

microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *J Food Eng.* 100:349-356.

Somolinos M, García D, Mañas P, Condón S, Pagán R (2010). Organic acids make *Escherichia coli* more resistant to Pulsed Electric Fields at acid pH. *Int J Food Microbiol.* 136:381-384.

Arroyo C, Cebrián G, Pagán R and Condón S (2011). Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *Int J Food Microbiol.* 144:446-454.

Arroyo C, Cebrián G, Mackey BM, Condón S and Pagán R (2011). Environmental factors influencing the inactivation of *Cronobacter sakazakii* by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* 147: 134-143.

Gayán E, Monfort S, Álvarez I and Condón S (2011). UV-C inactivation of *E. coli* at different temperatures. *Inn Food Sci Emerg Technol.* 12:531-541.

Grupo Fermentos Lácticos y Bioconservación (DairySafe)

Ana Rodríguez González, Beatriz Martínez Fernández y Pilar García Suárez
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). 33300-Villaviciosa, Asturias, España

El grupo de investigación inició su andadura con la inauguración del IPLA-CSIC en 1990 promovido por la Dra. Ana Rodríguez González (Investigador Científico del CSIC) quien, junto a la Dra. Beatriz Martínez (Científico Titular del CSIC) y la Dra. Pilar García Suárez (Científico Titular del CSIC), forma actualmente el núcleo científico del mismo. Asimismo, forman parte del grupo el personal técnico (1 Titulado Superior, 2 Titulados Técnicos y 1 JAE-Tec CSIC) y 4 becarias predoctorales.

La actividad investigadora se enmarca en la línea estratégica del IPLA-CSIC denominada: “Calidad y Seguridad de Productos Lácteos”, y se articula en 2 líneas de trabajo: *Fermentos específicos de nuevo diseño para la industria láctea* y *Antimicrobianos naturales con potencial biotecnológico*.

FERMENTOS ESPECÍFICOS DE NUEVO DISEÑO PARA LA INDUSTRIA LÁCTEA

La gran producción quesera artesanal de Asturias fue determinante para iniciar la primera línea de trabajo, orientada a proporcionar a cada queso su “seña de identidad” mediante la selección de aquellas bacterias lácticas silvestres, aisladas de los propios

quesos, que contribuyen a potenciar sus características particulares. Nuestra colección de bacterias lácticas es fruto de la caracterización microbiológica de quesos artesanales asturianos (*Gamoneu*, *Afuega'l Pitu*, *Los Beyos*) y refleja la biodiversidad presente en los quesos artesanales de nuestra región (Figura 1). Las características tecnológicas estudiadas tales como capacidad de acidificación, actividad proteolítica, lisogenia, producción de compuestos aromáticos, de exopolisacáridos, actividad antimicrobiana y resistencia a bacteriófagos, han permitido seleccionar las más adecuadas para formar parte de cultivos iniciadores (fermentos autóctonos). Entre los logros de esta línea de trabajo cabe destacar el diseño de un fermento mixto autóctono para el queso *Afuega'l Pitu*, queso de coagulación ácida producido en Asturias, que está siendo comercializado (IPLA 001 500) por la empresa BIO-GES Starters. Además, el grupo ha definido las condiciones de conservación de este queso en atmósfera protectora, en colaboración con la Quesería La Figar (La Foz, Morcín, Asturias), lo que se ha traducido en un notable aumento de su vida útil.

Actualmente colaboramos con el Profesor José Antonio Otero (Universidad de Cantabria) en la selección de bacterias lácticas



Miembros del Grupo DairyDafe en 2011. De izquierda a derecha y en fila trasera: Beatriz Martínez Fernández, Pilar García Suárez, Roxana Calvo Méndez (Técnico Superior), Diana Gutiérrez Fernández (Becaria FPI), Lorena Rodríguez Rubio (Becaria Programa Severo Ochoa, Principado de Asturias) y Ana Rodríguez González; en fila delantera: Silvia Portilla Vázquez (Becaria CONACIT, México), Diana Lueces Quesada (JAE-Tec CSIC), Pablo González Pérez (Técnico Superior), Clara Rocés Rodríguez (Becaria JAE-Pre CSIC) y Ana Belén Campelo Diez (Titulado Superior).

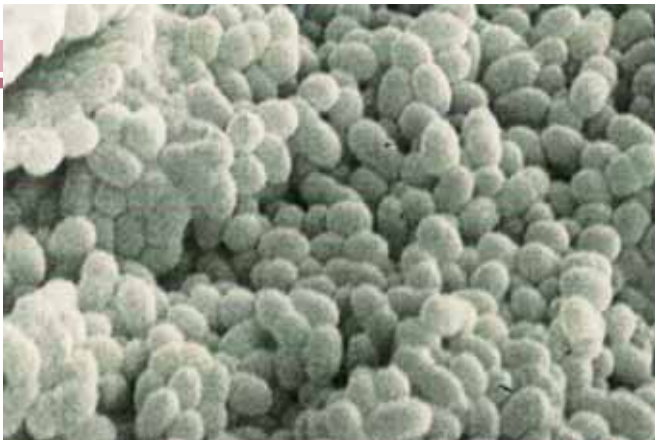


Fig. 1. Micrografía de la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA1029 aislada de queso.

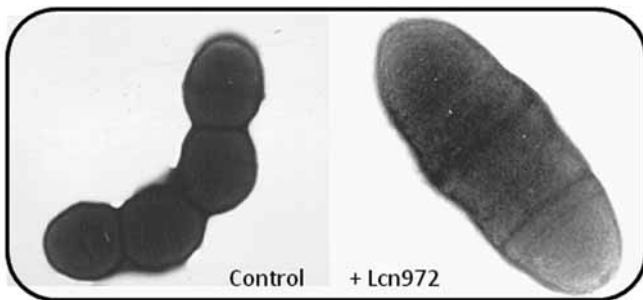


Fig. 2. Visualización (microscopio electrónico de transmisión) de los cambios estructurales provocados por la bacteriocina Lcn972 en *Lactococcus lactis* (en Martínez et al. (2000). Microbiology 146: 949-955).

silvestres, capaces de producir altas cantidades de ácido láctico utilizando como sustrato subproductos de la industria láctea.

