



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

Identificación y caracterización de mohos aislados en diversos tipos de pan.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Nutrición Humana y Dietética

PRESENTADO POR: Noelia García Román

TUTELADO POR: Irma Caro Canales

Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición
y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia

Valladolid, 2020-2021

Resumen

El pan es uno de los alimentos por excelencia de la Dieta Mediterránea, su consumo per cápita en España es 37,8 kg. Algunas condiciones ambientales tanto en las industrias como en los hogares, como las altas temperaturas o la humedad pueden propiciar el crecimiento de microorganismos en el pan, como los mohos. Estos pueden ser peligrosos por la formación de metabolitos tóxicos, llamados micotoxinas, que pueden causar graves daños en la salud. En este estudio, la identificación y caracterización de diversos mohos y levaduras aisladas del pan fueron llevadas a cabo. Se utilizaron tres métodos de extracción de proteínas: la extracción con agua-ácido fórmico, extracción con perlas de zirconio y la extracción con etanol-agua. Las muestras fueron procesadas a través de MALDI-TOF MS. Se identificaron en total 15 de 21 cepas aisladas de mohos de diversos tipos de pan: barra, barra integral, pan candeal y pan de molde. Las cepas fueron encontradas tanto en la corteza como en la miga. Los principales géneros de mohos y levaduras identificadas en el pan fueron *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Candida spp.*

Palabras clave

Pan, mohos, levaduras, micotoxinas, MALDI-TOF.

Abstract

Bread is one of the main foods in Mediterranean Diet, its consumption per capita in Spain is 37,8 kg. Some environmental conditions in both industries and homes, such as high temperature or humidity can lead to microbial growth in bread, such as moulds. These could be dangerous because of the formation of toxic metabolites, called mycotoxins, which could cause several health damages. In this study, the identification and characterization of several moulds and yeasts isolated from bread were carried out. Three protein extraction methods were used i.e. extraction with a water-formic acid solution, extraction with zirconia-silica beads and extraction with ethanol-water solutions. Samples were then processed by MALDI-TOF MS. A total of 15 out of 21 mould strains isolated were identified by MALDI-TOF MS from several types of bread: loaf, wholemeal bread, candeal bread and sliced bread. The strains were found in both crust and crumb. The main genera of moulds and yeasts identified in bread were *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* and *Candida spp.*

Key words

Bread, moulds, yeasts, mycotoxins, MALDI-TOF.

Tabla de abreviaturas

MALDI-TOF **Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry**

a_w Actividad de agua

OMS Organización Mundial de la Salud

GCPSR Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition

DON Deoxinivalenol

OTA Ocratoxina

DG18 Dicloran-glicerol-cloranfenicol

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

Tabla 1. Tabla de abreviaturas.

ÍNDICE:

Justificación.	5
Introducción.	5
Importancia del pan en la nutrición humana y en España.	5
Estabilidad del pan.	6
Definición y estructura de los mohos y levaduras.	8
Técnicas de identificación de mohos.	10
Definición de micotoxinas, tipos y cantidades.	11
Objetivos.	12
Materiales y métodos.	13
Preparación de las muestras.	13
Preparación de los medios de cultivo.	14
Identificación de mohos a través de MALDI TOF.	14
Análisis de resultados	16
Resultados y discusión.	16
Conclusiones.	23
Bibliografía	25

Justificación.

La Dieta Mediterránea es conocida por la siguiente trilogía: trigo, olivo y vid. Dentro de la pirámide de la alimentación, en la base nos encontraremos el grupo de los farináceos, el más recurrente en nuestra dieta. En este grupo, el cereal es básico, pues es una fuente principal de hidratos de carbono y energía. El cereal con más presencia en nuestra dieta es el trigo. La forma más común del consumo de cereales son el pan o la pasta, sin embargo, el pan puede acompañar todas las comidas que se realizan a lo largo del día.

A pesar de que el pan es considerado un alimento estable, por su baja actividad de agua y sus valores de pH bajos, permite el crecimiento de ciertos microorganismos, entre ellos los mohos. Más aún, si la conservación de los productos a base de cereal no es adecuada, por ejemplo, si existe una humedad alta relativa pueden crecer especies de microorganismos como mohos y levaduras y producir sustancias tóxicas. Los mohos al crecer en alimentos con alto contenido de hidratos de carbono, la mayoría de ellos, producen sustancias tóxicas llamadas micotoxinas. Debido a esto, el conocimiento de los tipos mohos que pueden encontrarse en el pan nos permitirá conocer su posible implicación en la producción de micotoxinas y su repercusión en la calidad higiénica del pan.

Hasta hace pocos años, la caracterización e identificación de mohos se lleva a cabo por técnicas morfológicas. Sin embargo, actualmente se usan técnicas genéticas y técnicas basadas en el estudio de las proteínas ribosómicas, por ejemplo el análisis por MALDI-TOF.

Introducción.

Importancia del pan en la nutrición humana y en España.

El pan “es el producto resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina y agua, con o sin adición de sal, fermentada con la ayuda de levadura de panificación o masa madre”, según el Real Decreto 308/2019 (1). El pan es un producto valorado en los hogares por ser producido y consumido en el mismo día. Esta característica es importante, pues cada vez con más frecuencia nos encontramos productos precocinados en las despensas de nuestras casas, y el pan aporta esa idea de comida casera tradicional. Su bajo precio hace que sea un producto asequible para cualquier familia, pudiéndose comprar diariamente. Así mismo, aporta una gran cantidad de hidratos de

carbono complejos ayudando a disminuir los niveles sanguíneos de insulina, además es una fuente importante de fibra, que es un componente esencial en la Dieta Mediterránea por sus beneficios en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Debido a su gran consumo diario, nos permite sustituir otros alimentos insalubres por uno con bajo aporte lipídico. En un contexto de una dieta sana y equilibrada, mejora el perfil lipídico con bajos niveles colesterol LDL y más altos del colesterol HDL.

El consumo de pan en España en el año 2020 fue de 32.78 Kg/ persona año, el pan fresco normal, pan integral, pan sin sal fueron los que se consumieron en mayor medida (79.4%), seguido del pan fresco industrial (14,4%) (2). El pan industria congelado es uno de los productos que usa la industria alimentaria para la elaboración del pan fresco, este producto requiere un control de calidad más riguroso debido a que existen microorganismos como los mohos que pueden permanecer en estado latente a bajas temperaturas e incluso germinar y formar colonias a temperaturas de 4 °C (3).

Estabilidad del pan.

Aunque el pan es un producto que se consume diariamente, algunas veces en los hogares puede congelarse o almacenarse en lugares a temperatura ambiente y un ambiente húmedo. Además, la industria alimentaria produce pan congelado que se somete a un proceso de horneado en el mismo día de su consumo. La vida útil del pan se ve limitada por cambios físicos y microbiológicos que suceden durante el almacenamiento entre los que cabe mencionar el endurecimiento de la corteza o la absorción del agua cuando éste se almacena en lugares húmedos. Los principales parámetros intrínsecos que determinan la estabilidad del pan como de muchos alimentos son el pH y la actividad de agua. Existen muy pocos estudios sobre cómo afecta en esos parámetros en la estabilidad del pan, y en especial de los panes españoles. Un reciente estudio de Portales (2020) (4) recoge los valores de agua (a_w) y el pH de diferentes tipos de panes elaborados en Castilla y León.

