

Los mohos de jamón curado: ¿amigos o enemigos?

Miguel Ángel Asensio Pérez

*Facultad de Veterinaria, Cáceres. Instituto Universitario de la Carne y Productos Cárnicos.
Universidad de Extremadura.*

Se denomina jamón curado al producto obtenido por salazón y maduración de perniles crudos de cerdo, diferenciándose diversos tipos en función de la raza, alimentación y condiciones de maduración. Es un producto muy apreciado por los consumidores, siendo mejor valorado el obtenido del cerdo de raza Ibérica pura, alimentado en montanera y sometido a un largo período de maduración en condiciones naturales. Este producto actualmente puede superar precios de 50 €/kg en piezas e incluso triplicar este precio en los productos loncheados.

La elaboración a partir de carne cruda permite que los enzimas del tejido muscular, principalmente las calpaínas y las catepsinas, degraden primero las proteínas miofibrilares en fragmentos intermedios, y que posteriormente exopeptidasas tisulares liberen aminoácidos (Toldrá y col., 1993). Los aminoácidos libres contribuyen directamente al sabor, pero también sirven de sustrato para la formación de aldehídos y alcoholes ramificados de gran impacto en el aroma y sabor de los productos curados (Antequera y Martín, 2001). Estas reacciones se favorecerían a temperaturas relativamente altas y con poca sal, lo que acortaría la maduración. Sin embargo, también permitirían el desarrollo de microorganismos alterantes, de aquí que las condiciones que se establecen para las primeras fases de la maduración respondan a un equilibrio para acelerar la maduración e impedir la alteración. Para controlar el desarrollo microbiano se aplica sal superficialmente, manteniendo el producto en frío hasta que la sal difunde a las partes más profundas de la pieza. Cuando la sal ha penetrado y la pieza ha perdido parte de su humedad, el producto se considera estable microbiológicamente y se puede aumentar la temperatura para acelerar la maduración. No obstante, las condiciones ambientales en que madura el jamón a partir de ese momento favorecen el desarrollo de una población fúngica en la superficie con diversas especies de levaduras y de mohos.

Los mohos incluyen especies capaces de desarrollarse en condiciones ambientales exigentes, con una gran variedad de rutas metabólicas y de enzimas. Al crecer en la carne, degradan componentes musculares, lo que les permite obtener nutrientes. Como consecuencia, algunos mohos provocan cambios indeseables, como las manchas negras en la superficie que alteran el producto debido a distintas especies del género *Cladosporium* (Andrade y et al., 2016). Además, algunos mohos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* producen aflatoxina B₁ (AFB₁) cuando crecen en jamón, al igual que *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum* producen ocratoxina A (OTA), o *Penicillium expansum* y *Penicillium griseofulvum* que producen patulina (Rodríguez et al., 2012a,b), lo cual representa una seria objeción desde el punto de vista sanitario que limita su comercialización.

Por el contrario, la actividad proteolítica y el metabolismo de algunos mohos incrementan los niveles de aminoácidos libres en el jamón, especialmente en los músculos superficiales (Martín et

al., 2004). La proteólisis y el incremento en aminoácidos libres a su vez contribuyen directamente al desarrollo de la textura y del sabor deseable en el jamón. Adicionalmente, los aminoácidos son el sustrato para ulteriores transformaciones que originan carbonilos ramificados (Martín et al., 2006), cuyo olor se asocia al de los productos cárnicos madurados. Más aún, la cantidad de algunos aldehídos derivados de la oxidación lipídica y de alcoholes (heptanal, octanal, hexanol) es menor cuando se desarrollan ciertos mohos, lo que se atribuye al consumo de oxígeno y a la actividad catalasa (Martín et al., 2006).

