del enzima β -galactosidasa, lo hace que los clones positivos no degraden el X-gal y crezcan como colonias blancas en las placas (McAlpin y Mannarelli, 1995).

A partir de los 10 fragmentos de ADN purificados se obtuvieron 8 transformantes positivos con inserto. La secuenciación reveló que 3 de los insertos correspondían a secuencias amplificadas por un único cebador. Por el contrario, la secuencia de 664 pb correspondía a una región de ADN amplificada por los cebadores PepFor1 y AnF, y las de 662, 178, 482 y 346 pb, a fragmentos amplificados por PepFor2 y AnF.

Las secuencias de nucleótidos de los insertos no mostraron homologías con secuencias que codifiquen proteínas antimicrobianas descritas en bases de datos.

Por otra parte, las proteínas producidas por mohos se encuentran codificadas en regiones de ADN interrumpidas por intrones. Concretamente, la proteína antifúngica producida por *P. chrysogenum* está codificada en una región de 279

pb interrumpida por dos intrones de 76 y 68 pb (Marx y col., 1995), de tamaño y posición similares a los que aparecen en el gen de la proteína de *A. giganteus* (Wnendt y col., 1994). Por ello, sería posible que cualquiera de las cinco secuencias de nucleótidos propuestas estuviera relacionada con la proteína, aun teniendo tamaños tan diferentes.

La comparación de secuencias de ADN de diferentes genes revela ciertas similitudes en cuanto a las zonas de unión de intrones y exones (Jacob y Gallinaro, 1989). La secuencia de los exones habitualmente termina en AG. Asimismo, los intrones poseen unos lugares de unión o *splice sites* que suelen ser GT en el extremo 5' y AG precedido de una cola de pirimidinas en el extremo 3' (Saxonov y col., 2000; Pertea y col., 2001). Además de estos lugares de unión, existen otras secuencias necesarias para un apropiado procesado de los intrones denominadas *branch sites*, localizadas generalmente 20 a 50 nucleótidos en dirección 5' desde el sitio de unión 3'. Al igual que en otros genes de mohos, los dos intrones presentes en la secuencia que codifica la proteína antifúngica de *P. chrysogenum* poseen una de estas secuencias para la formación del bucle que permitirá el desprendimiento del exón, concretamente RCTRAC, siendo R los nucleótidos A o G (Marx y col., 1995). No obstante, ninguna de las cinco secuencias de nucleótidos obtenidas contiene esta secuencia concreta, si bien fueron localizadas un gran número de secuencias que coinciden con los lugares de unión, por lo que no puede descartarse la presencia de intrones en estas secuencias.

Por otro lado, al estudiar las secuencias de aminoácidos correspondientes a las secuencias de nucleótidos de los cinco insertos (Figura IV.19), se pudo apreciar que nunca se reproducía exactamente la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal. Esto, unido al hecho de que la secuenciación mediante degradación de Edman no es del todo fiable, hizo pensar que la secuencia de

aminoácidos a partir de la que se diseñaron los cebadores directos podía no corresponder plenamente con la proteína.

	extremo amino	extremo carboxilo
MALDI-TOF ¹ :		T L T P V
Edman ² :	L S L F G G E K S L K H	
664 pb ³ :	L W F F G G TTGTGGTTTTTTGGGGGT	T L T P V GACCTCACACCGTG
662 pb:	E K W F K Q GAGAAGTGGTTTAAGCAG	T L T P V ACCCTCACCCAGTA
482 pb:	E K S F K Q GAGAAGAGTTTTAAGCAA	T L T P V ACCCTCACACCGTA
346 pb:	E K S F K H GAGAAGTCGTTTAAGCAT	T L T P V ACCCTAACTCCCGTT
178 pb:	E K S F K Q GAGAAGTCGTTTAAGCAA	T L T P V ACACTCACCCAGTA

Figura IV.19. Comparación de las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante 1) MALDI-TOF tras la degradación de la proteína antifúngica con tripsina, 2) degradación de Edman, y 3) traducción de los extremos de las secuencias de nucleótidos de los cinco insertos.

Por ello, se repitió el análisis de la proteína antifúngica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en el Departamento de Agricultural and Environmental Sciences de la Universidad de Nottingham. Al igual que en el primer análisis, aunque la proteína fue digerida en diferentes condiciones (con o sin reducción o alquilación previa, en presencia o ausencia de acetonitrilo, en presencia o ausencia de urea, a 40 y 50°C) se detectaron muy pocos péptidos, posiblemente debido al pequeño tamaño de la proteína. Algunos de los péptidos detectados eran versiones ligeramente distintas del mismo péptido, es decir, péptidos precursores de diferente tamaño (449+2, 477+2, 750+1) con un mismo patrón de fragmentación. Sin embargo la mejor resolución se obtuvo para la secuencia FGGESLK (Figura IV.20).

	extremo amino	extremo carboxilo
MALDI-TOF ¹ :		T L T P V
MALDI-TOF ² :	F G G E C S L K	
Edman ³ :	L S L F G G E K S L K H	

Figura IV.20. Comparación de las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante 1) primer análisis mediante MALDI-TOF tras la degradación de la proteína antifúngica con tripsina, 2) segundo análisis mediante MALDI-TOF tras la degradación de la proteína antifúngica con tripsina, y 3) degradación de Edman.

Esta secuencia es similar a la obtenida mediante degradación de Edman. De hecho difiere en un único residuo, detectándose cisteína (C) en lugar de lisina (K). Por otra parte, como de forma previa al análisis se realizó una digestión con tripsina y la tripsina corta detrás de arginina (R) o lisina (K), el residuo anterior a la fenilalanina (F) debería ser bien R o bien K, y no leucina (L) como se obtuvo mediante degradación de Edman. No obstante, también cabe la posibilidad de que este fragmento no corresponda con el extremo amino terminal de la proteína antifúngica.

Un posible péptido adicional obtenido en este análisis mediante MALDI-TOF es HNTCTYLK, aunque esta secuencia también puede resolverse como HggTCTYLK, HNTCTYiK o HggTCTYiK.

El resto de las secuencias obtenidas, pese a no ser suficientemente buenas, se detallan a continuación:

- elsgw
- glk
- nqnk o ggqnk o nqggk o ggqggk
- lfqgg...R

Al igual que ocurrió con las secuencias de aminoácidos de los extremos amino y carboxilo terminal obtenidas mediante degradación de Edman y MALDI-TOF respectivamente, no se encontró homología entre las secuencias detectadas en este último análisis y las secuencias de proteínas antimicrobianas descritas en bases de datos.

Además de estos fragmentos se detectó una masa que podría corresponder a un grupo glicídico que tampoco presenta similitudes con los de glicoproteínas recogidas en bases de datos. Por ello, es probable que la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C sea diferente a las descritas hasta el momento.

Por todo lo anterior, para profundizar en la secuenciación de la proteína sería necesario diseñar nuevos cebadores a partir de las nuevas secuencias de aminoácidos obtenidas en el último análisis por MALDI-TOF, para conseguir mediante PCR fragmentos de ADN relacionados con la proteína antifúngica. También se podría utilizar ADNc elaborado a partir del ARNm. De esta manera, se podría eliminar la interferencia ocasionada por la presencia de intrones en las secuencias de ácidos nucleicos.

No obstante, otros objetivos a corto plazo incluyen el estudio de la producción de la proteína en productos cárnicos madurados, así como la evaluación de la actividad antifúngica en dichos productos. Además se estudiarán los posibles efectos no deseados que pudiera producir la proteína antifúngica producida por *P. olsonii* RP42C en los consumidores.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.

1. Entre los diferentes mohos del género *Penicillium* presentes en la superficie de los productos cárnicos madurados se halla un alto porcentaje de mohos con actividad antifúngica, sin que exista una relación estrecha entre la presencia de mohos activos y la localización geográfica de la industria o la fase de procesado.
2. La actividad antifúngica se debe a distintos compuestos producidos por una amplia diversidad de penicilos terverticilados, de manera que incluso individuos de la misma especie muestran una actividad heterogénea.
3. Los compuestos activos obtenidos en la fase acuosa muestran distinta sensibilidad al tratamiento con cloroformo y espectros de inhibición diferentes. Entre los compuestos de naturaleza proteica producidos por diferentes especies de *Penicillium* destacan los más catiónicos por su amplio espectro de inhibición.
4. Se ha purificado una proteína con actividad antifúngica a partir de una cepa no toxigénica de *Penicillium olsonii* que muestra un amplio espectro de inhibición frente a las cepas de mohos ensayadas.
5. La cepa RP42C de *Penicillium olsonii* produce la proteína activa en condiciones similares a las de las etapas iniciales de la maduración, por lo que podría proponerse como cultivo protector para productos cárnicos madurados.

6. La proteína antifúngica seleccionada muestra una sensibilidad al tratamiento con enzimas digestivos que permite esperar una degradación suficiente en el tracto gastrointestinal para eliminar posibles efectos indeseables en los consumidores.
7. La proteína posee un grupo glicídico que parece esencial para la actividad frente a algunos mohos del género *Aspergillus*.
8. El análisis de la secuencia amino y carboxilo terminal de la proteína y de fragmentos obtenidos mediante digestión con tripsina, indica que puede tratarse de una proteína antifúngica no descrita hasta el momento.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA.

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. y Cabanes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 2650-2652.

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Accensi, F. y Cabanes, F.J. (1997). New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *J. Food Prot.* **60**, 1580-1582.

Almeida, M.S.; Cabral, K.M.S.; Zingali, R.B. y Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*). seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 278-286.

Alonso, M. (2004). Efecto de la utilización de cultivos iniciadores de *Penicillium chrysogenum* Pg222, *Debaryomyces hansenii* Dh345 y *Staphylococcus xylosus* Sx5EA en productos cárnicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura, España.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.M. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed.: Lorian, V. Williams y Wilkins, Baltimore, MD. Pp.: 52-111.

Andersen, S.J. (1995). Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. Food Prot.* **58**, 426-429.