En este estudio se comparó la a_w y el pH de la corteza y de la miga de distintas muestras de panes: barra de pan blanco, barra de pan integral, pan candeal y pan de molde. Los valores más altos de a_w correspondieron a la miga del pan blanco y del pan de barra integral (0,978 -0,979), seguidos del pan candeal que presentó un valor (0,967 ± 0,007). La corteza mostró los valores más bajos, siendo la corteza del pan de molde la que mostró una actividad de agua mayor (0,926 ± 0,017). Las cortezas de los otros tipos de panes mostraron valores de actividad de agua por debajo de 0.85, excepto la corteza de la barra integral que mostró valores de 0,890 ± 0,037. Así mismo, otros autores (5) (6) han realizado estudios de la actividad de agua sobre el pan de molde, encontrando valores superiores a

0,85. Respecto al pH, los valores de los diversos tipos de pan oscilaron entre 5.5- 6.05 siendo las migas del pan de molde y la de la barra artesanal las que mostraron el pH más bajo y el más alto, respectivamente (4). Por su parte, Jay (2008) (7) encuentra valores de pH entre 5.4 y 7.5 en diversos tipos de pan. Teniendo en cuenta los bajos valores de a_w y pH encontrados en los panes españoles, los microorganismos que con mayor probabilidad podrían causar una alteración microbiológica en este tipo de producto son los de mohos y levaduras, debido a que esta condiciones por un lado permite su crecimiento y por otro lado evitan el crecimiento de bacterias que podrían competir con estos microorganismos.

El crecimiento de los mohos y levaduras como otros microorganismos se ve influenciado principalmente por el contenido de agua y el pH. El óptimo de crecimiento de las levaduras se sitúa en el rango de 4.0 a 6.0 de pH aunque algunas especie de *S. cerevisiae*, pueden crecer en un rango de pH más bajo entre 2.5-8.5 (8). Levaduras son capaces de alterar los vegetales, causando pérdidas económicas y un alto riesgo para la salud del consumidor, además algunas levaduras han sido consideradas patógenos oportunistas debido a que podrían causar infecciones en varios órganos (9), siendo *C. albicans* una de las especies de levadura considerada como patógeno oportunista en individuos inmunocomprometidos (10).

Respecto a los mohos, estos pueden crecer por debajo de 0.85 de actividad de agua, son aerobios, aunque algunas especies pueden ser anaerobias facultativas, crecen a temperaturas de 4°C y en un rango de pH entre 3,5-6,5 (11) (12). De acuerdo con Rico-Munoz et al. (2017) (13) los mohos xerófilos son aquellos que pueden crecer por debajo de 0,85 de a_w , siendo estos mohos los que causan mayor alteración en los alimentos. En los productos horneados los géneros de mohos que pueden causar alteración son: *Penicillum*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Rhizopus* (5) (14).

Existen dos principales tipos de alteraciones en el pan, uno tipo de alteración conocida como “*bread staling*” que es un fenómeno complejo originado por múltiples cambios químicos como la retrogradación de amilo-pectina, pérdida y redistribución del agua, oxidación de las grasas, interacción gluten-almidón y la transformación del gluten (15), así como la alteración microbiológica que es una asociación entre levaduras, mohos y algunas bacterias (16).

Definición y estructura de los mohos y levaduras.

Los mohos son organismos que pertenecen al reino *Fungi*. Su disposición celular es eucariota, pues presenta un núcleo que alberga su material genético y está delimitado por una membrana celular. Poseen una pared celular rígida y, a diferencia de las células vegetales, el componente celular es la quitina y no la celulosa. Su forma de alimentación tampoco es como la de los vegetales, sino que son organismos heterótrofos por alimentarse a base de materia orgánica. Gran parte de las especies crecen en forma de filamentos pluricelulares denominados hifas, y al conjunto de estas se le denomina micelio. Sin embargo, algunas especies de mohos también son unicelulares (3).

El papel de los hongos y mohos es fundamental en la naturaleza, pues participan en el mantenimiento del ecosistema descomponiendo la materia orgánica, son fuente de alimentación para los seres humanos (trufas y setas), intervienen en la transformación de alimentos por fermentación como en el caso del vino, la cerveza o el queso, y además colaboran en la obtención de antibióticos y enzimas importantes en la industria farmacéutica y alimentaria (3).

Taxonómicamente, los mohos se divide principalmente en dos *fila*: Zigomicetos y Ascomicetos. Sin embargo, existe controversia por la descripción de una tercera *fila* llamada Deuteromicetos, aquellos mohos que no se conoce su fase sexual. Los mohos Zigomicetos son aquellos que producen esporas por reproducción sexual. Estas esporas se producen en unas estructuras denominadas zigosporangios. Pueden reproducirse de forma asexual, las estructuras que recogen las esporas asexuales se llaman esporangios (figura 1). Este *fila* no tiene especial relevancia desde el punto inocuidad alimentaria, es decir, en la formación de micotoxinas (3).

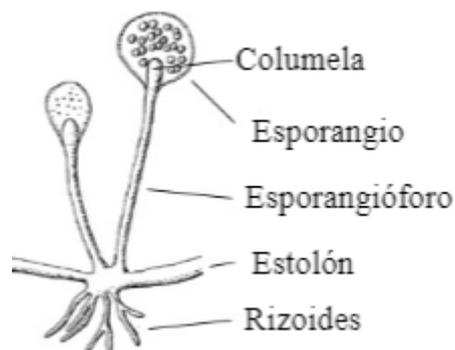


Figura 1: Estructura productora de esporangios.

Fuente: tomada de Morales (3).

Los mohos Ascomicetos representan el mayor *fila* del reino *Fungi*. La reproducción sexual se lleva a cabo a partir de las esporas sexuales llamadas ascosporas, por las estructuras que las contienen

denominadas ascas. En este *fila* también se produce la reproducción asexual mediante las llamadas conidiosporas (figura 2), que se desarrollan en estructuras denominadas conidios. Dentro de los Ascomicetos se encuentran las especies de mohos productoras de las micotoxinas más relevantes, pertenecientes a los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (3).

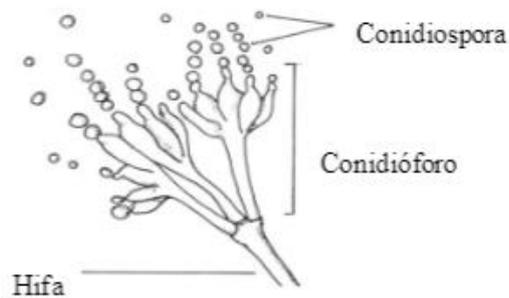


Figura 2. Estructura productora de conidiosporas.

Fuente: tomada de Morales (3).

Los mohos Deuteromicetos son un grupo disperso y heterogéneo que comparten la única característica de que no se conoce su fase sexual, probablemente perdida en su evolución. Un ejemplo sería *Aspergillus niger*, por no conocer su teleomorfo (estadio reproductivo sexual) (3).

Las levaduras son organismos unicelulares que crecen en colonias viscosas en forma de círculos o elipses (17). La mayoría de las levaduras son usualmente conocidas en la utilizan en la industria alimentaria por su función en la fermentación para la producción de alimentos tan comunes como el pan, la cerveza, el vino, la sidra entre otros, pero también pueden ser una de las principales causas de alteración de los alimentos (10).

Las levaduras son organismos eucariotas, pero sin sistema fotosintético. Su pared celular está compuesta de dos polisacáridos, el glucano y el manano. Pocas levaduras presentan hifas, sus células se denominan conidios (18).

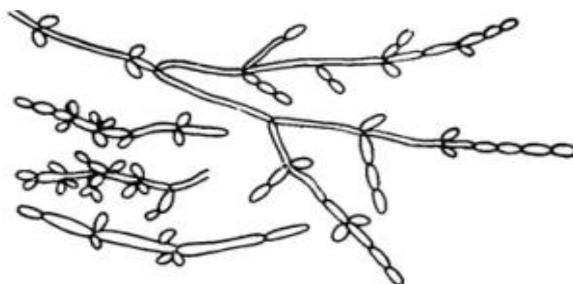


Figura 3: estructura de Candida. Fuente: tomada de Carrillo (17).

Técnicas de identificación de mohos.