Por lo tanto, es necesario establecer un control selectivo de los mohos indeseables, permitiendo el desarrollo de los que contribuyen positivamente a la maduración pero impidiendo el desarrollo de los alterantes y los toxigénicos. De manera similar a como se utilizan los cultivos iniciadores en distintos alimentos madurados, se podrían inocular los mohos deseables en etapas iniciales del procesado para favorecer su implantación precoz en la superficie del jamón y controlar por exclusión competitiva a los mohos indeseables. Esta estrategia es eficaz cuando la materia prima se puede pasteurizar, para eliminar toda la microbiota que puede competir con el cultivo iniciador. Incluso puede dar resultados satisfactorios cuando la materia prima no se puede tratar, siempre que las condiciones de maduración no favorezcan claramente a otros microorganismos, como sucede en los embutidos madurados. En el jamón curado no suele dar buen resultado, especialmente en los productos de larga maduración, debido a que la evolución de la temperatura y actividad de agua favorece durante determinados periodos a algún moho indeseable.

Los métodos convencionales para combatir los mohos no resultan adecuados para el jamón. Por una parte, los métodos físicos aplicando calor, radiaciones UV-C o altas presiones requieren tratamientos repetidos porque no tienen efecto residual, pero ante todo modifican las características del producto. La maduración en atmósfera de CO₂ tiene un impacto negativo en las sensoriales (Sánchez-Molinero y Arnau, 2010), lo cual es inaceptable para este producto. Por lo que se refiere a compuestos antifúngicos, la legislación europea no permite su uso, ni siquiera de sorbatos, benzoatos y p-hidroxibenzoatos (Reglamento 1129/2011), dado que va en contra de lo esperable en un alimento tradicional o natural.

Por el contrario, pueden ser de gran valor las estrategias de biocontrol, aprovechando el potencial antifúngico de distintos compuestos naturales o microorganismos protectores. Algunos compuestos fenólicos, como el timol, el eugenol o el carvacrol, característicos de los aceites esenciales de especias como el tomillo, el orégano o el clavo, poseen efecto antifúngico. Sin embargo, su potente olor los hace totalmente inadecuados para el jamón curado.

Queda aún un último recurso, que consiste en aprovechar los compuestos de naturaleza polipeptídica con actividad antimicrobiana que producen desde microorganismos o plantas hasta los animales superiores. Estos compuestos ofrecen a los microorganismos una ventaja para desarrollarse frente a los competidores que tengan necesidades nutritivas y ecológicas similares. En los eucariotas pluricelulares forman parte del sistema de defensa frente a microorganismos invasores. Los péptidos sintetizados por bacterias, denominados bacteriocinas, aunque se

encuentran entre los más estudiados y mejor posicionados para uso alimentario, son poco eficaces frente a mohos.

Los péptidos antimicrobianos de los eucariotas suelen tener menos de 100 aminoácidos y sufren modificaciones postraduccionales, incluyendo proteólisis, glicosilación o amidación para dirigirse a estructuras esenciales en los mohos, pero que no se encuentran en los mamíferos. Las de mayor interés para el control biológico de los mohos indeseables en los alimentos son las producidas por levaduras o por mohos (Asensio et al., 2014). Las levaduras producen las denominadas proteínas *killer*, que se dirigen al β -glucano, las manoproteínas o la quitina de la pared celular del moho. *Debaryomyces hansenii* es la única levadura que se encuentra a niveles razonablemente altos en el jamón curado y cuya actividad antifúngica se ha atribuido a proteínas *killer* (Gil-Serna et al., 2009). No obstante, *D. hansenii* se desarrolla muy lentamente en las etapas finales de la maduración del jamón, que es precisamente cuando existe mayor riesgo por mohos toxigénicos.

Por lo que se refiere a los mohos, se han estudiado proteínas antifúngicas de diversas especies, incluyendo algunas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* habituales en jamón curado. Estas proteínas antifúngicas son pequeñas (5,5-10 kDa), básicas y con 6-8 residuos de cisteína, lo que les confiere una estructura compacta y resistente a temperaturas de hasta 100 °C, a valores de pH de 1 a 12 y a las proteasas que se encuentran normalmente en los alimentos (Delgado et al., 2015a; 2016a). Son activas frente a un reducido espectro de mohos, pero no afectan a bacterias ni a levaduras, lo cual representa una gran ventaja en los alimentos madurados.