Andersen, S.J. y Frisvad, J.C. (1994). Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 486-488.

Ansorena, D.; Astiasarán, I. y Bello, J. (2000). Influence of the simultaneous addition of the protease Flavourzyme and the lipase Novozym 677BG on dry fermented sausage compounds extracted by SDE and analyzed by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2395-2400.

Antequera, T. (1990). Evolución del componente lipídico durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura, España.

Aranda, E.; Rodríguez, M.; Benito, M.J.; Asensio, M.A. y Córdoba, J.J. (2002). Molecular cloning of verrucosidin-producing *Penicillium polonicum* genes by differential screening to obtain a DNA probe. *Int. J. Food Microbiol.* **76**, 55-61.

Baldini, P. y Raczynski, R.G. (1978). The prosciutto (raw-ham) of Parma and S. Daniele: changes in physico-chemical properties and microbial populations. *Proceedings of the IMFMT*. Parma, Italy. Pp. 107-117.

Barbieri, G.; Bolzoni, L.; Parolari, G.; Virgili, R.; Careri, M. y Mangia, A. (1992). Flavor compounds of dry-cured hams. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2389-2394.

Bayman, P. y Cotty, P.J. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canad. J. Bot.* **71**, 23-31.

Bellatti, M.; Dazzi, G.; Chizzolini, R.; Palmia, F. y Parolari, G. (1983). Physical and chemical changes occurring in proteins during the maturation of Parma hams. I. Biochemical and functional changes. *Ind. Conserve.* **58**, 143-146.

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. *Appl. Microbiol.* **68**, 3532-3536.

Benito, M.J.; Córdoba, J.J.; Alonso, M.; Asensio, M.A. y Núñez, F. (2003a). Hydrolytic activity of *Penicillium chrysogenum* Pg222 on pork myofibrillar proteins. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 155-161.

Benito, M.J.; Rodríguez, M.; Sosa, M.J.; Martín, A. y Córdoba, J.J. (2003b) Effect of protease EPg222 obtained from *Penicillium chrysogenum* isolated from dry-cured ham in whole pieces of pork loins. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 106-111.

Benito, M.J.; Córdoba, J.J. y Connerton, I.F. (2006). Genetic characterization and expression of the novel fungal protease EPg222 active in dry-cured meat products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Benz, F.; Knuesel, F.; Nuesch, J. y colaboradores. (1974). Echinocandin B, ein neuartiges polypeptide-antibiotikum aus *Aspergillus nidulans* var *echinulatus*: isolierung und bausteine. *Helv. Chim. Acta.* **57**, 2459-2477.

Berdagué, J.L.; Bonnaud, N.; Rousset, S. y Touraille, C. (1993). Influence of pig crossbred on the composition volatile compound content and flavour of dry cured ham. *Meat Sci.* **34**, 119-124.

Bernal, G.; Llanes, A. y Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Elec. J. Biotechnol.* **5**.

Berwal, J.S. y Dincho, D. (1995). Molds as protective cultures for raw dry sausages. *J. Food Prot.* **58**, 817-819.

Beuchat, L.R. (1987). *Food and beverage mycology*. Van Norstrand Reinhold. Nueva York.

Bhunja, A.K.; Johnson, M.C.; Ray, B. y Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 25-30.

Bíliková, K.; Hanes, J.; Nordhoff, E.; Saenger, W.; Kludiny, J. y Simúth, J. (2003). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters.* **528**, 125-129.

Bonnerjea, J.; Oh, S.; Hoare, M. y Dunnell, P. (1986). Protein purification: The right step at the right time. *Biotechnol.* **4**, 954-958.

Borman, S.A. (1983). Recent advances in size exclusion chromatography. *Anal Chem.* **55**, 384A.

Bremmelgaard, A. (1998). Truslen fra multiresistente mikroorganismer. *Ugeskrift for Læger.* **160**, 6329-6344.

Brennan, P.J.; Griffin, P.F.S.; Lösel, D.M y Tyrrell, D. (1974). The lipids of fungi. *Prog. Chem. Fats Other Lipids.* **14**, 49-89.

Brian, P.W.; Elson, G.W. y Lowe, D. (1956). Production of patulin in apple fruits by *Penicillium expansum*. *Nature* (London). **178**, 263.

Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A. y Vanderleyden, J. (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol.* **69**, 55-60.

Broekaert, W.F.; Mariën, W.; Terras, F.R.G.; De Bolle, M.F.C.; Proost, P.; Van Damme, J.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J. y Cammue, B.P.A. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. **31**, 4308-4314.

Broekaert, W.F.; Terras, F.R.; Cammue, B.P. y Osborn, R.W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of host defense system. *Plant Physiol*. **108**, 1353-1358.

Bruna, J.M.; Ordóñez, J.A.; Fernández, M.; Herranz, B. y de la Hoz, L. (2001a). Microbial y physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Sci*. **59**, 87-96.

Bruna, J.M.; Ordóñez, J.A.; Fernández, M.; Herranz, B. y de la Hoz, L. (2001b). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Sci*. **59**, 97-107.

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. *Int. J. Food Microbiol*. **85**, 111-125.

Buchanan, R.L. y Solberg, M. (1972). Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci*. **37**, 81-85.

Budi, S.W.; van Tuinen, D.; Arnould, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus sp.* strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *App. Soil Ecol*. **15**, 191-199.

Bullerman, L.B.; Hartman, P.A. y Ayres, J.C. (1969). Aflatoxin production in meats. II. Aged dry salamis and aged country cured hams. *Appl. Microbiol.* **18**, 718-722.

Burgos, J. (1981). Las decoloraciones en los productos cárnicos. *Cárnica 2000*. **Abril**, 49-56.

Campos-Olivas, R.; Bruix, M.; Santoro, J.; Lacadena, L.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1995). NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry*. **34**, 3009-3021.

Cantoni, C.; Rossetti, R. Y Dragoni, I. (1982). Isolation and determination of ochratoxin A in dry salami. *Ind. Aliment.* **21**, 698-699.

Carrascosa, A.V. y Cornejo, I. (1991). Caracterización de *Micrococcaceae* strains selected as potencial starter cultures in Spanish dry-cured ham process. 2. Slow process. *Fleischwirtsch.* **71**, 1187-1188.

Carrascosa, A.V.; Marín, M.E.; Avendaño, M.C. y Cornejo, I. (1988). Jamón serrano. Cambios microbiológicos y fisico-químicos durante el curado rápido. *Alimentaria* **194**, 9-12.

Carrascosa, A.V.; Marín, M.E. y Cornejo, I. (1989a). Jamón serrano. Cambios microbiológicos y fisico-químicos durante el curado lento. *Alimentaria*, **206**, 15-22.

Carrascosa, A.V.; Marín, E. y Cornejo, I. (1989b). Microbiología del curado del jamón. *Cárnica 2000*. **72**, 57-64.

Carrascosa, A.V.; Cornejo, I. y Marín, M.E. (1992). Distribution of microorganisms on the surface of Spanish dry cured hams. *Fleischwirtsch.* **72**, 1008-1010.

Castellá, M.M.; Katta, S.K.; Summer, S.S.; Hanna, M.A. y Bullerman, L.B. (1998a). Extrusion cooking reduces recoverability of fumonisin B₁ from extruded corn grits. *J. Food Sci.* **63**, 696-698.

Castellá, M.M.; Summer, S.S. y Bullerman, L.B. (1998b). Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *J. Food Prot.* **61**, 1030-1033.

Caturla, N.; Pérez-Fons, L.; Estepa, A. y Micol, V. (2005). Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **137**, 2-17.

Chang, P.K.; Cary, J.W.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Bennet, J.W.; Linz, J.E.; Woloshuk, C.P. y Payne, G.A. (1993). Cloning of the *Aspergillus parasiticus* apa-2 gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 3273-3279.

Chitarra, G.S.; Breeuwer, P.; Nout, M.J.R.; Van Aelst, A.C.; Rombouts, F.M. y Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 159-166.

Christian, J.H.B. (1980). Actividad de agua reducida. En: *Ecología microbiana de los alimentos I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*. Ed.: ICMSF. Acribia. Zaragoza. Pp.: 74-96.

Chu, F.S. (1992). Development and use of immunoassays in the detection of ecologically important mycotoxins. En: *Handbook of Applied Mycology. Vol. 5:*

Mycotoxins in ecological systems. Eds.: Bhatnagar, D.; Lil-lehoj, E.B. y Arora, D.K. Marcel Dekker, Nueva York. Pp.: 87-136.

Chu, K.T.; Liu, K.H. y Ng, T.B. (2003). Cicerarin, a novel antifungal peptide from the green chickpea. *Peptides*. **24**, 659-663.

Ciegler, A.; Vesonder, F. y Jackson, L.K. (1997). Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Appl. Env. Microbiol.* **33**, 1004-1006.

Cociancich, S.; Ghazi, A.; Hetru, A.; Hoffman, J.A. y Letellier, L. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245.

Comi, G. y Cantoni, C. (1983). Presenza di lieviti nei prosciutti crudi stagionati. *Ind. Alimentari*. **22**, 102-104.

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. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 29-34.

Conlon, J.M.; Kolodziejek, J. y Nowotny, N. (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Act.* **1696**, 1-14.

Cordero, M.R. y Zumalacárregui, J.M. (2001). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 303-306.

Córdoba, J.J. (1990). Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.

Córdoba, J.J.; Antequera, T.; Ventanas, J.; Asensio, M.A.; López-Bote, C.J. y García, C. (1991). Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Cárnica 2000* **96**, 54-63.

Córdoba J.J.; Antequera, T.; Ventanas, J.; López-Bote, C.; García, C. y Asensio, M.A. (1994). Hydrolysis and loss of extractability of proteins during ripening of iberian ham. *Meat Sci.* **37**, 217-227.

Córdoba, J.J.; Núñez, F. y Asensio, M.A. (2002). Contribution of the fungal population to the quality of dry cured ham. En: *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products*. Ed.: Toldrá, F. Research Signpost, Trivandrum, India.