La identificación de mohos tradicionalmente se ha llevado a cabo por técnicas morfológicas. Una de las técnicas más comunes en microbiología para la identificación de hongos es el examen de sus características morfológicas, la estructura de la colonia, el color de su superficie o la textura. De esta manera resulta sencillo diferenciar los hongos filamentosos de las levaduras, ya que los primeros producen colonias aterciopeladas, en forma de algodón o bien pulverulentas, mientras que las levaduras son húmedas, viscosas e incluso cremosas. Sin embargo, esta técnica de identificación es inespecífica, no siempre es suficiente, especialmente cuando se requiere diferenciar entre especies (19).

Además de este examen macroscópico, podemos hablar del análisis de sus características microscópicas, ya que la morfología a estos niveles es constante y con pocas variaciones. Esta técnica se basa tanto en la forma, como en la producción y ordenamiento de las esporas, siendo necesario saber la disposición y tamaño de las hifas. Además, existen otras técnicas moleculares distintas basadas en la concordancia genealógica llamadas *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR). Se conocen como las técnicas *gold standard* por la identificación de una gran variedad de especies de mohos, sin embargo, son más laboriosas y requieren de conocimientos técnicos especializados en comparación con otras técnicas utilizadas en la práctica clínica diaria que recientemente se han utilizado en algunos estudios (20).

Una de las técnicas recientemente utilizadas es el espectrómetro de masas "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry". Se denomina MALDI por sus siglas en inglés, traducidas a "desorción/ionización mediante láser asistida por matriz", mientras que TOF sería "Time of Flight" (tiempo de vuelo) y MS "Mass Spectrometry" (espectrometría de masas). MALDI-TOF es una técnica de ionización suave que permite la identificación de biomoléculas, en este caso se trata de proteínas ribosomales de los hongos. El uso de MALDI-TOF para la identificación de mohos está aumentando, debido a que las técnicas de identificación morfológicas no son suficientes en mohos sin esporulación. Este incremento del uso de MALDI-TOF provoca que se publiquen con mayor frecuencia estudios de los métodos de extracción de proteínas ribosomales, necesarios en los ensayos de identificación de mohos. Estos procedimientos se basan principalmente en etapas inactivación, lavado, para prevenir la contaminación potencial de los laboratorios y la extracción secuencial de proteínas con distintos solventes (21). Así mismo, recientemente esta

técnica ha suscitado un creciente interés en la identificación de mohos de origen clínico (21) (22) (23).

De acuerdo a la bibliografía consultada, se han propuesto tres formas de extracción de proteínas ribosomales para la identificación de mohos por MALDI-TOF:

- Extracción con agua-ácido fórmico (20).
- Extracción con perlas de zirconio: este método se basa en la fricción de las perlas de zirconio con la pared celular del hongo para poder llegar a las proteínas ribosomales (21).
- Extracción con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico, denominada extracción larga: la diferencia con los otros dos procedimientos es la incubación del micelio en caldo a 37°C y agitación. Además de esta agitación, es conveniente agitar de forma manual y efusiva los tubos, pues las esporas tienden a precipitar y esto no les permite reproducirse adecuadamente (20).

El método de extracción así como el tiempo de incubación podrían ser los principales aspectos a tener en cuenta que determinen el éxito de la identificación. Estos aspectos permitirán obtener un espectro adecuado, necesario para la comparación con la base de datos que determinará el género y la especie (20).

Definición de micotoxinas, tipos y cantidades.

Desde un punto de vista sanitario, el principal problema que puede ocurrir en la alteración del pan debido al crecimiento de los mohos, es la producción de micotoxinas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las micotoxinas son "compuestos tóxicos producidos de forma natural por algunos tipos de mohos". Existen multitud de esos compuestos en alimentos de consumo frecuente como los cereales, frutas, frutos secos, especias... Sin embargo, las micotoxinas que causan en mayor medida problemas de salud son: aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), patulina, fumonisinas, zearalenona, nivalenol y deoxinivalenol (DON) (24).

Las micotoxinas en su gran mayoría son químicamente estables y permanecen en los procesos de almacenamiento y procesado de los alimentos, incluso cuando son expuestos a altas temperaturas por ejemplo el horneado. Por ello, es necesario aumentar la vigilancia durante el almacenamiento y transporte para prevenir el crecimiento y desarrollo de mohos y por lo tanto la formación de las micotoxinas (25).

Las aflatoxinas son producidas por mohos llamados *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. Entre todas las micotoxinas, las aflatoxinas son las más tóxicas. Los alimentos más afectados son los cereales, las semillas oleaginosas, especias y frutos secos. La intoxicación aguda, provocada por el consumo de grandes dosis de aflatoxinas, se denomina aflatoxicosis. Esta puede ser mortal, afecta principalmente al hígado, llegando a producir cáncer hepático. Además, se ha demostrado que existen daños genéticos por esta intoxicación que derivan en otros tipos de cáncer (24).

La Ocratoxina A: varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* son las productoras de esta micotoxina. Es muy común en cereales y sus productos derivados. Se forma en el proceso de almacenamientos de los cereales. El órgano más afectado es el renal, aunque en humanos no se ha logrado llegar a esa asociación, sí que existen indicios de daños renales demostrados. Puede tener efectos nocivos también en el desarrollo fetal y en el sistema inmune (24).

Deoxivalenol: la micotoxina DON proviene de la familia tricotecenos, producidas principalmente por hongos del género *Fusarium*. Se encuentran en diferentes cereales, el DON específicamente se asocia a menudo con el trigo (24).

Tras múltiples estudio de los datos disponibles tanto en la bibliografía como en las plataformas científicas, el Comité Mixto FAO/OMS evaluó los riesgos para la salud para una ingesta máxima tolerable de micotoxinas, estableciendo que los niveles máximos de estos compuestos son muy bajos ya que poseen una gran toxicidad. Ese organismo estableció concentraciones máximas permitidas en los productos de panadería a base trigo:

- Aflatoxinas un rango de 0,5-15 µg/kg (24).
- Ocratoxina, niveles de ingesta semanales tolerables de 120 ng/kg de peso corporal, según el reglamento 1881/2006 (26).
- Deoxivalenol, ingesta diaria tolerable de 1 µg/kg de peso corporal, según el reglamento 1881/2006 (26).

Objetivos.

Objetivo general:

Estudiar los diversos mohos aislados de distintos tipos de pan mediante técnicas de espectrometría de masas.

Objetivos específicos:

- Comparar los distintos procedimientos de extracción de proteínas ribosomales para la identificación de mohos a través de MALDI-TOF.
- Identificación de los distintos tipos de mohos mediante MALDI-TOF.

Materiales y métodos.

Preparación de las muestras.

La preparación de las muestras se llevó acabo siguiendo las indicaciones de Portales (2020) (4) y a continuación se describe brevemente, se recogieron 4 tipos de pan de distintos establecimientos, el pan fue recubierto con una película de papel, las muestras se procesaron antes de 4 horas desde su recogida. En primer lugar se separó la corteza y la miga con ayuda de un cuchillo previamente esterilizado a la flama. A partir de la corteza o de la miga con la ayuda del cuchillo, se cortó cada parte en cubos de aproximadamente 1cmx1cm. A continuación, se pesaron 25 g tanto de corteza como de miga, y cada uno se introdujo a una bolsa estéril con un filtro dentro. A esa bolsa se le añadieron 225 ml de agua de peptona. Después se procede a la homogeneización de las muestras de pan con el agua de peptona durante 3 minutos.

