

Cultivos Lácteos Funcionales

Susana Delgado, Ana Belén Flórez, Ángel Alegría, Elena Rodríguez y Baltasar Mayo

Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC, Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias

De forma histórica, nuestro grupo se ha centrado en la Microbiología de los productos lácteos tradicionales (en particular quesos) con una especial dedicación a la identificación, selección y caracterización de microorganismos tecnológicamente relevantes que puedan utilizarse como fermentos y/o como cultivos adjuntos, centrándonos principalmente en las bacterias ácido-lácticas (BAL). De manera más reciente hemos abierto una línea de trabajo en Microbiología gastrointestinal con el objetivo de identificar y seleccionar cepas de BAL y de bifidobacterias con utilidad probiótica.

MICROBIOLOGÍA DE QUESOS TRADICIONALES Y DISEÑO DE FERMENTOS

Las propiedades aromáticas y gustativas de los productos lácteos tradicionales dependen de una larga serie de factores entre los que podemos destacar la alimentación de los animales, las prácticas y tecnologías de elaboración y la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos responsables de la acidificación y maduración. La composición, actividad y evolución de los distintos tipos microbianos juega también un papel crucial en el desarrollo de las cualidades higiénicas y de conservación de estos productos. Resulta, pues, esencial la identificación y caracterización de los microorganismos que participan en la elaboración de los productos artesanales para reproducir de manera controlada las fermentaciones tradicionales o para emprender otras nuevas (Alegría et al., 2010; Delgado y Mayo, 2004). Junto a las técnicas convencionales de cultivo, en los últimos años hemos implementado técnicas microbiológicas independientes de cultivo como la DGGE, la construcción y análisis de genotecas de secuencias conservadas y, últimamente, técnicas de secuenciación masiva como la pirosecuenciación. Las técnicas cultivoindependientes se consideran hoy indispensables para estudiar la diversidad microbiana de ecosistemas complejos, incluyendo los de las fermentaciones alimentarias.

En esta línea, el grupo ha trabajado en la caracterización y tipificación microbiana de diversos quesos tradicionales de Asturias y hemos colaborado en la tipificación de otros quesos extranjeros. Así, hemos llevado a cabo la tipificación del queso de Penamellera (Estepar et al., 1999), para el que propusimos una mezcla de cepas bien caracterizadas de *Lactococcus lactis* como fermento específico. De forma más reciente, abordamos una nueva caracterización microbiológica del queso de Cabrales (Flórez et al., 2006; Flórez y Mayo, 2006); uno de los productos estrella de los quesos tradicionales españoles. Como resultado del estudio propusimos una mezcla de cepas de *L. lactis* como fermento específico y seleccionamos dos cepas de *Penicillium roqueforti* con buenas aptitudes tecnológicas (Flórez et al., 2007). El fermento se ensayó ampliamente durante más de dos años en condiciones reales de elaboración y, en la actualidad, la mezcla bacteriana se ha licenciado a la empresa Bioges Starters SA que la produce a petición de los productores agrupados en torno al Consejo Regulador de la Denominación de Origen "Queso de Cabrales". En los últimos tiempos hemos estudiado también el queso Casín (Alegría et al., 2009), uno de los quesos tradicionales españoles más original. En el Casín apareció como población microbiana dominante la especie *Lactococcus garvieae*, la cual parece ser responsable de la acidificación (Fernández et al., 2010); durante la maduración,

las cepas de *L. garvieae* se ven reemplazadas por cepas de *L. lactis*. Entre otros hitos, destacamos la identificación y caracterización de una serie de cepas con genotipo *L. lactis* subsp. *cremoris*, escasas y muy apreciadas como fermentos, que se analizaron en comparación con cepas de la misma procedencia de genotipo *L. lactis* subsp. *lactis* (Fernández et al., 2011). Cepas de BAL de todas estas colecciones se han transferido de forma reciente a empresas de cultivos como Chr. Hansen, Biópolis SL, o Proquiga SA.