Cornejo, I. y Carrascosa, A.V. (1991). Caracterización de *Micrococcaceae* strains selected as potencial starter cultures in Spanish dry-cured ham process. 1. Fast process. *Fleischwirtsch.* **71**, 66-68.

Cornejo, I.; Carrascosa, A.V.; Marín, M.E. y Avendaño, M.C. (1988). Influencia del salado, el lavado y el reposo sobre la flora superficial del jamón curado. *Cárnica 2000.* **58**, 34-35.

Cornejo, I.; Carrascosa, A.V.; Marín, M.E. y Martín, P.J. (1992). Considerations about the origin of microorganisms that grow on the deep muscular tissues of dry-cured spanish hams during processing. *Fleischwirtsch.* **72**, 1405-1407.

Cortassa, S.; Aon, J.C.; Aon, M.A. y Spencer, J.F. (2000). Dynamics of metabolism and its interactions with gene expression during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Microb. Physiol.* **43**, 75-115.

Cubero, B. y Scazzochio, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO. J.* **13**, 407-415.

Daeschel, M.A. y Klaenhammer, T.R. (1985). Association of a 13,6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1538-1541.

Dean, P.D.G.; Johnson, W.S. y Middle, F.A. (Eds.). (1985). Affinity Chromatography. En: *A practical approach*. IRL Press. Oxford.

Decker, M. y Nielsen, P.V. (2005). The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated funga of white mould cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 51-60.

Deepak, A.V.; Thippeswamy, G.; Shivakameshwari, M.N. y Salimath, B.P. (2003). Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal activity from bulbs of *Urginea indica*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **311**, 735-742.

De Lucca, A.J. y Walsh, T.J. (1999). Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **43**, 1-11.

De Marco, J.L. y Félix, C.R. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BioMed. Central Biochem.* **3**, 3-9-

Del Río, J.A.; Báidez, A.G.; Botía, J.M. y Ortuño, A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* *Food Chem.* **83**, 75-78.

Denison, S.H. (2000). pH regulation in fungi. *Fung. Genet. Biol.* **29**, 61-71.

Díaz, M.C. (1996). Identificación de micotoxinas producidas por mohos aislados de jamón curado. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Extremadura.

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 Ordoñez, J.A. (1993). Effect of the addition of the Pronase E on the proteolysis of dry fermented sausage. *Meat Sci.* **34**, 205-216.

Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, G.D.; de la Hoz, L. y Ordoñez, J.A. (1996). Effect of addition of papain on the dry fermented sausage proteolysis. *J. Sci. Food Agric.* **71**, 13-21.

Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, G.D.; de la Hoz, L. y Ordoñez, J.A. (1997). Proteolysis in dry-fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Sci.* **46**, 115-128.

Dimarcq, J.L.; Bulet, P.; Hetru, C. y Hoffmann, J. (1998). Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymer.* **47**, 465-477.

Dragoni, I.; Ravenna, R. Y Marino, C. (1980). Descrizione delle specie di *Aspergillus* isolate dalla superficie di prosciutti stagionati di Parma e San Daniele. *Archivio Veterinario Italiano.* **31**, 1-56.

Dragoni, I.; Cantoni, C. y Papa, A. (1991). Surface microflora of dry sausages in Carnia, Italy. *Ind. Aliment.* **30**, 842-844.

Du Toit, E.A. y Rautenbach, M. (2000). A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *J. Microbiol. Meth.* **42**, 159-165.

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.; Pitt, J.I. y Leistner, L. (1987). Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 42-46.

El-Kadi, I.; El-Maraghy, S. y Zohri, A.N. (1994). Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiol. Research.* **149**, 297-307.

Encinas, J.P.; López-Díaz, T.M.; García-López, M.L.; Otero, A. y Moreno, B. (2000). Yeasts populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* **54**, 203-208.

Engel, G. y Teuber, M. (1989). Toxic metabolites from fungal cheese starter cultures (*Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti*). En: *Mycotoxins in dairy products*. Ed.: Van Egmond, H.P. Pp.: 163-259. Londres. Elsevier Applied Science.

Escher, F.E.; Koehler, P.E. y Ayres, J.C. (1973). Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Appl. Microbiol.* **26**, 27-30.

Espeso, E.A.; Tilburn, J.; Arst, H.N.Jr. y Peñalva, M.A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956.

Fang, Ch.S.; Post, L.S. y Solberg, M. (1985). Antimicrobial effect and disappearance of sodium nitrite in *Staphylococcus aureus* cultures. *J. Food Sci.* **50**, 1412-1416.

Fernández, M.; Ordóñez, J.A.; Bruna, J.M.; Herranz, B. y de la Hoz, L. (2000). Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 201-209.

Fernández-Salguero, J. (1993). Tecnología de elaboración de productos cárnicos crudos-curados. Fundamentos bioquímicos y microbiológicos de la maduración. En: *Tecnología y calidad de los productos cárnicos*. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. Gobierno de Navarra.

Filtenborg, O.; Frisvad, J.C.; Lund, F. y Thrane, U. (1992). Simple identification procedure for spoilage and toxigenic mycoflora of foods. En: *Modern Methods in Food Mycology*. Eds.: Samson, R.A.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I. y King, A.D. Elsevier Science Publ. Amsterdam. Pp.: 263-273.

Filtenborg, O.; Frisvad, J.C. y Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 85-102.

Fischer, U. y Schleifer, K.H. (1980). Presence of staphylococci and micrococci in dry sausages. *Fleischwirtsch.* **60**, 1046-1052.

Flores, J.; Bermell, S. y Nieto, P. (1985). Evaluación de la calidad de los productos cárnicos. III. Jamón curado. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* **25**, 400-408.

Flores, M.; Grimm, C. C.; Toldrá, F. y Spanair, A. M. (1997). Correlation of sensory and volatile compounds of Spanish "Serrano" dry-cured ham as a function of two processing times. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2178-2186.

Francisco, J.J.; Gutiérrez, L.M.; Menes, I.; García, M.L.; Díez, V. y Moreno, B. (1981). Flora microbiana del jamón crudo curado. *Anal. Bromatol.* **33**, 259-272.

Frazier, W.C. (1967). *Food microbiology*. 2ª ed. McGraw Hill Book Co. New York.

Friedrich, C.; Scott, M.G.; Karunaratne, N.; Yan, H. y Hancock, R.E.W. (1999). Salt-Resistant Alpha-Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1542-1548.

Frisvad, J.C. (1987a). High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *J. Chromatogr.* **392**, 333-347.

Frisvad, J.C. (1987b). The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. *Bot. J. Linn. Soc.* **404**, 195-214.

Frisvad, J.C. (1988). Fungal species and their specific production of mycotoxins. En: *Introduction to Food-Borne Fungi*. Eds.: Samson, R.A. y Van Reenen-Hoekstra, E.S. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn (Holanda). Pp.: 239-249.

Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* **81**, pp. 837-861.

Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1990). Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. En: *Modern Concepts in Penicillium y Aspergillus Classification*. Eds.: R.A. Samson y J.I. Pitt. Plenum Press. New York. Pp.: 373-384.

Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (1991). Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. En: *Handbook of applied mycology: foods and feeds*. Eds.: Arora, D.K.; Mukerji, K.G. y Marth, E.H. Marcel Dekker. Inc. Nex York. Pp.: 31-68.

Frisvad, J.C. y Thrane, U. (1995). Mycotoxin production by food-borne fungi. En: *Introduction to Food-borne Fungi*. 4th ed. Eds.: R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad y O. Filtenborg. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Netherlands. Pp.: 251-260.

Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. y Thrane, U. (1989). Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 331-335.

Frisvad, J.C.; Filtenborg, O.; Lund, F. y Samson, R.A. (1999). The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. En: *Integration of modern taxonomic methods for Aspergillus and Penicillium classification*. Eds.: Samson, R.A. y Pitt, J.I. Harwood Academic Publishers. Reading. United Kingdom. Pp.: 259-277.

Fujie, A.; Iwamoto, T.; Sato, B.; Muramatsu, H.; Kasahara, C.; Furuta, T.; Hori, Y.; Hino, M. y Hashimoto, S. (2001). FR131535, a novel water-soluble echinocandin-like lipopeptide: synthesis and biological properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 399-402.

Gaborit, P.; Menard, A. y Morgan, F. (2001). Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *Int. Dairy J.* **11**, 315-325.

Ganz, T.; Selsted, M.E. y Lehrer, R.I. (1990). Defensins. *Eur. J. Haematol.* **44**, 1-8.

Ganzler, K.; Greve, K.S.; Cohen, A.S. y Karger, B.L. (1992). High-performance capillary electrophoresis of SDS-protein complexes using UV-transparent polymer networks. *Anal. Chem.* **64**, 2665-2671.

Gao, A.G.; Hakimi, S.M.; Mittanack, C.A.; Wu, Y.; Woerner, B.M.; Stark, D.M. y col. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1307-1310.

García, C.; Berdagué, J.J.; Antequera, T.; López-Bote, C.; Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (1991). Volatile compounds of dry cured Iberian ham. *Food Chem.* **41**: 23-32.

Gareis, M. y Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch. Lebensmittelhyg.* **51**, 102-103.

Gatfield, I.L. (1988). Production of flavour and aroma compounds by biotechnology. *Food Technol.* **October**, 110-169.

Geisen, R. (1993). Fungal starters cultures for fermented food: molecular aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 251-256.

Geisen, R. (2000). *P. nalgiovensis* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int. J. Food Microbiol.* **62**, 95-101.

Geisen, R.; Luecke, F.K. y Kroeckel, L. (1992). Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch.* **72**, 894-901.

Gerelt, B.; Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. (2000). Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Sci.* **56**, 311-318.

Giolitti, G.; Cantoni, C.; Bianchi, M.; Renon, P. y Beretta, G. (1971a). Microbiologia e cambiamenti nei prosciutti crudi durante la stagionatura. *Arch. Vet. Ital.* **22**, 61-68.

Giolitti, G.; Cantoni, C.; Bianchi, M.; Renon, P. y Beretta, G. (1971b). Microbiology and chemical changes in raw hams of Italian type. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 51-61.