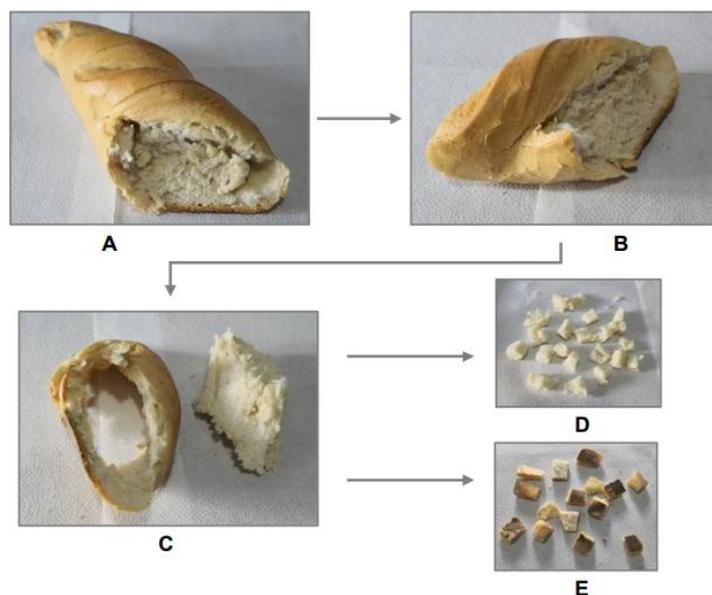


Figura 4: Proceso de separación de corteza y miga en panes. **A:** Corte longitudinal. **B:** Disminución de tamaño. **C:** división de corteza y miga. **D:** reducción y homogeneización del tamaño de la miga. **E:** reducción y homogeneización del tamaño de la corteza. Fuente: tomada de Portales (4).

Se sembraron 100 μ l de las diluciones seriadas apropiadas en una placa Petri que contienen medio de Dicloran-glicerol-cloranfenicol DG18 (Oxoid). Las placas se incubaron en oscuridad todas las

placas a temperatura de 20°C durante 3-7 días. Los recuentos se realizaron en placas Petri que contenían entre 30 y 300 colonias.

Preparación de los medios de cultivo.

Agua de peptona:

Se pesaron 0.1 g de peptona bacteriológica (VWR, BDH chemicals) que se diluyeron en 1000 ml de agua destilada. Una vez disuelta la peptona esta se depositó en frascos de 250 ml. Finalmente, los frascos que contenían el agua se esterilizaron en un autoclave (Selecta) a 125°C durante 30 min.

Dicloran-glicerol-cloranfenicol (DG18):

Se pesaron 110 g de glicerol (Scharlau), que se depositaron en un matraz aforado de 500 ml, posteriormente, se agregaron 15,75 g de DG18 (OXOID). Seguidamente, se enrasó con agua destilada hasta alcanzar los 500 ml y disolvió con ayuda de un imán hasta que la mezcla se homogeneizó. A continuación, se puso a un frasco de medio de cultivo, se introdujo en el microondas hasta que hierva y se esterilizó en una autoclave (P SELECTA) a 125°C durante 30 min. Finalmente, el cultivo se lleva a una temperatura de 55°C y de adición cloranfenicol (0,025 g liofilizados restituidos con 6 ml de agua destilada estéril), se mezcló adecuadamente y se introdujo el frasco con el medio de cultivo en un baño de agua caliente (P SELECTA) y vertió en placas Petri.

Identificación de mohos a través de MALDI TOF.

Para la identificación con MALDI-TOF, se hicieron crecer los mohos y las levaduras en DG 18, durante 4-5 días, como criterio se estableció que el tamaño de la colonia fuera al menos 5 mm para su correcta extracción proteica. Se utilizaron tres métodos de extracción de proteínas ribosomales:

- Extracción agua-ácido fórmico: Para llevar a cabo esta extracción se realizó una suspensión del moho en 2 ml de agua Elix, previamente esterilizada, hasta alcanzar una turbidez de 4 en la escala Mc Farland (Biomerieux). Los tubos se agitaron con ayuda de un agitador orbital (Raypa) durante 15 minutos. Posteriormente, se colocó en cada pocillo de la placa de ensayo 2 µl de cada muestra. Las muestras se dejaron secar al aire a temperatura del laboratorio, a continuación se agregó 1 µl de ácido fórmico al 70%, se dejó secar al aire, finalmente se adicionó 1 µl de matriz alfa-ciano-4-hidroxi-ácido cinámico (HCCA: Sigma) y llevo al MALDI-TOF para su identificación.
- Extracción con perlas de zirconio: se pesaron 0,05g de perlas de zirconio de 0,1 mm (BioSpec) de diámetro en un Eppendorf de 1,5 ml. Se añadió 500 µl de etanol al 70%. A

continuación se recogió el micelio de una colonia de moho con ayuda de un asa de siembra, se mezcló bien con el etanol y se agitó con un palillo de madera estéril. Seguidamente, se agitó durante 5 minutos aproximadamente con ayuda de un vortéx y se centrifugó con ayuda de una centrífuga (Eppendorf) durante 3 minutos a una velocidad de 13000 rpm. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante y se introdujeron las muestras en un termobloque (P Selecta) a 37°C para secarlas. Una vez secas, se agregó 50 µl de ácido fórmico al 70% y se agitaron durante 15 minutos. Por último, se adicionaron 50 µl de Acetonitrilo (Sigma), se agitó nuevamente y se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm. 1 µl del sobrenadante se colocó en los pocillos de la placa de ensayo. Por último, se agregó 1 µl de la misma matriz señalada en el método anterior.

- Extracción con caldo Sabouraud-etanol-acetonitrilo-ácido fórmico (**extracción larga**): Se recogió con ayuda de un asa de siembra el micelio de una colonia que tenía un tamaño de 5 mm de diámetro aproximadamente, crecida en DG18 y se inoculó en 5 ml de caldo Sabouraud (VWR Chemicals). Los tubos del caldo se incubaron durante 48 h o 72 h (hay algunas colonias que necesitan más tiempo de incubación para crecer correctamente) en agitación 120 rpm a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se recogió 1 ml del medio con suficiente micelio y se depositó en un tubo de centrífuga (Eppendorf). Seguidamente se centrifugó a 13500 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregó 1 ml de agua Elix previamente esterilizada. Se agitó en un vórtex durante un minuto cada después se centrifugó a 13500 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Para llevar a cabo la precipitación de las proteínas se agregaron 300 µl de agua Elix y 900 µl de etanol absoluto (99%, Sigma). A continuación, se agitó con ayuda de un agitador durante un minuto y se centrifugó a 13500 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Este paso lo consideramos como un punto crítico, ya que se necesita retirar todo el excedente de etanol para la correcta extracción. Si hay un exceso de etanol, se realiza un centrifugado a mayores y se quita el sobrenadante con pipetas de menor calibre para lograr una mayor exactitud. Se secaron las muestras con ayuda de un termobloque (P Selecta) a 37°C durante aproximadamente 45 minutos o una hora. Una vez secas, se añadió entre 15-20 µl de ácido fórmico (70%), dependiendo del tamaño del pellet. Finalmente, se agitó con ayuda de un agitador durante un minuto y se añadió la misma cantidad de acetonitrilo en cada Eppendorf. Por último, se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se recogió 1 µl sobrenadante de cada muestra para colocarlo en los pocillos de la placa de ensayo.

El programa utilizado en la medición de los espectros de masas fue Flex Control (versión 3.1; Bruker Daltonik). Se realizó una calibración previa a la obtención del espectro de masas con un estándar preparado a partir de proteínas ribosomales de *Escherichia coli* DH5. Posteriormente, se comprobó si los picos del espectro generado en esta calibración coincidían con el integrado en la biblioteca del programa MALDI Biotyper (versión 3.1). Seguidamente, se seleccionó y se guardó el método con el que el programa MALDI Biotyper usó de referencia en el análisis de las muestras. La identificación de las muestras depositadas en los pocillos de la placa de ensayo se realizó de forma automática tras haber seguido los pasos iniciales.

Los espectros obtenidos en cada muestra analizada se compararon con los espectros de la base de datos de la biblioteca del programa MALDI Biotyper. A partir de estos espectros se obtuvo una puntuación o *score*, según lo indicado por el proveedor (Bruker Daltonik), que clasifica con un semáforo de colores el género y la especie en función del valor obtenido (Tabla 2).