MICROBIOLOGÍA GASTROINTESTINAL Y SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

La microbiota normal del tracto gastrointestinal tiene un papel reconocido en preservar y mantener el estado de salud. Los objetivos de nuestros trabajos pretenden contribuir a la caracterización microbiológica de los distintos tramos de este ecosistema complejo y, al mismo tiempo, identificar y seleccionar cepas que puedan utilizarse como probióticos. En un primer momento trabajamos sobre la microbiología de heces y mucosa colónica y recientemente hemos terminado la caracterización microbiana del estómago. Al igual que en los quesos, en estos hábitats hemos utilizado también técnicas convencionales de cultivo y técnicas cultivoindependientes (Delgado et al., 2006). Uno de los logros más importantes de estos trabajos ha consistido en construir amplias colecciones de lactobacilos y bifidobacterias procedentes del intestino humano con gran potencialidad probiótica (Delgado et al., 2007; Delgado et al., 2008). Estas constituyen el material biológico del trabajo actual del grupo y se han cedido también a otros grupos del IPLA. Además, las colecciones constituyen uno de nuestros mejores activos para participar en proyectos transnacionales, como la participación que tuvimos en el proyecto europeo ACEART (CT506214) dedicado al estudio de resistencia a antibióticos en BAL y bifidobacterias. En el proyecto se detectaron diversas cepas con resistencias atípicas de las que analizamos sus bases moleculares (Flórez et al., 2006a; Flórez et al., 2006b)). Entre otras, se identificó una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con resistencia a eritromicina debida a una mutación puntual en el gen que codifica el ARNr 23S (Flórez et al., 2007); sus buenas propiedades probióticas, su fácil reconocimiento y la posibilidad de utilizarla para restaurar la microbiota intestinal tras el tratamiento prolongado con macrólidos, permitió su protección bajo patente (nº de publicación ES2328651). La patente de la cepa se ha licenciado de forma reciente a la empresa Biópolis SL. Otras cepas intestinales seleccionadas se han licenciado de forma más reciente a la empresa Bioges Starters SA.

En muchos casos, a la caracterización fenotípica y funcional le ha seguido una caracterización genética. Así, se han caracterizado plásmidos de BAL (Sánchez y Mayo, 2004) y bifidobacterias (Álvarez-Martín et al., 2008) para la posterior construcción de vectores de clonación y expresión para estos grupos bacterianos; vectores indispensables en los estudios moleculares y con vistas a su futura modificación genética.

PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

Alegría A, Álvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S y Mayo B (2009). Diversity and evolution of majority microbial populations during manufacturing and ripening of Casín, a Spanish traditional, starter-free cheese made of raw cow's milk. *Int J Food Microbiol.* 136:44-51.

Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales. De izquierda a derecha, Ana Belén Flórez (Juan de la Cierva), Lara Rodríguez (Proyecto Fin de Máster), Estefanía González (Proyecto Fin de Máster), Alicia Noriega (auxiliar contratada), Susana Delgado (Juan de la Cierva), Ángel Alegría (doctorando), Anely Leite (doctoranda invitada, Universidad de Rio de Janeiro, Brasil), Baltasar Mayo (Investigador Científico CSIC), Luca Losurdo (doctorando invitado, Universidad de Bari, Italia).