Gomes, V.M.; Carvalho, A.O.; Da Cunha, M.; Keller, M.N.; Bloch Jr., C.; Deolindo, P. y Alves, E.W. (2005). Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. In Press.

Gqaleni, N.; Smith, J.E.; Lacey, J. y Gettinby, G. (1996). Production of the mycotoxins cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* on solid agar media: effects of water activity, temperature, and incubation time. *J. Food Prot.* **59**, 864-868.

Graham, L.S. y Sticklen, M.B. (1994). Plant chitinases. *Can. J. Bot.* **72**, 1057-1083.

Grazia, L.; Romano, P.; Bagni, A.; Roggiani, D. y Guglielmi, G. (1986). The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiol.* **3**, 19-25.

Groll, A.H.; De Lucca, A.J. y Walsh, T.J. (1998). Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* **6**, 117-124.

Grossman, P.D.; Colburn, J.C. y Lauer, H.H. (1989). Application of free-resolution capillary electrophoresis to the analytical scale separation of proteins and peptides. *Anal. Chem.* **61**, 1186-1194.

Haas, H. y Marzluf, G.A. (1995). NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum* interacts with the promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene cluster. *Curr. Genet.* **28**, 177-183.

Haas, H.; Bauer, B.; Redt, B.; Stöffler, G. y Marzluf, G.A. (1995). Molecular cloning of *nre*, the major nitrogen regulatory gene of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **27**, 150-158.

Hagen, B.F.; Berdagué, J.L.; Holck, A.L.; Naes, H. y Blom, H. (1996). Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *J. Food Sci.* **61**, 1024-1029.

Halls, N.A. y Ayres, J.C. (1973). Potential production of sterigmatocystin on country cured ham. *Appl. Microbiol.* **26**, 636-637.

Hancock, R.E.W. (1997). Hancock Laboratory Methods.
www.interchg.ubc.ca/bobh/peptides.htm.

Hancock, R.E.W. y Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323.

Hao, J.J.; Xu, Y.Z.; Geng, C.D.; Liu, W.Y.; Wang, E.; Gong, Z.Z. y Ulbrich, N. (1998). Purification of α -sarcin and antifungal protein from *Aspergillus giganteus* by blue sepharose CL-6B affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **14**, 295-301.

Hechelmann, H. (1986). Mikrobiel verursachte fehlfabrikate bei rohwurst und rohschinken. *Fleischwirtsch.* **66**, 515-528.

Hinrichsen, L.L. y Pedersen, S.B. (1995). Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes, and microflora in italian-type dry-cured ham during processing. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2932-2940.

Hocking, A.D. y Pitt, J.I. (1980). Dochloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Appl. Env. Microbiol.* **39**, 488-492.

Hodge, J.E. (1953). Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model system. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928-943.

Holland, R.D. y Sepaniak, M.J. (1993). Qualitative analysis of mycotoxins using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* **65**, 1140-1146.

Holowachuk, S.A.; Bal'a, M.F. y Buddington, R.K. (2003). A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. *J. Microbiol Methods.* **55**, 441-446.

Hong, S.Y.; Park, T.G. y Lee, K.H. (2001). The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides.* **22**, 1669-1674.

Hoover, D.M.; Wu, Z.; Tucker, K.; Lu, W. y Lubkowski, J. (2003). Antimicrobial characterization of human β -defensin 3 derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2804-2809.

Huang, H.W. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. **39**, 8347-8352.

Huang, X.; Xie, W.J. y Gong, Z.Z. (2000). Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters*. **478**, 123-126.

Huang, R.H.; Xiang, Y.; Liu, X.Z.; Zhang, Y.; Hu, Z. y Wang, D.C. (2002). Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Letters*. **521**, 87-90.

Huerta, T.; Sanchis, V.; Hernández, J. y Hernández, E. (1987). Mycoflora of dry-salted spanish ham. *Proceedings of the ICoMST*. **2**, 1047-1050.

Huerta, T.; Hernández, J.; Guamis, B. y Hernández E. (1988). Microbiological and phisico-chemical aspects in dry-cured ham. *Zentralbl. Mikrobiol.* **143**, 475-482.

Hwang, P.M. y Vogel, H.J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 235-246.

Hwu, L.; Huang, C.C.; Chen, D.T. y Lin, A. (2000). The action mode of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. *J. Biomed. Sci.* **7**, 420-428.

Innis, M.A. y Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. En: *PCR Protocols*. Eds.: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. y White, T.J. *Academic Press*, Nueva York. Pp.: 3-12.

Iwamoto, T.; Fuji, A.; Nitta, K.; Hasimoto, S.; Okuhara, M. y Koshsaka, M. (1994a). WF11899 A, B, and C, novel antifungal lipopeptides. II. Biological properties. *J. Antibiot.* **47**, 1092-1097.

Iwamoto, T.; Fuji, A. y Sakamoto, S. (1994b). WF11899 A, B, and C, novel antifungal lipopeptides. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* **47**, 1084-1091.

Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R. y col. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**, 97-109.

Jacob, M. y Gallinaro, H. (1989). The 5' splice site: Phylogenetic evolution and variable geometry of association with U1RNA. *Nucl. Acids Res.* **17**, 2159-2180.

Jarvis, B. (1983). Mould and mycotoxins in mouldy cheeses. *Microbiol. Alim. Nutr.* **1**, 187-191.

Kagan, B.L.; Selsted, M.E.; Ganz, T. y Lehrer, R.I. (1990). Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 210-214.

Kang, S.C.; Park, S. y Lee, D.G. (1999). Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* **73**, 276-281.

Kato, H.; Rhue, M.R. y Nishimura, T. (1989). Role of free amino acids and peptides in food taste. En: *Flavour Chemistry*. Eds.: Teranishi, R.; Buttery, R.G. y Shahidi, F. ACS Symposium Series 388. American Chemical Society, Whashington D.C. Pp.: 158-175.

Katta, S.K.; Jackson, L.S.; Summer, S.S.; Hanna, M.A. y Bullerman, L.B. (1999). Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion cooked corn grits. *Cereal Chem.* **76**, 16-20.

Keller-Juslin, C.; Huhn, M.; Loosli, H.; Petcher, T.; Weber, H. y Von Wartburg, A. (1976). Struktur des cyclopeptid-antibiotikums (=echinocandin B). *Tetrahedron Lett.* **46**, 4147-4150.

Kemp, J.D.; Langlois, B.E. y Fox, J.D. (1978). Composition, quality and microbiology of dry-cured hams produced from previously frozen green hams. *J. Food Sci.* **43**, 860-863.

Kemp, J.D.; Langlois, B.E. y Johnson, A.E. (1982). Effect of pressure freezing and thawing on the microflora, fat characteristic and palability of dry-cured ham. *J. Food Prot.* **45**, 244-248.

Keppler, K.; Geisen, R. y Holzappel, W.H. (1994). An α -amylase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc carnosum*. *Food Microbiol.* **11**, 39-45.

Khachatourians, G.G. (1999). Biochemical and modern identification techniques. Food Spoilage Flora (Yeasts and Moulds). En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press. Vol. **B**, Pp.: 143-152.

Khmelnitsky, Y.L. y Rich, J.O. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**, 47-53.

Kinsella, J.E. y Hwang, D.H. (1976). Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **12**, 191-228.

Kivanc, M.; Sert, S. y Hasenekoglu, I. (1992). Production of aflatoxins in sausage, salami, sucuk and kavurma. *Nahrung*. **36**, 293-298.

Klich, M.A.; Lax, A.R. y Bland, J.M. (1991). Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathology*. **116**, 77-80.

Koo, J.C.; Lee, S.Y.; Chun, H.J.; Cheong, Y.H.; Choi, J.S.; Kawabata, S.I.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S.; Ha, K.S.; Bae, D.W.; Han, C.D.; Lee, B.L. y Cho, M.J. (1998). Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1382**, 80-90.

Kulmburg, P.; Mathieu, M.; Dowzer, C.; Kelly, J. y Felenbok, B. (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **7**, 847-857.

Kundu, B.; Srinivasan, T.; Kesarwani, A.P.; Kavishwar, A.; Raghuwanshi, S.K.; Batra, S. y Shukla, P.K. (2002). Identification of novel antifungal nonapeptides through the screening of combinatorial peptide libraries based on a hexapeptide motif. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1473-1476.

Kunin, C.M. y Edmondson, W.P. (1968). Inhibitor of antibiotics in bacteriologic agar. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**, 118-122.

Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gasset, M.; Patiño, B.; Campos-Olivas, R.; Vázquez, C.; Martínez-Ruiz, A.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995). Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **20**, 273-281.

Lacey, J. (1989). Factors affecting mycotoxin production. *Mycotoxins and Phycotoxins*. Eds.: Steyn, P.S. y Vleggaar, R. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

Lafont, P.; Siriwardana, M.G.; Combemale, I. y Lafont, J. (1979). Mycophenolic acid in marketed cheeses. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**, 147-149.

Lamberty, M.; Ades, S.; Uttenweiler-Joseph, S.; Brookhart, G.; Bushey, D.; Hoffmann, J.A. y Bulet, P. (1999). Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 9320-9326.

Langlois, B.E. y Kemp, J.D. (1974). Microflora of fresh and dry cured hams as affected by fresh ham storage. *J. Animal Sci.* **38**, 525-531.

Larsen, T.O. y Frisvad, J.C. (1995a). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycol. Res.* **99**, 1153-1166.

Larsen, T.O. y Frisvad, J.C. (1995b). Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycol. Res.* **99**, 1167-1174.

Larsen, A.G. y Knochel, S. (1997). Antimicrobial activity of food-related *Penicillium sp.* against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 111-119.

Latoud, C.; Peypoux, F.; Michel, R.; Genet, R. y Morgat, J.L. (1986). Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **856**, 526-535.

Lawrie, R.A. (1998). *Lawrie's meat science*. Londres: Woodhead Publishing.

Le Bars, J. (1979). Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl. Env. Microbiol.* **38**, 1052-1055.