SCORE	PROBABILIDAD
0.000-1.699	Identificación no fiable.
1.700-1.999	Probable identificación de género.
2.000-2.299	Identificación de género segura, identificación probable de especie.
2.300-3.000	Alta probabilidad de identificación de especie.

Tabla 2. Interpretación del *score* generado por el programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Elaboración propia

Todos los análisis de las muestras se han realizado por duplicado.

Análisis de resultados

La comparación de la identificación de mohos se llevó a cabo con el programa Excel (Ofrece, 2019) y el análisis de la comparación de medias se llevó a cabo por el análisis de varianza de una vía con ayuda del programa SPSS Statistics Versión 24.

Resultados y discusión.

En la **Tabla 3**, se puede observar el recuento de mohos de diversos tipos de pan obtenidos de obradores artesanales y de industrias. Los valores medio de mohos presentes en el pan industrial se situaron entre 0,50 y 1.39 Log ufc/g, mientras el pan artesanal mostro unos valores de $0,42 \pm 1,851$

Identificación y caracterización de mohos aislados en diversos tipos de pan.

Log ufc/g. Además no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la corteza y la miga, ni entre los tipos de panes. El recuento de mohos fue mayor en las cortezas que en las migas de todos los panes excepto en la barra integral que fue superior en la miga que en la corteza. La corteza del pan candeal elaborado fue el que presentó mayor recuento de mohos 1,85 Log ufc/g. La presencia de mohos en el pan, en la circunstancia que se almacene a 4°C puede permitir el crecimiento de algunas especies de mohos clasificados como moderadamente xerófilos, mohos cuya actividad de agua crecen por debajo de 0,85 a_w como indica Rico-Munoz et al 2017 (13). De acuerdo a Portales (2020) (4), el pan candeal artesano tiene en promedio 0,836 de a_w valores que puede permitir el crecimiento de los mencionados mohos.

Tipo de pan	Localización	Mohos Log ₁₀ UFC/g	Tipo de pan	Localización	Mohos Log ₁₀ UFC/g
Artisanal			Industrial		
Barra	Corteza	1,01 ± 1,16 ^a	Barra	Corteza	1,39 ± 0,95 ^a
	Miga	0,91 ± 1,05 ^a		Miga	0,92 ± 1,07 ^a
Barra integral	Corteza	1,20 ± 1,38 ^a	Barra integral	Corteza	1,02 ± 1,18 ^a
	Miga	1,12 ± 1,32 ^a		Miga	1,39 ± 0,96 ^a
Pan candeal	Corteza	1,85 ± 0,21 ^a	Pan candeal	Corteza	0,50 ± 1,00 ^a
	Miga	0,85 ± 1,20 ^a		Miga	0,51 ± 1,02 ^a
Pan de molde	Corteza	0,85 ± 0,98 ^a	Pan de molde	Corteza	1,27 ± 0,85 ^a
	Miga	0,42 ± 0,85 ^a		Miga	0,92 ± 1,07 ^a

^{a-e} Columnas con distintas letras indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3. Recuento de mohos aislados de diversos tipos de pan separando miga y corteza. Elaboración propia.

En la **Figura 5**, se recogen los resultados de la identificación de 21 cepas de mohos aislados de pan a través de MALDI-TOF, utilizando tres métodos de extracción de proteínas ribosomales (extracción larga, extracción de perlas de zirconio y extracción agua-ácido fórmico). El nombre de las especies de mohos que se encuentran en la figura son aquellas que presentaron la puntuación más alta independientemente del método de extracción utilizado. Las cepas CE, CNE, CB, MV, MB no se identificaron con la extracción de agua-ácido fórmico, sino que se identificaron únicamente con el método de extracción de perlas de zirconio y el método de extracción larga. La puntuación de identificación establecida por Bruker (27) que determina el límite de detección a nivel de género es 1,7. Teniendo en cuenta este criterio podemos observar que 6 de las 21 cepas no lograron ser identificadas con ningún método de extracción. Este hecho pudo deberse a dos posibles situaciones: i) que el tipo de moho no se encuentre recogida en la base de datos utilizada durante la identificación y ii) que la cantidad de proteínas extraídas no haya sido suficiente. Las puntuaciones más altas se obtuvieron con el método de extracción larga; este hecho permitió identificar el mayor

número de cepas de mohos a partir del método mencionado. La extracción con perlas zirconio fue el segundo método que mostró mejores resultados. Incluso identificó alguna cepa que no se logró identificar con la extracción larga, como por ejemplo las cepas CB y MB. Finalmente, la extracción con agua y ácido fórmico fue el método con menor número de cepas identificadas. Este tipo de extracción sólo pudo identificar la cepa 2b como *Candida solani*. En este trabajo de investigación y tomando como criterio la puntuación 1,7 los métodos de extracción larga y con perlas de zirconio fueron coincidentes un 100% en la identificación a nivel de especie. Esta observación no coincide con Visagie et al. (2014) (23), quienes indican que la identificación a través de MALDI-TOF puede tener ciertas variaciones en las especies de un mismo género e incluso en los duplicados de la misma especie. Las diferencias encontradas en este estudio y lo indicado por Visagie et al. (2014) (23) pueden explicarse por el tipo de método de extracción utilizado en la identificación por MALDI-TOF. Entre los tres métodos utilizados en este trabajo, las principales diferencias se observaron entre los resultados obtenidos con la extracción agua-ácido fórmico y las otras dos extracciones. A través de la extracción con agua y ácido fórmico se identificaron especies que no coincidían con los resultados encontrados en las otras dos extracciones, como la cepa **1ra** identificada como *Filifactor villosus*, la cepa **15ra** identificada como *Arthrobacter ramosus* y la cepa **27ra** identificada como *Pichia occidentalis*, que finalmente, las tres, resultaron ser identificadas como *Penicillium chrysogenum*.

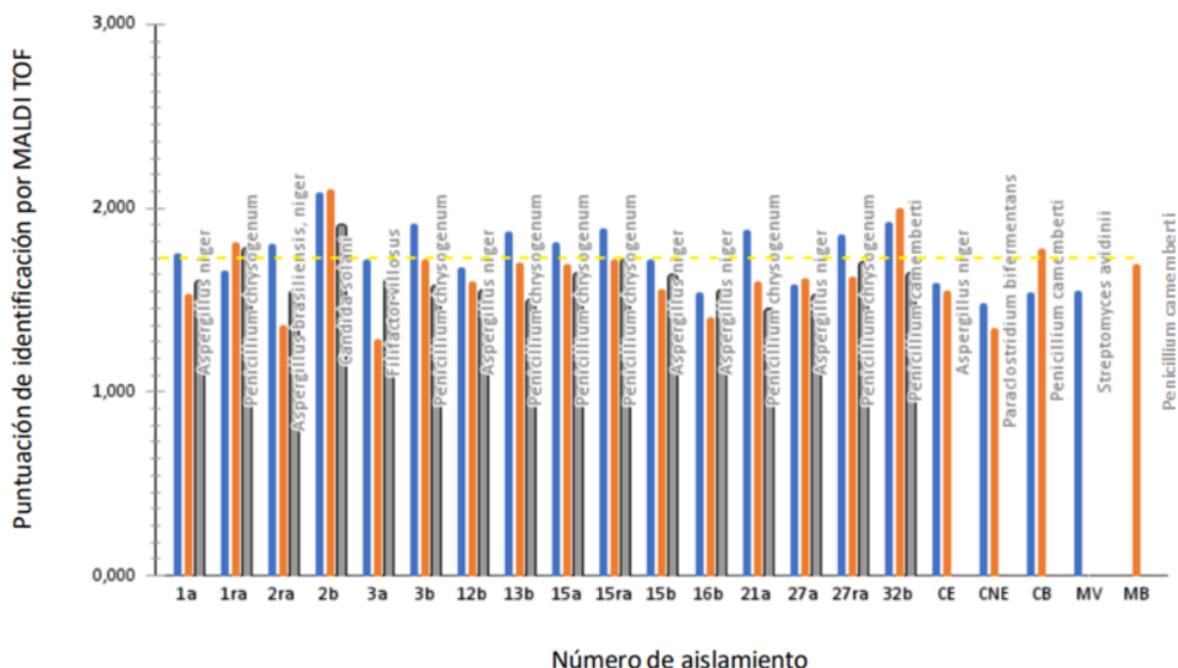


Figura 5. Identificación de mohos aislados de pan en DG18 por MALDI-TOF utilizando diversos métodos de extracción.

