

## Higiene y Seguridad Alimentaria

Librada Jiménez, Elena Bermúdez, Alicia Rodríguez, Alejandro Galeano, Mariela Álvarez, Francisco Gómez, Mar Rodríguez, Félix Núñez, Juan J. Córdoba, Fernando Lobo, Lourdes Sánchez-Montero, María Jesús Andrade, Lucía da Cruz, Josué Delgado, Patricia Padilla, Belén Peromingo, María Victoria Bernáldez, Alberto Alía y Miguel A. Asensio



Instituto Universitario de Carne y Productos Cárnicos. Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Extremadura. Campus Universitario, Cáceres



Miembros de grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria de la UEx. Noviembre 2016.

El grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de Cáceres forma parte del recientemente creado Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar) de la Universidad de Extremadura. En la estructura de IProCar se integran investigadores de ocho grupos de investigación y seis Departamentos Universitarios con el objetivo de potenciar la producción científica en carne y productos cárnicos y la transferencia de resultados de investigación a empresas e instituciones, así como el de promover programas de formación de post-grado y doctorado de alto nivel. Todo esto ha impulsado el desarrollo de nuevos objetivos en el grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria.

La actividad investigadora del grupo se ha dirigido fundamentalmente a los microorganismos de alimentos, especialmente en productos

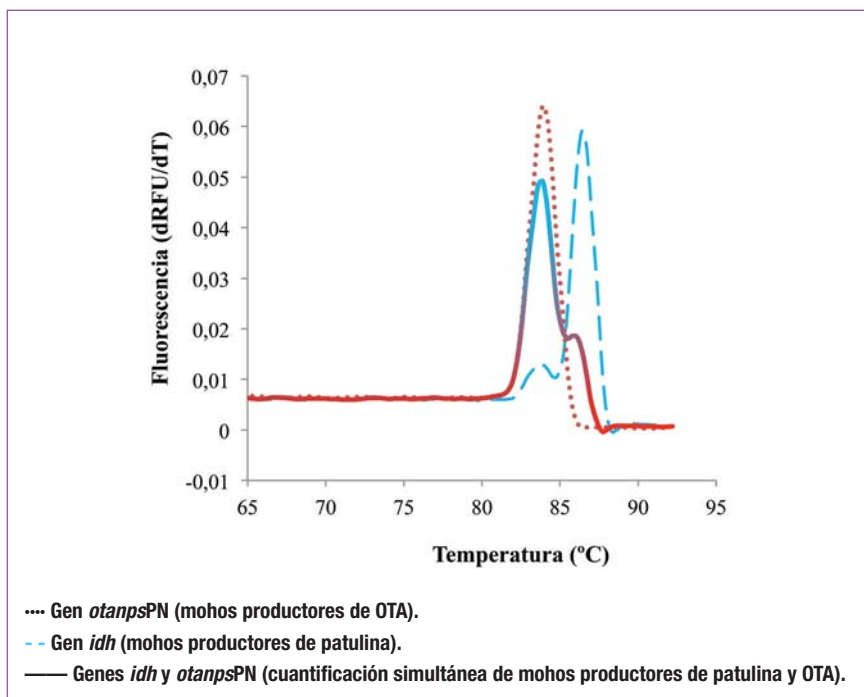
cárnicos de larga maduración. Estos productos representan un ecosistema muy particular, en el que las condiciones ambientales y del sustrato modelan el desarrollo microbiano, dirigiendo y seleccionando los microorganismos capaces de desarrollarse en cada una de las fases del proceso de elaboración.

Algunos de los microorganismos que se desarrollan en determinadas fases de la maduración contribuyen decisivamente a las características sensoriales deseables (color, sabor y aroma) del producto madurado. Sin embargo, otros microorganismos pueden ser responsables de alteraciones en los productos y hasta de provocar enfermedades en el consumidor.

Entre los microorganismos deseables, el grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria ha caracterizado y seleccionado cepas de bac-

terias como *Staphylococcus xylosum*, también de levaduras como *Debaryomyces hansenii* y de mohos como *Penicillium chrysogenum*. Se han estudiado las enzimas de mayor interés, los compuestos volátiles que se generan, se han desarrollado métodos moleculares basados en técnicas de ácidos nucleicos para su diferenciación y se han diseñado cultivos microbianos para su aplicación en la elaboración de productos cárnicos madurados.