De especial relevancia resulta la proteína PgAFP, producida por *Penicillium chrysogenum* aislado de jamón curado y de efecto fungistático frente a los mohos productores de ocratoxina A en productos cárnicos madurados (Delgado et al., 2015a; Rodríguez et al., 2015).

Tabla 1. Sensibilidad de cepas seleccionadas de mohos y levadura de alimentos frente a PgAFP (Delgado et al., 2015a).

Cepas muy sensibles ¹	Cepas poco sensibles ²	Cepas resistentes ³
<i>A. carbonarius</i> CECT 20384	<i>A. awamori</i> CBS 101.702	<i>P. chrysogenum</i> CECT 20922
<i>A. flavus</i> CECT 2687	<i>A. ochraceoroseus</i> CBS 101.887	<i>P. polonicum</i> Pp51
<i>A. fumigatus</i> CBS 192.65	<i>A. parasiticus</i> CECT 2682	<i>R. oryzae</i> CBS 607.68
<i>A. niger</i> An261	<i>A. tubigensis</i> CECT 20545	<i>C. zeylanoides</i> CECT 10048
<i>A. ochraceus</i> CECT 2092	<i>A. versicolor</i> CECT 2664	<i>D. hansenii</i> CECT 10360
<i>A. oryzae</i> CECT 2095	<i>P. aurantiogriseum</i> CECT 2918	<i>D. hansenii</i> Dh345
<i>A. tamarii</i> CBS 109.63	<i>P. commune</i> Pc131	<i>R. mucilaginoso</i> CECT 10395
<i>A. westerdijkiae</i> CECT 2948	<i>P. echinulatum</i> Pe321	<i>Y. lipolytica</i> CET 10358
<i>P. chrysogenum</i> Pg222	<i>P. expansum</i> CECT 2280	
<i>P. commune</i> Pc332	<i>P. griseofulvum</i> CECT 2919	
<i>P. nalgiovense</i> Pj261	<i>P. nordicum</i> CBS 110.769	
<i>P. restrictum</i> Pr341	<i>P. verrucosum</i> AB11C	
<i>P. solitum</i> Ps321		

¹: MIC₅₀ < 5 µg/mL.

²: Reducción del crecimiento en un 35% con 5-80 µg/mL.

³: No se logra una reducción significativa del crecimiento con 300 µg/mL.

El gen *pgafp* codifica la proteína PgAFP como una pre-pro-proteína de 92 aminoácidos, de los cuales los 18 primeros corresponden a un péptido señal que facilita la salida de la célula y del 19 al 34 es la típica prosequencia que impide que la proteína sea activa antes de su secreción. El péptido restante de 58 aminoácidos corresponde a la PgAFP madura, de 6494 Da (Rodríguez-Martín et al., 2010). La estructura más probable indica cinco láminas β antiparalelas formando un barril β estabilizada con 3 puentes disulfuro entre residuos de cisteína.

Las proteínas antifúngicas provocan cambios morfológicos, alteran la membrana y retrasan el desarrollo de los mohos sensibles. La proteína PgAFP se une a la pared celular del moho sensible, reduce la síntesis de quitina en la pared celular y aumenta el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca una pérdida de la integridad de la membrana y la muerte del moho por apoptosis. El mecanismo de acción de esta proteína antifúngica se ha estudiado mediante proteómica comparativa, utilizando equipos de espectrometría de masas que permiten analizar simultáneamente el nivel de una gran cantidad de proteínas y comparando la abundancia relativa de las proteínas en mohos tratados y no tratados (Delgado et al., 2015b; 2016b; 2017).

A partir de cultivos del microorganismo, tratado y no tratado con PgAFP, se filtra el micelio, se lisa y se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético. Tras la resuspensión, se hidrolizan con tripsina y se analizan en un espectrómetro de masas (Q-Exactive) tras la separación por cromatografía líquida. Los datos se analizan con el programa MaxQuant para asociar los distintos fragmentos a la proteína nativa y para comparar la abundancia relativa entre las dos condiciones. Para identificar la función de las proteínas que muestran mayores cambios se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes).