■ Extracción larga: extracción proteica con agua, etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. ■ Perlas de zirconio: extracción de proteínas con etanol, perlas de zirconio, ácido fórmico y acetonitrilo. ■ Agua-ácido fórmico: extracción proteica con agua y ácido fórmico. - - - Límite de detección para determinar género 1,7. Elaboración propia.

En la **Figura 6**, se recogen los porcentajes de identificación a nivel de especie por MALDI-TOF a partir de los métodos de extracción con más fiabilidad y mejores resultados, la extracción larga y la extracción con perlas de zirconio. La especie que se aisló con mayor frecuencia fue *Penicillium chrysogenum* alcanzando un porcentaje de 33,3%. Las otras dos especies que se aislaron en mayor número fueron identificadas como *Aspergillus niger* y *Penicillium camemberti* con un porcentaje de 14,3%, en ambos casos. En menores porcentajes se identificaron *Filifactor villosus* y *Candida solani*, ambos con un 4,8%. En este estudio, los dos géneros mejor identificados fueron *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*. Estos resultados coinciden con lo descrito por Morales (3), quien indica que estos dos géneros junto al género *Fusarium spp* son los más comunes en la naturaleza e importantes, desde el punto de vista inocuidad, debido a su carácter tóxico en la formación de micotoxinas. Sin embargo, Morales (3) indica que la especie micotoxigénica por excelencia es *Aspergillus flavus* debido a la formación de aflatoxinas y *Penicillium verrucosum* que produce OTA.

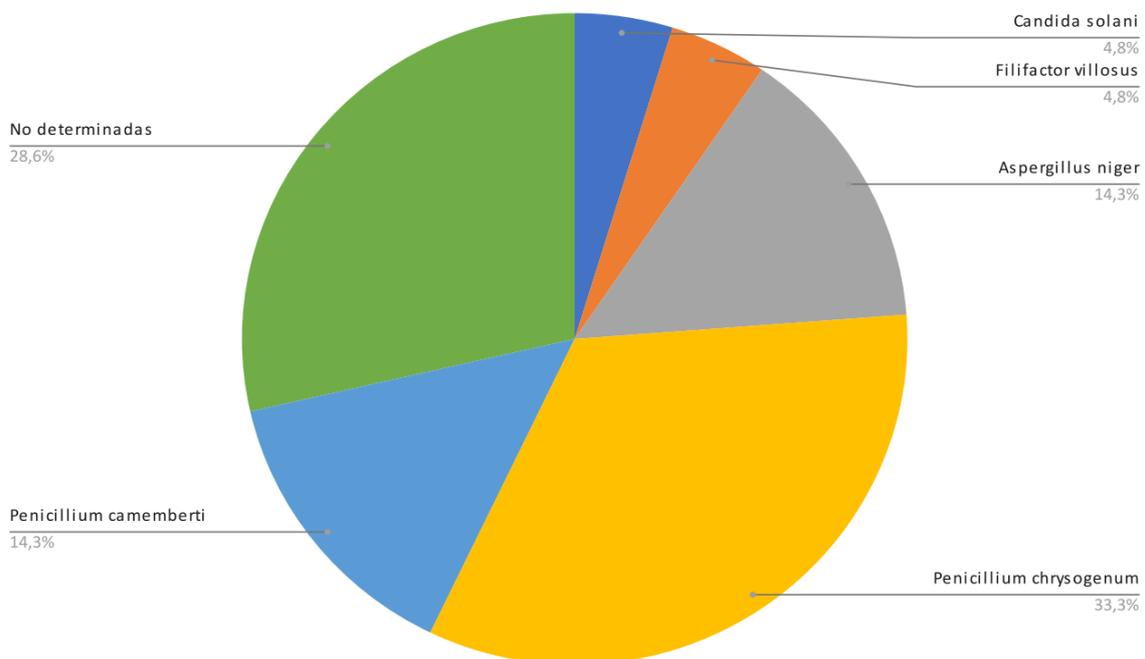


Figura 6. Principales especies de mohos identificados por MALDI-TOF usando dos métodos de extracción: extracción larga y perlas de zirconio. Elaboración propia.

La mayoría de las especies de mohos identificadas en este trabajo de investigación, ver **Figura 6**, no se han relacionado con la producción micotoxinas. Reiß et al. (1982) (28) mencionan que *Penicillium chrysogenum* puede producir micotoxinas en el pan, como la citrina, tanto en la corteza como en la miga ya que puede crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Cabe destacar que *Penicillium spp*, *Aspergillus spp* son los géneros responsable de la alteración de los productos horneados como el pan. (5) (14)

Respecto al porcentaje de cepas aisladas no identificadas, cabe resaltar que en este estudio no se pudo identificar el 28,6% de las cepas de mohos aisladas de pan. Comparando los dos métodos con mayor número de cepas identificadas, el método de extracción larga fue el método que presentó un mayor porcentaje de cepas no identificadas, 42,8%, en comparación con el método de extracción con perlas de zirconio que no identificó un 62%. Este porcentaje fue superior al obtenido por Luethy *et al.* (2018) (21), quienes obtuvieron un porcentaje de 12,26% de cepas que no superaron el límite de identificación de género impuesto por Bruker (27). Luethy *et al.*, (2018) (21) también encuentran un mayor porcentaje de cepas sin identificar en comparación con el estudio de Lau *et al.*, (2013) (22) realizado en el mismo laboratorio, esos autores mencionan que la diferencia observada entre sus resultados puede deberse a la inexperiencia en el manejo de los métodos de extracción.

En la **Figura 7**, se observan las diferencias morfológicas entre las fases de crecimiento de las cinco principales especies de mohos identificadas mediante MALDI-TOF. Pasado un tiempo de 3 días de incubación las colonias aisladas de las distintas cepas presentan un micelio generalmente blanco, a excepción de *Filifactor villosus* que desde el inicio tiene color verde. Después de 7 días de incubación se puede distinguir, ligeras diferencias, de cada cepa por sus características macroscópicas. *Filifactor villosus* se presenta en colonias verdes oscuras con la disposición de su micelio más compacto en comparación a otras especies de mohos. *Aspergillus niger* se caracteriza por el color negro de su micelio y su base blanca, además cabe destacar su facilidad de expansión en el medio de cultivo y de dispersión de esporas por el aire, que le permite ser un moho con gran capacidad invasora (29). El proceso de extracción para su correcta identificación se caracterizó por el momento de la recogida de muestra, pues especialmente *Aspergillus niger* solo se logró identificar con un tiempo de incubación inferior a 4 días. Esto se debe al engrosamiento de la pared celular de los mohos, que se caracterizan por ser más rígidas que otras células vegetales, y esta cualidad se confirma a medida que aumenta el tiempo de incubación de la cepa. Este hecho dificultó la extracción proteica para la identificación de esta especie. En el proyecto de Prieto (2018) (30), donde se recogen los mismos protocolos de extracción que los utilizados en este estudio, se indica con claridad que el tiempo de incubación es un factor muy relevante para una identificación correcta. *Candida solani* se distingue del resto por su textura húmeda y pastosa, ya que es una levadura unicelular. Esta cepa se logró identificar con MALDI-TOF con los tres métodos de extracción utilizados en este estudio en el 100% de las ocasiones que fue introducida para su análisis. Según Bader (2017) (31), las levaduras poseen unas paredes celulares menos rígidas que las de los mohos. Por ello, la técnica de identificación a través de MALDI-TOF podría ser utilizada adecuadamente para las levaduras, ya que el paso de extracción en el que se rompen sus paredes es más sencillo. En otros estudios en los que se comparan técnicas de identificación con reactivos colorimétricos y la técnica de MALDI-TOF, como el