Le Bars, J. (1990). Detection and occurrence of cyclopiazonic acid in cheeses. *J. Env. Pathol. Toxicol. Oncol.* **10**, 136-137.

Lee, D.G.; Shin, S.Y.; Maeng, C.; Jin, Z.Z.; Kim, K.L. y Hahm, K. (1999). Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 646-651.

Lee, D.G.; Kim, D.H.; Park, Y.; Kim, H.K.; Kim, H.N.; Shin, Y.K; Choi, C.H. y Hahm, K.S. (2001). Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 570-574.

Lee, D.G.; Kim, P.I.; Park, Y.; Woo, E.R.; Choi, J.S ; Choi, C.H. y Hahm, K.S. (2002). Design of a novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on PMAP-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 231-238.

Lehrer, R.I.; Barton, A.; Daher, K.D.; Harwig, S.S.; Ganz, T. y Selsted, M.E. (1989). Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Investig.* **84**, 553-561.

Leistner, L. (1984). Toxinogenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. *Food Technol. Aust.* **36**, 404-406.

Leistner, L. (1994). Starter and protective cultures for foods in Europe. *Microbes for better living, Micon 94 and 35th AMI Conference*. Nov. 1994. Pp. 417-423.

Leistner, L. y Ayres, J.C. (1968) Molds and meats. *Fleischwirtsch.* **1**, 62-65.

Leistner, L. y Rödel, W. (1975). The significance of water activity for microorganisms in meats. En: *Water relations of foods*. Ed.: R.B. Duckworth. Academic Press, Londres.

Leistner, L. y Eckardt, C. (1979). Vorkommen toxinogener penicilien bei fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* **59**, 1892-1896.

Lewus, C.B.; Sun, S. y Monyville, T.J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 143-149.

Liepe, H.U. (1982). Starter cultures in meat production. En: *Biotechnology*. Vol. 5. Eds.: H.J. Rehm y G. Reeds. Verlag-Chemie, Weinheim. Pp.: 399-424.

Liu, Y.; Tortora, G.; Ryan, M.E.; Lee, H. y Golub, L.M. (2002). Potato dextrose agar antifungal susceptibility testing for yeast and molds: evaluation of phosphate effect on antifungal activity of CMT-3. *Antimicrob. Agents. Chemoth.* **46**, 1455-1461.

López-Díaz, T. M.; Santos, J. A.; García-López, M. L. y Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **68**, 69-74.

López-Díaz, T. M.; González, C.J.; Moreno, B. y Otero, A. (2002). Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of

Penicillium olsonii isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiol.* **19**, 1-7.

López-García, B.; Pérez-Payá, E. y Marcos, J.F. (2002). Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, 2453-2460.

Lücke, F.K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch.* **66**, 1505-1509.

Lücke, F.K. (1997). Fermented sausages. En: *Microbiology of fermented foods*. Ed.: B.J.B. Wood. London: Blackie Academic & Professional. Pp.: 441-483.

Lücke, F.K. y Hechelmann, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. *Fleischwirtsch.* **67**, 307-314.

Ludemann, 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. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 13-18.

Lund, F. (1995a). Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Lett. Apl. Microbiol.* **20**, 228-231.

Lund, F. (1995b). Diagnostic characterization of *Penicillium palitans*, *P. commune* and *P. solitum*. *Lett. Apl. Microbiol.* **21**, 60-64.

Lund, F. y Frisvad, J.C. (1994). Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycol. Res.* **98**, 481-492.

Magan, N. y Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and diferentation between species and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res.* **36**, 319-324.

Magan, N.; Caley, G.R. y Lacey, J. (1993). Lipolytic activity and degradation of rapessed oil and rapessed by spolage fungi. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 217-227.

Malmstrom, J.; Christophersen, C. y Frisvad, J.C. (2000). Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry.* **54**, 301-309.

Maloy, W.L. y Kari, U.P. (1995). Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers.* **37**, 105-122.

Mantle, P.J. y McHugh, K.M. (1993). Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycol. Res.* **97**, 205-212.

Marín, M.E.; Carrascosa, A.V. y Cornejo I. (1993). Micropoblación saprofita y patógena en la elaboración de jamón serrano. *Alimentaria*, **240**, 31-36.

Marín, S.; Sanchís, V.; Sáenz, R.; Ramos, A.J.; Viñas, A.J. y Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium spp.* from maize grain. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 25-36.

Marth, E.H. y Yousef, A.E. (1991). Fungi and dairy products. En: *Handbook of Applied Mycology, Vol. 3: Foods and Feeds*. Eds.: Arora, D.K.; Mukerji, K.G. y Marth, E.H. Marcel Dekker. New York. Pp.: 375-414.

Martín, A.; Córdoba, J.J.; Rodríguez, M.M.; Núñez, F. y Asensio, M.A. (2001). Evaluation of microbial proteolysis in meat products by Capillary Electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 163-171.

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 Sci.* **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. *Int. J. Food Microbiol.* **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. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 55-66.

Martín, A.; Jurado, M.; Rodríguez, M.; Núñez, F. y Córdoba, J.J. (2004b). Characterization of molds from dry-cured meat products and their metabolites by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA PCR. *J. Food Prot.* **67**, 2234-2239.

Martín, A.; Aranda, E.; Benito, M.J.; Pérez-Nevado, F. y Córdoba, M.G. (2005). Identification of fungal contamination and determination of mycotoxigenic molds by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography in smoked paprika. *J. Food Prot.* **68**, 815-822.

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. *Int. J. Food Microbiol. In Press.*

Martín, J.F. y Liras, P. (1989). Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. En: *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 39. Ed.: Fiechter, A. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. Pp.: 153-187.

Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1997). Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1340**, 81-87.

Marx, F.; Haas, H.; Reindl, M.; Stöffler, G.; Lottspeich, F. y Redl, B. (1995). Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene*. **167**, 167-171.

Marzluf, G.A. (1993). Regulation of sulphur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 31-55.

Mateo, J. y Zumalacárregui, J.M. (1996). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Sci.* **44**, 255-273.

Mathieu, M. y Felenbok, B. (1994). The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. *EMBO. J.* **13**, 4022-4027.

Mathieu, M.; Fillinger, S. y Felenbok, B. (2001). *In vivo* studies of upstream regulatory *cis*-acting elements of the *alcR* gene encoding the transactivator of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **36**, 123-131.

Mathivanan, N.; Kabilan, V. y Murugesan, K. (1998). Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium*

chlamydosporum, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Can. J. Microbiol.* **44**, 646-651.

Mauch, F.; Mauch-Mani, B. y Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* **88**, 936-942.

McAlpin, C.E. y Mannarelli, B. (1995). Construction and characterization of a DNA probe for distinguishing strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1068-1072.

McKinley, E.R. y Carlton, W.W. (1991). Patulin. En: *Mycotoxins and Phytoalexins*. Eds.: Sharma, R.P. y Salunkhe, D.K. CRC Press: Boca Raton, FL. Pp.: 191-236.

Melger, J.; Cid, C.; Astiasarán, I. y Bello, J. (1993). Influencia de la alimentación del cerdo ibérico en las características de los compuestos relacionados con la grasa del jamón curado. *Cárnica 2000*. **111**, 44-48.

Meyer, W.; Koch, A.; Niemann, C.; Beyermann, B.; Epplen, J.T. y Borner, T. (1991). Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.* **19**, 239-242.

Meyer, W.; Lieckfeldt, E.; Kuhls, K.; Freedman, E.Z.; Borner, T. y Mitchell, T.G. (1993). DNA and PCR fingerprinting in fungi. *EXS*. **67**, 311-320.

Meyer, V.; Wedde, M. y Stahl, U. (2002). Transcriptional regulation of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol. Genet. Genom.* **266**, 747-757.

Meyer, V. y Stahl, U. (2003). The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. *J. Basic Microbiol.* **43**, 68-74.

Miller, C.M.; Miller, R.V.; Garton-Kenny, D.; Redgrave, B.; Sears, J.; Condrón, M.M.; Teplow, D.B. y Strobel, G.A. (1998). Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 937-944.

Mislivec, P.B.; Trucksess, M.W. y Stoloff, L. (1988). Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. *J. Food Prot.* **51**, 449-451.

Moerman, L.; Bosteels, S.; Noppe, W.; Willems, J.; Clynen, E.; Schoofs, L.; Thevissen, K.; Tytgat, J.; Van Eldere, J. Verdonck, J.W.F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa European. *J. Biochem.* **269**, 4799-4805.

Molimard, P.; Vassal, L.; Bouvier, I. y Spinnler, H.E. (1995). Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type camembert. *Lait.* **75**, 3-16.

Molina, I.; Silla, H.; Flores, J. y Monzo, J.L. (1990). Study of the microbial flora in dry-cured ham. 2. *Micrococcaceae*. *Fleischwirtsch. Int.* **2**, 47-48.

Molina, I.; Nieto, P.; Flores, J.; Silla, H. y Bermell, S. (1991). Study of the microbial flora of dry cured ham. 5. Lipolytic activity. *Fleischwirtsch.* **71**, 906-913.

Molinié, A.; Faucet, V.; Castegnaro, M. y Pfohl-Leszkowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem.* **92**, 391-400.

Monte, E.; Villanueva, J.R. y Domínguez A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *Int. J. Food Microbiol.* **3**, 355-359.

Morrison, C.; Warnock, D.W.; Lott, T.J.; Hurst, S.F. y Hinrikson, H.P. (2005). Assesment of ribosomal large-subunitD1-D2, internal transcribed spacer 1 and internal transcriber spacer 2 regions as target for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2093-2103.

Moss, M.O. y Frank, J.M. (1985). The influence on mycotoxin production of interactions between fungi and their environment. En: *Trichothecenes and other mycotoxins*. Ed.: Lacey, J. John Wiley. Chichester. Pp.: 257-268.

Mottram, D.S. y Whitfield, F.B. (1995). Maillard-lipid interactions in nonaqueous systems: volatiles from the reaction of cysteine and ribose with phosphatidylcholine. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1302-1306.