La proteína PgAFP desencadena cambios metabólicos que reducen el metabolismo energético, alteran la integridad de la pared celular y aumentan la respuesta al estrés. Cuando *Aspergillus flavus* se trata con PgAFP aumentan proteínas relacionadas con la síntesis de glutatión, de proteínas y de la hifa, lo que indica un esfuerzo infructuoso para contrarrestar la alteración de la pared celular y el aumento de ROS. Pero al mismo tiempo disminuyen proteínas relacionadas con la obtención de energía y la respuesta al estrés, lo que finalmente explica la inhibición. Los mohos resistentes a PgAFP también reaccionan, pero en este caso aumentando los niveles de proteínas que activan la síntesis de la pared celular, y así contrarrestan el efecto inhibitorio.

Como conclusión podemos afirmar que se cuenta con los elementos necesarios para dirigir la población fúngica del jamón durante la maduración, asegurando la presencia de los mohos responsables de los cambios deseables y de los productores de proteínas antifúngicas, lo cual permitirá obtener productos de la máxima calidad, evitando la presencia de mohos alterantes o productores de micotoxinas.

Agradecimientos

Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2004-336 06546-ALI, AGL2010-21623, AGL2013-45729-P), INIA (RM2006-00013-00-00) y FEDER

Bibliografía

Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Martín, A., Núñez, F., Asensio, M.A. (2009). Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 39–46

Antequera, T. y Martín, L. (2001) Reacciones químicas y bioquímicas que se desarrollan durante la maduración del jamón Ibérico. En *Tecnología del jamón Ibérico*, J. Ventanas, Mundiprensa, Madrid.

Asensio, M.A., Núñez, F., Delgado, J., y Bermúdez, E. (2014). Control of toxigenic molds in food processing. En: "Microbial Food Safety and Preservation Techniques. Ravishankar Rai Vital (Ed.) Taylor and Francis, Singapur.

Delgado, J., Acosta, R., Rodríguez-Martín, A. Bermúdez, E, Núñez, R., Asensio, M.A. (2015a). Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 23-29.

Delgado, J., Owens, R., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. (2015b). Impact of the antifungal protein PgAFP from *Pencillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 8701-8715.

Delgado, J., Peromingo, B., Núñez, F., Asensio, M.A. (2016a). Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds in dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion in Food Science*, 11: 40-45.

Delgado, J., Owens, R., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. (2016b). Increased chitin biosynthesis contributes to the resistance of *Penicillium polonicum* against the antifungal protein PgAFP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 371-383.

Delgado, J., Owens, R., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. (2016c). Antifungal proteins from moulds: analytical tools and potential application to dry-ripened foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 6991-7000.

Delgado, J., Owens, R., Doyle, S., Asensio, M.A., Núñez, F. (2017). Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. *Food Microbiology*, 66: 1-10.

Gil-Serna, J., Patiño, B., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2009a. Biocontrol of *Aspergillus ochraceus* by yeast. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. World Scientific, Singapur.

Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A. (2004) Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 55-66.

Reglamento (Ue) No 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. Diario Oficial de la Unión Europea L 295 de 12.11.2011. pp. 1-177.

Rodríguez, A. , Rodríguez, M. , Martín, A. , Delgado, J. , Córdoba, J.J. (2012a) Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science*, 92: 728-734.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Núñez, F., Córdoba, J.J. (2012b) Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control*, 27: 118-126.

Rodríguez, A., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Andrade, M.-J., Núñez, F., Córdoba, J.J. (2015). Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. *LWT - Food Science and Technology*, 60: 923-928.

Rodríguez-Martín, A., Acosta, R., Liddell, S., Núñez, F., Benito, M.J., Asensio, M.A. (2010). Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*, 31: 541-547.

Sánchez-Molinero, F., Arnau, J. (2010). Processing of dry-cured ham in a reduced-oxygen atmosphere: Effects on sensory traits. *Meat Science*, 85: 420-427.

Toldrá, F., Rico, E. y Flores, J. (1993). Cathepsin B, D, H and L activities in dry-cured hams, *Meat Science*, 23: 1-7.