de Idelevich (2014) (32), se obtuvieron resultados favorables de identificación alcanzando un 72,7% de cepas identificadas de *Candida spp.* y utilizando la técnica de sensibilidad colorimétrica frente a la identificación con MALDI-TOF (62,5% de especies identificadas). El porcentaje de identificación de *Candida spp.* en este estudio fue superior al obtenido en el estudio de Idelevich (2014) (32). *Penicillium chrysogenum* se caracteriza por un color azul verdoso y una gran extensión por todo el medio de cultivo. Como indica Visagie (2014) (23) en su estudio, la identificación a nivel especie de *Penicillium chrysogenum* se basaba en la morfología de los mohos. Sin embargo, esta forma de identificación puede inducir a error, ya que la morfología puede variar en función del medio de cultivo, humedad del ambiente, temperatura o incluso de la luminosidad del lugar donde se cultiven. Por ello, este hecho refleja la necesidad de la utilización de técnicas de identificación más complejas como MALDI-TOF. La única especie de mohos identificada en este estudio que sus colonias presentan unas características morfológicas distintas a las aceptadas regularmente es *Penicillium camemberti* que debería presentar colonias de color blanco pero en este estudio a medida que creció ese moho presentó colonias de color azul-verdoso con colores blancos en los límites de las colonias. Es posible que la técnica de MALDI-TOF no sea lo suficientemente específica para la identificación de esta especie, otra posibilidad es que el medio de cultivo utilizado en este estudio (DG18), cambie las características de las colonias como lo indica Visagie et al. (2014) (23), quien muestra que la morfología de las colonias de especie del género *Penicillium* por ejemplo *Penicillium crystallinum*, muestra coloraciones distintas dependiendo del medio de cultivo utilizado.

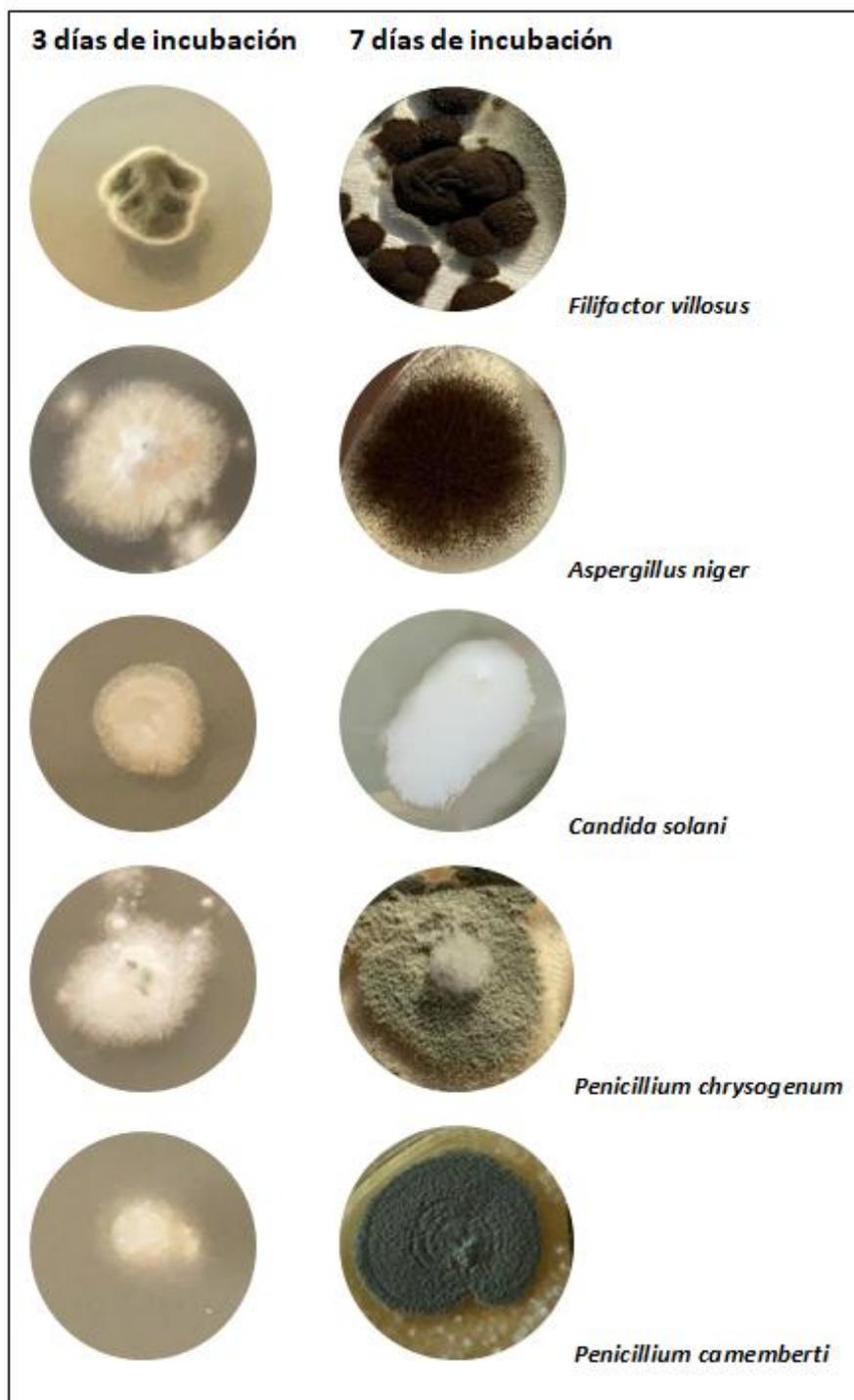


Figura 7. Características morfológicas de las colonias crecidas a 3 y 7 días de incubación en DG18 de las principales especies de mohos identificadas por MALDI-TOF. Elaboración propia.

En la **Figura 8** se pueden mostrar los espectros de masas obtenidos por la identificación a través de MALDI-TOF de las siguientes especies: *Candida solani* (A), *Penicillium chrysogenum* (B), *Aspergillus niger* (C) y *Penicillium camemberti* (D).