Moyne, A.L.; Shelby, R.; Cleveland, T.E. y Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus Flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 622-629.

Munimbazi, C. y Bullerman, L.B. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 959-968.

Mutti, P.; Previdi, M.P.; Quintavalla, S. y Spotti, E. (1992). Toxigenicity of mould strains isolated from salami as a function of culture medium. *Ind. Conserve.* **63**, 142-145.

Naes, H.; Holck, A.L.; Axelsson, L.; Andersen, H.J. y Blom, H. (1995). Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a lactobacillus proteinase. *Int. J. Food Sci. Technol.* **29**, 651-659.

Nakaya, N.; Omata, K.; Okahashi, I.; Nakamura, Y.; Kolkenbrock, H.J. y Ulbrich, N. (1990). Amino-acid sequence and disulphide bridges of an antifungal-protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* **193**, 31-38.

Ng, T.B.; Parkash, A. y Tso, W.W. (2003). Purification and characterization of-and-benincasins, arginine/glutamate-rich peptides with translation-inhibiting activity from wax gourd seeds. *Peptides.* **24**, 11-16.

Nielsen, M.S.; Nielsen, P.V. y Frisvad, J.C. (1996). Micellar capillary electrokinetic chromatography of fungal metabolites-resolution optimized by experimental design. *J. Chromatogr.* **721**, 337-344.

Nielsen, K.K.; Nielsen, J.E.; Madrid, S.M. y Mikkelsen, J.D. (1997). Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **113**, 83-91.

Nielsen, M.; Frisvad, J. y Nielsen, P. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **42**, 91-99.

Nielsen, T.H.; Christophersen, C.; Anthoni, U. y Sørensen, J. (1999). Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 80-89.

Nielsen, T.H.; Thrane, C.; Christophersen, C.; Anthoni, U. y Sørensen, J. (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 992-1001.

Nieto-Lozano, J.C.; Reguera-Useros, J.I.; Peláez-Martínez, M.C. y Hardisson de la Torre, A. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci.* **62**, 237-243.

Nishimura, T. y Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food Rev. Int.* **4**, 175-194.

Northolt, M.D.; Van Egmond, H.P.; Soentoro, P. y Deijll, E. (1980). Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 115-119.

Núñez, F. (1995). Flora fúngica en jamón ibérico y su importancia tecnológica y sanitaria. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.

Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Bermúdez, M.E.; Córbova, J.J. y Asensio, M.A. (1996a). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 271-280.

Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Bermúdez, M.E.; Córbova, J.J. y Asensio, M.A. (1996b). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 185-197.

Núñez, F.; Díaz, M.C.; Rodríguez, M.M.; Aranda, E.; Martín, A. y Asensio, M.A. (2000). Effects of substrate, water activity, and temperature on grown and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *J. Food Prot.* **63**, 231-236.

Odds, F.C.; Brown, A.J.P. y Gow, N.A.R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**, 272-279.

Okkers, D.J.; Dicks, L.M.T.; Silvester, M.; Joubert, J.J. y Odendaal, H.J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 726-734.

Oldach, K.H.; Becker, D. y Lorz, H. (2001). Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistant in transgenic wheat. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**, 832-838.

Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1965). Alpha sarcin, a new antitumor agent. Isolation, purification, chemical composition and the identity of a new amino acid. *Appl. Microbiol.* **13**, 314-321.

Ordóñez, J.A.; Hierro, E.M.; Bruna, J.M. y de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**, 329-367.

Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En: *Enciclopedia de la carne y productos cárnicos. Vol. II*. Martín y Macías. Cáceres.

Ornstein, L. (1964). Disk electrophoresis. I. Background and theory. *Annals of the Nueva York Academy of Sciences.* **121**, 321-349.

Osborne, B.G.; Ibe, F.; Brown, G.L.; Petagine, F.; Scudamore, K.A.; Banks, J.N.; Hetmanski, N.T. y Leonard, C.T. (1996). The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Add. Cont.* **13**, 141-153.

Patrzykat, A.; Gallant, J.W.; Seo, J.K.; Pytyck, J. y Douglas, S.E. (2003). Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2464-2470.

Peintner, U.; Geiger, J. y Pöder, R. (2000). The mycobiota of Speck, a traditional tyrolean smoked and cured ham. *J.Food Prot.* **63**, 1399-1403.

Pertea, M.; Lin, X. y Salzberg, S.L. (2001). GeneSplicer: A new computational method for splice site prediction. *Nucl. Acids Res.* **29**, 1185-1190.

Peterson, S.W. (1995). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremi* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **99**, 1349-1355.

Petska, J.J. (1986). Fungi and mycotoxins in meats. En: *Advances in Meat Research: Meat and Poultry Microbiology. Vol. 2.* Ed.: Pearson, A.M. AVI Publishing Co., USA. Pp.: 277-305.

Peña, R.; Alcaraz, M.C.; Arce, L.; Ríos, A. y Valcacer, M. (2002). Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *J. Cromatogr.* **967**, 303-314.

Piard, J.C. y Desmazaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2 Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**, 113-142.

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. (1993). A modified creatine sucrose medium for differentiation of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 559-563.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Profesional. Londres, Gran Bretaña.

Pohland, A.E. (1993). Mycotoxins in reiew. *Food Addit. Cont.* **10**, 17-28.

Pohland, A.E.; Nesheim, S. y Friedman, L. (1992). Ochratoxin A: a reiew. *Pure Appl. Chem.* **64**, 1029-1046.

Raczynski, R.G.; Spotti, E. y Tagliavini, A. (1978). Indagini sul prosciutto tipico di Parma: influenza della fase di salagione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici en della popolazione batterica. Nota II. *Ind. Conserve.* **53**, 11-16.

Rapper, K.B. y Thom, C. (1949). *A manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins. Baltimore.

Redkar, R.J.; Lemke, P.A. y Singh, N.K. (1996). Isolation of differentially expressed cDNA clones from salt adapted *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **29**, 130-135.

Rico, E.; Toldrá, F. y Flores, J. (1991). Effects of the dry-cured parameters on pork muscle cathepsin B, H and L activity. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **193**, 541-544.

Rodríguez, M.M. (1995). Evaluación tecnológica y sanitaria de las micrococáceas en la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.

Rodríguez, M.M.; Núñez, F.; Córdoba, J.J.; Sanabria, C.; Bermúdez, E. y Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus spp.* and *Micrococcus spp.* isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 239-335.

Rodríguez M.M.; Nuñez, F.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1996). Gram-positive, catalase-positive cocci of dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl Environ. Microbiol.* **62**, 1897-1905.

Rodríguez M.M.; Nuñez, F.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A. (1998). Evaluation of proteolytic activity of micro-organisms isolated from dry cured ham. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 905-912.

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.

Rojas, F.I.; Jodral, M.; Gosalvez, F. y Pozo, R. (1991). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 249-256.

Roncalés, P. (1998). Uso de proteasas de preparación sencilla en el procesado de alimentos de base muscular. En: *Proc. 4th Int. ANQUE Chem. Conf.* Lugo. Pp.: 75-82.

Rosset, R. (1982). Chilling, freezing and thawing. En: *Meat microbiology*. Ed.: M.H. Brown. Elsevier Applied Science, Londres. Pp.: 265-318.

Roy, K.; Mukhopadhyay, T.; Reddy, G.; Desikan, K. y Ganguli, B. (1987). Mulundocandin, a new lipopeptide antibiotic. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and characterization. *J. Antibiot.* **40**, 275-280.

Ruijter, G.J.G. y Visser, J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 103-114.

Ruiz, J.; Cava, R.; Ventanas, J. y Jensen, M.T. (1998). Headspace solid phase microextraction for the analisis of volatiles in a meat product: dry cured Iberian ham. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4688-4694.

Ruiz, J.; Ventanas, J.; Cava, R.; Andrés, A. y García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured ham as affected by the lenght of the curing process. *Meat Sci.* **52**, 19-27.

Rundberget, T. y Wilkins, A.L. (2002). Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **964**, 189-197.

Rychlik, W.; Spencer, W.J. y Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6409-6412.

Sabater-Vilar, M.; Nijmeijer, S. y Fink-Gremmels, J. (2003). Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (Fumitremorgen B, Paxilline, Penitrem A, Verruculogen, and Verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food Prot.* **66**, 2123-2129.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1995). *Introduction to Food-borne Fungi*. 4th edition. Eds.: Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Netherlands. Pp.: 308-312.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. (1996). *Introduction to Food-borne Fungi*. 5th edition. Eds.: Samson, R.A.; Hoekstra,

E.S.; Frisvad, J.C. y Filtenborg, O. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, Netherlands. Pp.: 308-312.

Sanders, M. (1993). Effect of consumption of acid lactic cultures on human health. *Adv. Food Nutr. Res.* **37**, 67-127.

Sanz, B. (1986). Factores que influyen en sabores y olores del jamón. *Cárnica 2000*, **34**, 57-61.

Sárraga, C.; Gil, M.; Arnau, J. y Monfort, J.M. (1989). Effect of curing salt and phosphate on the activity of porcine muscle proteases. *Meat Sci.* **25**, 241-248.

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. *J. Sci. Food Agric.* **62**, 71-75.

Saxonov, S.; Daizadeh, I.; Fedorov, A. y Gilbert, W. (2000). EID: the Exon-Intron Database-an exhaustive database of protein-coding intron-containing genes. *Nucl. Acids Res.* **28**, 185-190.

Scheved, F.; Lalazar, A.; Henis, Y. y Juven, B.J. (1993). Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 67-77.

Schmitt, E.; Kempken, R. y Kück, U. (2001). Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin biosynthesis from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interaction and characterization of the transcription factor *pacC*. *Mol. Gen. Genom.* **265**, 508-518.

Scott, P.M. (1993). Gas chromatography of Mycotoxins. En: *Chromatography of Mycotoxins*. Ed.: Betina, V. Elsevier, Amsterdam. Pp.: 373-425.

Seitz, E.W. (1990). Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **73**, 3664-3691.