- Alegría A, Rocés C, López B, Delgado S y Mayo B (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol* 143:61-66.
- Álvarez-Martín P, Flórez AB, Margolles A, del Solar G y Mayo B (2008). Improved cloning vectors for bifidobacteria based on the *Bifidobacterium catenulatum* pBC1 replicon. *Appl Environ Microbiol*. 74:465-466.
- Delgado S y Mayo B (2004). Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int J Food Microbiol*. 90:309-319.
- Delgado S, Suárez y Mayo B (2006). Identification of dominant bacteria in faeces and colonic mucosa from healthy Spanish adults by culturing and by 16S rDNA sequence analysis. *Digest Dis Sci*. 51:744-751.
- Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G y Mayo B (2007). Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J Food Sci*. 72:310-315.
- Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G y Mayo B (2008). In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *J Appl Microbiol*. 104:1119-1127.
- Estepar J, Sánchez MM, Alonso L y Mayo B (1999). Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 9: 737-746.
- Fernández E, Alegría A, Delgado S y Mayo B (2010). Phenotypic, genetic and technological characterisation of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. *Int Dairy J*. 20:142-148.
- Fernández E, Alegría A, Delgado S y Mayo B (2011). Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *lactis* and *cremoris* genotypes isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Appl Environ Microbiol*. 77:5324-5335.
- Flórez AB, Álvarez-Martín P, López-Díaz TM y Mayo B (2006). Microbiological characterization of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *Eur Food Res Technol*. 223:503-508.
- Flórez AB y Mayo B (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol*. 110:165-171.
- Flórez AB, Ammor MS, Álvarez-Martín P, Margolles A y Mayo B (2006a). Molecular analysis of *tet(W)* gene-mediated tetracycline resistance in dominant intestinal *Bifidobacterium* species from healthy humans. *Appl Environ Microbiol*. 72:7377-7379.
- Flórez AB, Ammor MS, Delgado S y Mayo B (2006b). Molecular analysis of a chromosome-carried *erm(B)* gene and its flanking insertion points in *Lactobacillus johnsonii* G41. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:4189-4190.
- Flórez AB, Álvarez-Martín P, López-Díaz TM y Mayo B (2007). Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese and technological characterisation of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* strains. *Int Dairy J*. 17:350-357.
- Flórez AB, Álvarez-Martín P, Ladero V, Ammor MS, Álvarez MA y Mayo B (2007). Acquired macrolide resistance in *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in the 23S rRNA gene. *Int J Antimicrob Agents*. 30:341-344.
- Sánchez S y Mayo B (2004). General and specialized vectors derived from pBM02, a new rolling circle replicating plasmid of *Lactococcus lactis*. *Plasmid*. 51:265-271.

Libros

Título: MICOTOXINAS Y MICOTOXICOSIS

Coordinador: Dr. Antonio J. Ramos (Varios autores).

486 Páginas, 18 capítulos 180 Ilustraciones (fotografías, dibujos, cuadros y tablas)

Tamaño: 24 x 17 cms.

AMV Ediciones, Madrid.

Año: 2011 (1ª Edición). ISBN: 9788496709706.

El libro aborda los principios básicos de la micotoxicología, describiendo no sólo los principales grupos de micotoxinas descubiertos hasta la fecha, sino también los principales mohos productores, su ecofisiología y los métodos de detección más habituales. Por otra parte, y de gran interés para las empresas productoras de alimentos, incluye información relevante sobre el sistema HACCP en relación con las micotoxinas, y hace un recorrido exhaustivo sobre el efecto tóxico, la denominada micotoxicosis, que este tipo de compuestos ejerce sobre los diferentes grupos de animales. Por último, esta obra hace una

detallada descripción de las normas legales que regulan la presencia de estos tóxicos en el mundo, centrándose especialmente en la Unión Europea, así como en los principales países productores de alimentos de Iberoamérica.

Micotoxinas y Micotoxicosis pretende ser una obra de utilidad para todos aquellos que quieran profundizar en este aspecto de la Seguridad Alimentaria, siendo útil tanto para los estudiantes universitarios como para los profesionales de la industria, los investigadores y docentes. El libro reúne las aportaciones de más de una treintena de científicos y docentes de seis países iberoamericanos diferentes, todos ellos miembros de una red internacional dedicada al estudio de las micotoxinas financiada por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), y que lleva por título "Cooperación científica orientada a la búsqueda de estrategias de prevención y control de las micotoxicosis para mejorar las condiciones sanitarias en la producción pecuaria (Acción 109AC0371)".