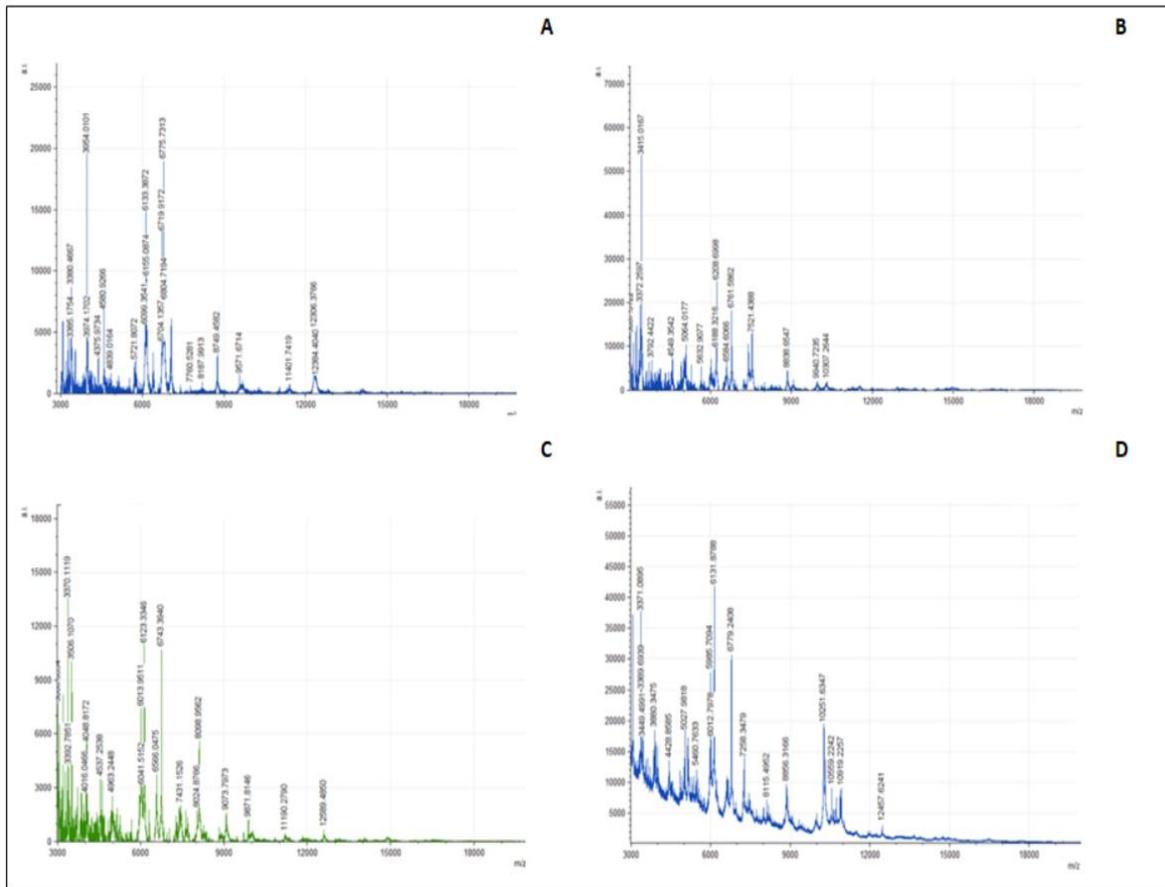


Figura 8. Espectros de masas obtenidos en la identificación de las principales cepas a través de MALDI-TOF. **A.** *Candida solani*. **B.** *Penicillium chrysogenum*. **C.** *Aspergillus niger*. **D.** *Penicillium camemberti*. **Eje de abscisas (m.z):** Carga de masas. **Eje de ordenadas (a.i):** Intensidad aparente. Elaboración propia.

Conclusiones.

Gracias al recuento de mohos de este estudio se evidencia la presencia de estos organismos en los diversos tipos de pan, artesanales e industriales. El recuento de mohos era superior en las cortezas que en las migas de todos los tipos de pan excepto en la barra integral.

El porcentaje de cepas identificadas fue dependiente del método de extracción utilizado, siendo el método de extracción de agua-ácido fórmico la que menor porcentaje de mohos identificó y el método de extracción larga fue el que permitió identificar un mayor número de cepas. Por ello, se sugiere como primera opción el método de extracción larga o una combinación de este método de extracción y el método de extracción con perlas de zirconio.

Las principales especies de las cepas de mohos aisladas de diversos tipos de pan, tanto de su corteza como de su miga, fueron: *Penicillium chrysogenum* (33,3%), *Penicillium camemberti* (14,8%), *Aspergillus niger* (14,8%), *Candida solani* (4,8%) y *Filifactor villosus* (4,8%). El tiempo de incubación

para la extracción de proteínas fue fundamental, el tercer día de incubación fue el tiempo idóneo para una extracción adecuada de las proteínas ribosomales.

Las técnicas de identificación utilizadas en el pasado se presentan hoy en día como métodos inespecíficos y que requieren de una gran experiencia en el laboratorio para realizar una identificación adecuada. Los resultados de este estudio demuestran la utilidad de la técnica de MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos como los mohos, de una forma rápida y eficaz.

Bibliografía

1. Real Decreto 308/2019, de 26 abril.
2. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe del Consumo Alimentario en España 2020. Gob España. [Online].; 2020. Available from: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020_baja-res_tcm30-562704.pdf.
3. Morales H. Mohos productores de micotoxinas. In Ramos A. Las micotoxinas y su efecto en la salud animal y humana. Madrid: Vicente Ediciones; 2011. p. 19-44.
4. Portales S. Calidad microbiológica del pan: *Bacillus cereus*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Valladolid; 2020.
5. Legan, JD. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*. ; 32: p. 1-3.
6. Smith JP, Daifas DP, El-Khoury W, Koukoutsis J, El-Khoury A. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004; 44(1): p. 19-55.
7. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media. 2008.
8. Liu X, Jia B, Sun X, Wang J, Zhao F, Zhan J, et al. Effect of initial PH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Sci*. 2015; 80(4): p. 800-808.
9. *Manual of Clinical Microbiology*. American society of microbiology; 2015.
10. Riesute R, Salomskiene J, Saez Moreno D, Gustiene S. Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology*. 2021; 108: p. 1-10.
11. Lopez-Malo A, Alzamora SM, Argai A. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. *Food Microbiology*. 1995 Febrero; 12: p. 213-219.
12. van der Tempel T, Nielsen MS. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology*. 2000 unio; 57(3): p. 193-199.
13. Rico-Munoz E, Samson RA, Houbraken J. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*. 2019; 81: p. 51-62.
14. Poute JG, Tsen CC. Bakery products. In :Beuchat LR, editor. *Food and Beverage Mycology*. Segunda ed. NewYork: VNR; 1987. p. 233–267.

15. Curti E, Bubici S, Carini E, Baroni S, Vittadini E. Water molecular dynamics during bread staling by Nuclear Magnetic Resonance. *LWT-Food Science and Technology*. 2011 Mayo; 44(4): p. 854-859.
16. Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Strom K, et al. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*. 2007; 45: p. 309-318.
17. Carrillo L, Carina M. *Manual de Microbiología de los Alimentos*. San Salvador de Jujuy: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias; 2007.
18. Arevalo SM, Viñas I, Usall J. Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1). Lleida: Universitat de Lleida; 1998.
19. Martí MC, Alonso RM, Constans A. Calidad del aire interior: identificación de hongos. España: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 20004. Report No.: Report No: NPT 488.
20. Maldonado I, García D, Striebeck P, Lafage M, Fernández L. Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Argent*. 2017; 49(1): p. 7-14.
21. Luethy PM, Zelazny AM. Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2018 Junio; 91(2): p. 130-135.
22. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a Clinically Comprehensive Database and a Simple Procedure for Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *JCM*. 2013; 51(3): p. 826-834.
23. Visagie CM, Houbraeken J, Frisvald JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Micology*. 2014 Septiembre; 78: p. 343-371.
24. Mycotoxins. World Health Organization; 2018.
25. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Gob España; 2015.
26. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006. 2006 diciembre 19.
27. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018; 22(1): p. 35-45.
28. Reib J. Studies on the Ability of Mycotoxins to Diffuse in Bread. *European J. Appl. Microbiol*. 1982; 12: p. 239-241.
29. Buendia B, Lopez-Brea M. ¿Qué debemos saber sobre *Aspergillus*? *Enferm Infec Microbiol Clin*.

2001; 19: p. 142-144.

30. Prieto Nuñez NM, Parra Giraldo CM. Establecimiento de Protocolos Operativos Estándar (POE) para la Identificación de hongos filamentosos patógenos para el humano relacionados con los filos Ascomycota y Mucoromycota por la tecnología MALDi-TOF/MS. Tesis Doctoral. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2018.
31. Bader O. Fungal Species Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In :Lion T. Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York: Springer Science+Business Media LLC.; 2017. p. 323-337.
32. Idelevich EA, Grunewald CM, Wullenber J, Becker K. Rapid Identification and Susceptibility Testing of Candida spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. PLoS One. 2014; 9(12): p. 1-14.