Sela-Buurlage, M.B.; Ponstein, A.S.; Vloemans, S.A.; Melchers, L.S.; Van den Elzen, P.J.M. y Cornelissen, B.J.C. (1993). Only specific tobacco (*Nicotinia tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* **101**, 857-863.

Selgas, M.D.; Casas, C.; Toledo, V.M. y García; M.L. (1999). Effect of selected mould strains on lipolysis in dry fermented sausages. *Europ. Food Res. Technol.* **209**, 360-365.

Selitrennikoff, C.P. (2001). Antifungal proteins. *Appl. Env. Microbiol.* **67**, 2883-2894.

Shahidi, F.; Rubin, L.J. y D'Souza, L.A. (1986). Meat flavour volatiles: A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluations. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **24**, 141-243.

Siemens, K. y Zawistowski, J. (1993). Occurrence of PR imine, a metabolite of *Penicillium roqueforti*, in blue cheese. *J. Food Prot.* **56**, 317-319.

Silla, M.H.; Inerarity, A. y Flores, J. (1985). Características de jamones con cistales de tirosina. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* **25**, 95-103.

Silla, H.; Molina, I.; Flores, J. y Silvestre, D. (1989). A study of the microbial flora of dry-cured ham. 1. Isolation and growth. *Fleischwirtsch.* **69**, 1128-1131.

Simpson, B.K.; Nayeri, G.; Yaylayan, V. y Ashie, I.N.A. (1998). Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem.* **61**, 131-138.

Singh, B.J. y Dincho, D. (1994). Molds as protective cultures for raw dry sausages. *J. Food Prot.* **57**, 928-930.

Sitaram, N. y Nagaraj, R. (1999). Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 29-54.

Skrinjar, M y Horvat-Skenderovic, T. (1989). Contamination of dry sausage with moulds, aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Technol. Mesa.* **30**, 53-59.

Sluyterman, L.A.A. y Kooistra, C. (1989). Ten years of chromatofocusing: a discussion. *J. Chromatogr.* **470**, 317-326.

Smedsgaard, J. y Frisvad, J.C. (1996). Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *J. Microbiol. Methods.* **25**, 5-17.

Smedsgaard, J. y Frisvad, J.C. (1997). Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. I. Chemosystematics. *Biochem. System. Ecol.* **25**, 51-64.

Smith, J.L. y Palumbo, S.A. (1983). Use of starter cultures on meat. *J. Food Prot.* **46**, 997-1006.

Sosa, M.J. (2005). Actividades enzimáticas y generación de compuestos volátiles por microorganismos aislados del interior del jamón curado. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura.

Sosa, M.J.; Córdoba, J.J.; Díaz, M.; Rodríguez, M.M.; Bermúdez, E.; Asensio, M.A. y Núñez, F. (2002). Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat-extract based substrate. *J. Food Prot.* **65**, 988-992.

Spotti, E.; Mutti, P. y Campanini, M. (1988). Indagine microbiologica sul Diffeto dell'acido fenico del prosciutto durante la stagionatura. *Ind. Conserve.* **63**, 343-346.

Spotti, E.; Mutti, P. y Campanini, M. (1989). Presenza di muffe sui prosciutti durante la prestagionatura e la stagionatura: contaminazione degli ambienti e sviluppo sulla porzione muscolare. *Ind. Conserve.* **64**, 110-113.

Spotti, E.; Chiavaro, E.; Pari, E. y Busolli, C. (2001a). Sviluppo di *Penicillium verrucosum* in sistemi modello di prodotti carnei stagionati. Parte II. *Ind. Conserve.* **76**, 167-183.

Spotti, E.; Chiavaro, E.; Lepidani, A. y Colla, F. (2001b). Contaminazione da muffe e ocratossina A in prosciutti stagionati e in fase di stagionatura. *Ind. Conserve.* **76**, 341-354.

Steinberg, D. y Lehrer, R.I. (1997). Designer assays for antimicrobial peptides: disputing the "one size fits all" theory. En: *Methods in Microbiology*. Ed.: Shafer, W.M. Humana Press. Totowa, NJ. Pp.: 169-187.

Strauss, J.; Horvath, H.K.; Abdallah, B.M.; Kindermann, J.; Mach, R.L. y Kubicek, C.P. (1999). The function of CreaA, the carbon catabolite repressor of

Aspergillus nidulans, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* **32**, 169-178.

Strobel, G.A.; Miller, R.V.; Martínez-Miller, C.; Condrón, M.M.; Teplow, D.B. y Hess, W.M. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. Quercina*. *Microbiology.* **145**, 1919-1926.

Strzelecki, E.L. (1973). Behaviour of aflatoxins in some meat products. *Acta Microbiol. Polonica.* **5**, 171-177.

Strzelecki, E.L.; Lillard, H.S. y Ayres, J.C. (1969). Country cured ham as possible source of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* **18**, 938-939.

Sutic, M.; Ayres, J.C. y Koehler, P.E. (1972). Identification and aflatoxin production of molds isolated from country cured hams. *Appl. Env. Microbiol.* **23**, 656-658.

Suyama, M. y Shimuzu, T. (1982). Buffering capacity and taste of carnosine and its methylated compounds. *Bull. Jap. Soc. Sci.* **48**, 89-94.

Suzuki, A.; Homma, N.; Fukuda, A.; Hirao, K. y Uryu, T. (1994). Effects of high pressure treatment on the flavour-related components in meat. *Meat Sci.* **37**, 369-379.

Svendsen, A. y Frisvad, J.C. (1994). A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycol. Res.* **98**, 1317-1328.

Swedberg, S. (1997). Capillary electrophoresis: Principles and applications. En: *Instrumental methods in food analysis*. Eds.: Pare, J.R.J. y Belanger, J.M.R. Elsevier Science. Nueva York. Pp.: 367-394.

Sweeney, M.J. y Dobson, A.C.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 141-158.

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 Méd. Vét.* **156**, 287-291.

Tagg, J.R.; Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.

Taylor, R.H.; Acland, D.P.; Attenborough, S.; Cammue, B.P.A.; Evans, I.J.; Osborn, R.W.; Ray, J.A.; Rees, S.B. y Broekaert, W.F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 24480-24487.

Theis, T. y Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 437-455.

Theis, T.; Wedde, M.; Meyer, V. y Stahl, U. (2003). The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob. Agents Chem.* **47**, 588-593.

Theis, T.; Marx, F.; Salvenmoser, W.; Stahl, U. y Meyer, V. (2005). New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Res. Microbiol.* **156**, 47-56.

Then Bergh, K. y Brakhage, A.A. (1998). Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PacC. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 843-849.

Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G.W.; Brownlee, C.; Osborn, R.W. y Broekaert, W.F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* **271**, 15018-15025.

Thevissen, K.; Osborn, R.W.; Acland, D.P. y Broekaert, W.F. (1997). Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32176-32181.

Thevissen, K.; Terras, F.R.G. y Broekaert, W.F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 5451-5458.

Thevissen, K.; Cammue, B.P.A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R.C.; Lester, R.L.; Ferket, K.K.A.; van Even, F.; Parret, A.H. y Broekaert, W.F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 9531-9536.

Thevissen, K.; Warnecke, D.; François, I.E.J.A.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zähringer, U.; Thomma, B.P.H.J.; Ferket, K.K.A. y Cammue, B.P.A. (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glycosylceramides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3900-3905.

Thomma, B.P.; Cammue, B.P. y Thevissen, K. (2003). Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug. Targets Infect. Disord.* **3**, 1-8.

Tilburn, J.; Sarkar, S.; Widdick, D.A.; Espeso, E.A.; Orejas, M.; Mungroo, J.; Peñalva, M.A. y Arst, H.N.Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger

transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790.

Tkacz, J.S. y DiDomenico, B. (2001). Antifungals: what's in the pipeline. *Current Opinion Microbiol.* **4**, 540-545.

Toldrá, F. y Flores M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry cured ham. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **38**, 331-352.

Toldrá, F.; Miralles, M.C. y Flores J. (1992). Protein extractability in dry-cured ham. *Food Chem.* **44**, 391-394.

Toledo, V.M.; Selgas, M.D.; Casas, C.; Fernández, M. y García, M.L. (1996). Cambios en la fracción de ácidos grasos libres en embutidos con mohos. *X Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos*. Valencia. pp. 97.

Toledo, V.M.; Selgas, M.D.; Casas, C.; Fernández, M.; Ordóñez, J.A. y García, M.L. (1997). Effect of selected mould strains on proteolysis in dry fermented sausages. *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **204**, 385-390.

Tomie, T.; Ishibashi, J.; Furukawa, S.; Kobayashi, S.; Sawahata, R.; Asaoka, A.; Tagawa, M. y Yamakawa, M. (2003). Scarabaecin, a novel cysteine-containing antifungal peptide from the rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 261-266.

Trigueros, G.; García, M.L.; Casas, C.; Ordóñez, J.A. y Selgas, M.D. (1995). Proteolytic y lipolytic activities of moulds strains isolated from Spanish dry fermented sausage. *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **201**, 298-305.

Tsao, R. y Zhou, T. (2000). Micellar electrokinetic capillary electrophoresis for rapid analysis of patulin in apple cider. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5231-5235.

Tuck, K.L. y Hayball, P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 636-644.

Van den Bergh, K.P.B.; Proost, P.; Van Damme, J.; Coosemans, J.; Van Damme, E.J.M. y Peumans, W.J. (2002). Five disulfide bridges stabilized a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus L.*). *FEBS Letters.* **530**, 181-185.

Vandenbergh, P. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 221-238.

Von der Weid, I.; Alviano, D.S.; Santos, A.L.S.; Soares, R.M.A.; Alviano, C.S. y Seldin, L. (2003). Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1143-1151.

Ventanas, J.; Córdoba, J.J.; Antequera, T.; García, C.; López-Bote, C.J. y Asensio, M.A. (1992). Hydrolysis and Maillard reactions during ripening of Iberian ham. *J. Food Sci.* **57**, 813-815.