Por lo que se refiere a los microorganismos indeseables, determinadas bacterias y algunos mohos pueden alterar el aspecto de los productos madurados o incluso formar toxinas. La actividad del grupo HISEALI se ha orientado básicamente en dos vertientes: caracterizar los microorganismos responsables de los efectos indeseables y desarrollar herramientas para detectar y controlar su presencia en los productos madurados.



**Figura 1.**

Curva de disociación resultante de la amplificación conjunta de los genes *idh* y *otanpsPN* implicados en la biosíntesis de patulina y ocratoxina A (OTA), respectivamente, mediante un método de SYBR Green dúplex. Adaptado de Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Andrade, M.J. (2016). Multiplex Detection of *Penicillium* Species. En: Mycotoxigenic Fungi-Methods and Protocols. *En prensa*.

La caracterización de microorganismos indeseables incluye la identificación de bacterias de los géneros *Serratia* y *Proteus* responsables de la alteración profunda del jamón, así como de *Pseudomonas* y *Cladosporium spp.* responsables de manchas negras en productos cárnicos madurados. Además, se ha estudiado la producción de micotoxinas por distintas especies de *Penicillium* y *Aspergillus* mediante uHPLC-MS.

Entre las herramientas para detectar microorganismos patógenos, se han desarrollado métodos de extracción de ADN a partir de mohos toxigénicos en alimentos, y especialmente métodos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar de forma sensible y rápida microorganismos toxigénicos como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7, así como métodos de PCR en tiempo real (qPCR individual y múltiple) con diversas metodologías para detectar mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* productores de aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), ácido ciclopiazónico, patulina, verrucosidina y esterigmatocistina. En la figura se muestran

los resultados de un método que permite determinar la presencia de mohos productores de patulina y OTA hasta niveles inferiores a 10 ufc/g en productos cárnicos en menos de 2 horas.

Se han desarrollado nuevos métodos de qPCR de transcripción inversa (RT-qPCR) para evaluar la viabilidad de *L. monocytogenes* en alimentos madurados, como el jamón curado loncheado, conservados en refrigeración y sometidos a abuso de temperatura mediante el análisis de la expresión de genes de virulencia (*hly*, *iap* y *plca*) y de respuesta en situaciones de estrés (*sigB*). Estos avances en el estudio de expresión génica de *L. monocytogenes* se están utilizando para evaluar el efecto de diferentes tratamientos a los que pueden someterse alimentos madurados sobre la expresión de genes de virulencia y de adaptación al estrés de este patógeno.

Para los mohos toxigénicos, se han optimizado protocolos de RT-qPCR basados en genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas, como *otapks* implicado en

la producción de OTA o *affP* de aflatoxinas. Esto ha permitido analizar la producción de micotoxinas de los derivados cárnicos con distintos ingredientes y condiciones ambientales de maduración. Dado que la expresión de los genes es anterior a la producción del metabolito tóxico, la detección de la expresión temprana de los genes relacionados con la síntesis de micotoxinas puede ser una herramienta útil para predecir el potencial toxigénico, lo cual permitiría tomar medidas dentro del programa de APPCC para evitar o minimizar la presencia de micotoxinas en alimentos madurados.

En lo que respecta al control del desarrollo de mohos indeseables, se ha estudiado la interacción de las condiciones ambientales en el desarrollo de distintos mohos y la producción de micotoxinas, habiéndose diseñado medios de cultivo específicos para el estudio en productos cárnicos, y también se ha estudiado el efecto de diversos agentes de bioconservación en los microorganismos patógenos. En este sentido, se han seleccionado mohos productores de proteínas que inhiben a mohos productores de micotoxinas y se ha caracterizado el efecto de la proteína PgAFP de *Penicillium chrysogenum* en mohos, tanto sensibles como resistentes, mediante estudios de proteómica comparativa.

Igualmente, se ha estudiado la actividad antimicrobiana de compuestos volátiles de levaduras, más concretamente de *Debaryomyces hansenii*, en el desarrollo de *Penicillium nordicum* y en la inhibición de la biosíntesis de OTA, así como el efecto de las condiciones ambientales en esta actividad.

Estas contribuciones han permitido diseñar combinaciones de mohos y levaduras para dirigir la maduración de productos cárnicos, controlando la producción de micotoxinas, sin renunciar a los efectos beneficiosos de la población fúngica en la maduración y el sabor de los productos cárnicos.

Actualmente se está estudiando el mecanismo de acción y el efecto de una combinación de agentes biológicos con actividad antifúngica (*P. chrysogenum* productor de la proteína PgAFP, *D. hansenii* y *P. acidilactici*) frente a mohos productores de OTA (*Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum*) en sustratos cárnicos.