Viñas, I.; Dadon, J. y Sanchís, V. (1993). Citrinin-producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packing houses of Lérida (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 153-156.

Wang, H.X. y Ng, T.B. (2001a). Purification of allivin, a novel antifungal protein from bulbs of the round-cloved garlic. *Life Sci.* **70**, 357-365.

Wang, H.X. y Ng, T.B. (2001b). Novel Antifungal Peptides from Ceylon Spinach Seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 765-770.

Wang, H.X. y Ng, T.B. (2002). Isolation of cicadin, a novel and potent antifungal peptide from dried juvenile cicadas. *Peptides*, **23**, 7-11.

Wang, H.X. y Ng, T.B. (2003). Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds. *Peptides*, **24**, 969-972.

Wang, H.; Thoma, R.S.; Carroll, J.A. y Duffin, K.L. (2002). Temporal generation of multiple antifungal proteins in primed seed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 236-242.

Ward, C.M.; Wilkinson, A.P. y Morgan, M.R.A. (1993). Emerging techniques: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as alternatives to chromatography methods. En: *Chromatography of mycotoxins*. Ed.: Betina, V. Elsevier, Amsterdam. Pp.: 124-138.

Watanabe, T.; Kanai, R.; Kawase, T.; Tanabe, T.; Mitsutomi, M.; Sakuda, S. y Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology*. **145**, 3353-3363.

Weber, K. y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*. Eds.: Gelfand, D.H.; Sninski, J.J. y White, T.J. Pp.: 315-322. Academic Press, San Diego.

White, S.H.; Wimley, W.C. y Selsted, M.E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 521-527.

Whitfield, F.B. (1992). Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31**, 1-58.

Wiley, E.O. (1981). Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics. John Wiley. Nueva York.

Wilson, R.A. y Arst, H.N.Jr. (1998). Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and member of the "streetwise" GATA family of transcription factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 586-596.

Wnendt, S.; Felske-Zech, H.; Henze, P.P.C.; Ulbrich, N. y Stahl, U. (1993). Characterization of the gene encoding α -sarcin, a ribosome-inactivating protein secreted by *Aspergillus giganteus*. *Gene*. **124**, 239-244.

Wnendt, S.; Ulbrich, N. y Stahl, U. (1994). Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* **25**, 519-523.

Wolff, J. (2000). Ochratoxin A in cereal and cereal products. *Arch. Für Lebens.* **51**, 81-88.

Wool, I.G. (1984). The mechanism of action of the cytotoxic nuclease α -sarcin and its use to analyse ribosome structure. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 14-17.

Wu, M.T.; Ayres, J.C. y Koehler, P.E. (1974a). Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on country-cured ham. *Appl. Microbiol.* **27**, 427-428.

Wu, M.T.; Ayres, J.C. y Koehler, P.E. (1974b). Toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia* isolated from aged cured meats. *Appl. Microbiol.* **28**, 1094-1096.

Yang, Q. y Gong, Z. (2002). Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guilder rose (*Hydrangea macrophylla*). *Prot. Express. Purif.* **24**, 76-82.

Yang, L.; Tan, R.X.; Wang, Q.; Huang, W. y Yin, Y. (2002). Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. *Tetrahedron Letters.* **43**, 6545-6548.

Ye, Y.; Ng, T.B. y Rao, P.F. (2002). Cicerin and arietin, novel chickpea peptides with different antifungal potencies. *Peptides.* **23**, 817-822.

Zapelena, M.J.; Zalacain, I.; Paz de Peña, M.; Astiasarán, I. y Bello, J. (1997). Effect of the addition of a neutral proteinase from *Bacillus substilis* (Neutrase) on nitrogen fractions and texture of Spanish fermented sausage. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2798-2801.

Zapelena, M.J.; Astiasarán, I. y Bello, J. (1999). Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or starter culture. *Meat Sci.* **52**, 403-409.

Zhang, G.P.; Shi, Y.L.; Wang, W.P. y Liu, W.Y. (1999). Cation channel formed at lipid bilayer by Cinnamomin, a new type II ribosome-inactivating protein. *Toxicon.* **37**, 1313-1322.

VII. RESUMEN

VII. RESUMEN.

Las condiciones ecológicas alcanzadas durante la maduración de algunos productos cárnicos favorecen el desarrollo de una población fúngica superficial, la cual puede contribuir en gran medida a la formación del sabor, aroma o textura del producto acabado, pero también puede alterarlo e incluso producir micotoxinas.

Los métodos físicos o químicos utilizados para controlar la población fúngica en alimentos no son adecuados para este tipo de productos. Además, las medidas higiénicas para prevenir la contaminación durante la elaboración se ven desbordadas en los secaderos y bodegas, donde resulta muy difícil eliminar totalmente la contaminación ambiental. Por otra parte, la inespecificidad de estos tratamientos evitaría la posible contribución beneficiosa de los mohos a la maduración de los productos cárnicos madurados. En cambio, la utilización de cepas de mohos productores de péptidos antifúngicos como cultivos protectores permitiría reducir e incluso eliminar la incidencia de los mohos toxigénicos, sin afectar a los que contribuyan a la maduración de manera deseable.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido seleccionar cepas de *Penicillium* productoras de péptidos antifúngicos capaces de inhibir a los mohos no deseables en productos cárnicos madurados. Para llevar a cabo este estudio se han aislado 281 mohos de la superficie de jamones curados elaborados en nueve industrias situadas en diferentes puntos de Badajoz, Cáceres, Huelva y Salamanca.

Los ensayos de inhibición radial en medio sólido revelaron que aproximadamente el 59% de los aislados obtenidos mostraban actividad antifúngica frente a mohos toxigénicos aislados de jamón curado, independientemente de la industria y fase del procesado en la que se obtuvieron. Entre ellos se encuentran cepas de diferentes especies como *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. griseofulvum*, *P. aurantiogriseum*, *P. commune* o *P. olsonii*, que se desarrollan habitualmente en los productos cárnicos madurados.

Los ensayos de inhibición realizados con el medio de cultivo, la fase acuosa y el extracto clorofórmico en placas multipocillo, permitieron relacionar dicha actividad antifúngica con diversos compuestos de diferente solubilidad en agua o solventes orgánicos y con distinta sensibilidad al tratamiento con cloroformo, lo que se traduce en una actividad heterogénea incluso entre individuos de una misma especie.

Por otra parte, el fraccionamiento por intercambio catiónico reveló que la inhibición observada en la fase acuosa se debe a diferentes compuestos activos que eluyen con fuerza molar baja, media o alta, y que muestran distintos espectros de inhibición. No obstante, existe una gran similitud en la actividad de los compuestos eluidos con alta fuerza molar, lo que sugiere que pudiera tratarse de proteínas de una misma familia producidas por mohos de diferentes especies de *Penicillium*.

En el presente trabajo se ha purificado por cromatografía de filtración en gel una glicoproteína con actividad antifúngica de unos 12 kDa con un punto isoelectrico de 9,22, producida por la cepa RP42C de *P. olsonii* aislada de jamón curado.

Esta proteína ha mostrado diferente actividad frente a distintos mohos toxigénicos. Así, *P. commune* Pc131, *P. polonicum* Pp51 y *P. aurantiogriseum* Pa2918 son muy resistentes independientemente de la concentración de proteína utilizada. Por el contrario, otros como *A. niger* An261, *A. flavus* Af2687 y *P. chrysogenum* Pg222, mostraron una gran sensibilidad en todas las condiciones ensayadas. Por otro lado, el efecto de la proteína antifúngica en algunas cepas, como *P. commune* Pc332, *P. restrictum* Pr341 y *P. nalgiovense* Pj261, sólo se hizo patente a partir de las 48-72 h de incubación independientemente de la concentración de proteína utilizada. Otras cepas como *P. solitum* Ps321 y *P. griseofulvum* Pg2919, resultaron sensibles sólo a concentraciones altas de proteína pero a lo largo de todo el periodo de incubación. Finalmente, la actividad de la

proteína antifúngica frente a otros mohos, como *A. versicolor* Av2664, *A. parasiticus* Ap2682 y *P. echinulatum* Pe321, fue menor conforme disminuía la concentración utilizada y aumentaba el tiempo de incubación.

Las modificaciones en la actividad de la proteína antifúngica tras el tratamiento con α -amilasa sugieren un mecanismo de acción diferente según el género de las cepas sensibles. Concretamente, la actividad antifúngica frente a algunas cepas de *Aspergillus* disminuye tras el tratamiento con este enzima, por lo que puede estar mediada por un grupo de naturaleza glicídica, lo que no sucede frente a las cepas de *Penicillium* ensayadas.

El análisis de la secuencia amino y carboxilo terminal de la proteína y de fragmentos obtenidos mediante digestión con tripsina, indica que puede tratarse de una proteína antifúngica no descrita hasta el momento.

Se ha comprobado la producción de proteína activa en condiciones similares a las de las etapas iniciales de la maduración. Esto podría suponer para *P. olsonii* RP42C una ventaja adicional para competir frente al resto de mohos que se desarrollan en la superficie de los productos cárnicos madurados, lo que sería de gran valor para su utilización como cultivo protector. Por otra parte, esta cepa no produce ninguna de las principales micotoxinas que se atribuyen a los mohos que se desarrollan de forma habitual en los productos cárnicos madurados.

No obstante, antes de proponer su uso en alimentos será necesario estudiar la producción de la proteína por parte de *P. olsonii* RP42C en productos cárnicos madurados, así como la actividad antifúngica del compuesto activo en dichos productos. Además, se evaluarán los posibles efectos indeseables que la proteína pudiera ocasionar en los consumidores para evitar cualquier peligro de tipo sanitario. Sin embargo, la sensibilidad mostrada por la proteína al tratamiento con enzimas como tripsina, pepsina y lisozima, permite ser optimistas respecto de su uso en alimentos, ya que puede ser degradada en el tracto gastrointestinal.

Por todo lo anterior, el empleo de mohos productores de proteínas antifúngicas puede constituir una estrategia adecuada para controlar los mohos indeseables en alimentos madurados.