ANTIMICROBIANOS NATURALES CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Esta línea de trabajo plantea el uso de antimicrobianos naturales (bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, bacteriófagos y sus enzimas líticas) con objeto de inhibir los microorganismos indeseables que puedan comprometer la seguridad y la calidad de los productos lácteos. Hemos aislado cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina Z, lacticina 481 y lactococina 972 (Lcn972), y de *Lactobacillus paraplantarum* productoras de coagulina A, una variante natural de la pediocina PA-1, y se ha optimizado su producción en biorreactor. La incorporación de una cepa productora de nisina Z a una mezcla de cepas mesófilas acidificantes y aromáticas ha permitido el diseño de un cultivo iniciador protector eficaz en el control del desarrollo de bacterias alterantes (*Clostridium tyrobutyricum*) y patógenas (*Staphylococcus aureus*) en quesos de pasta lavada y coagulación ácida. Cabe señalar además que la bacteriocina Lcn972 inhibe la formación del septo durante la división celular en lactococos, un modo de acción único que utilizamos como herramienta para el diseño de nuevos antimicrobianos (Figura 2).

Más recientemente, hemos incorporado a esta línea de trabajo el uso de bacteriófagos y de sus enzimas líticas (endolisinas y peptidoglicano hidrolasas) como nuevos agentes de biocontrol en la cadena alimentaria. Disponemos de una colección de bacteriófagos que infectan a distintas cepas de *S. aureus* aisladas del ambiente lácteo (Figura 3). La especificidad de los bacteriófagos permite destruir selectivamente bacterias patógenas o

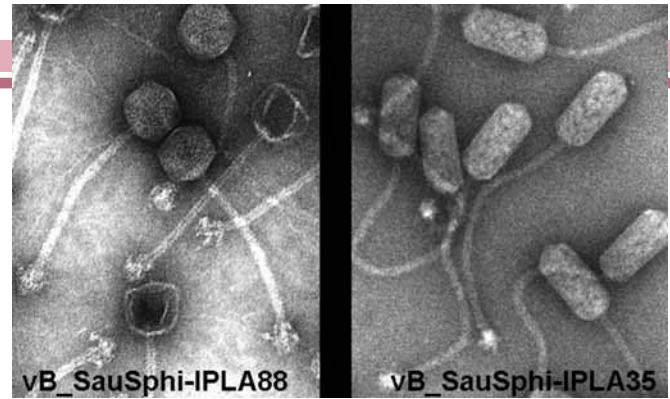


Fig. 3. Bacteriófagos que infectan *Staphylococcus aureus* de origen lácteo.

alterantes sin afectar a la microbiota endógena de un determinado hábitat. De este modo, hemos sido pioneros en el control de *S. aureus* en leche y queso con bacteriófagos y sus enzimas líticas así como su uso combinado con bacteriocinas.

A lo largo de su trayectoria, este grupo ha mantenido numerosas colaboraciones con distintos investigadores españoles entre las que tiene un papel destacado el Profesor Juan Evaristo Suárez Fernández (Área de Microbiología, Universidad de Oviedo), cuyo grupo de investigación (Bacterias del Ácido Láctico) es Unidad Asociada al CSIC a través de nuestro Instituto desde 1996. Las colaboraciones con la Dra. Covadonga Barbés Miguel (Área de Microbiología, Universidad de Oviedo), el Dr. Rufino Jiménez Díaz y el Dr. Antonio Garrido Fernández (Instituto de la Grasa, CSIC. Sevilla) han dado lugar a artículos conjuntos. Asimismo, hemos colaborado con la Dra. Eva Valdivia Martínez y el Dr. Manuel Martínez-Bueno (Departamento de Microbiología, Universidad de Granada).

La colaboración con investigadores argentinos (Dra. Font, Dra. Savoy, Dra. Pesce y Dr. Siñeriz) de los centros CERELA y PROIMI (San Miguel de Tucumán, Argentina) ha sido muy intensa en los primeros años de actividad del grupo. Desde época más reciente colaboramos con el Dr. Kuipers (Universidad de Goningen, Holanda), el Dr. Sahl (Universidad de Bonn, Alemania), el Dr. Turner y la Dra. Rute (ITQB, Oeiras, Portugal), el Dr. Donovan (ARS-USDA, Maryland, USA), el Dr. Lavigne (Universidad de Leuven, Bélgica) y el Dr. Hudson (Microbiology and Molecular Biology Christchurch Science Centre, Nueva Zelanda).

En los últimos 5 años nuestra actividad investigadora ha estado financiada por proyectos del Plan Nacional de I+D+i (MICIIN), del Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación (PCTI) del Principado de Asturias y de la UE (FP7). Hemos establecido también convenios con las administraciones públicas (Universidad de Cantabria, Mancomunidad del Oriente del Principado de Asturias) y con empresas (Quesería Artesana La Figar, Nestlé-NRC). La actividad investigadora se ha traducido en la presentación de 30 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, y en la publicación de 32 artículos SCI, 9 no SCI y 5 capítulos de libro. Asimismo, se han defendido 2 Tesis Doctorales, 2 Diplomas de Estudios Avanzados (DEA), 2 Tesinas y 3 Proyectos de Master.

Los miembros del grupo participan en Redes Temáticas (Bacterias lácticas en la salud humana y calidad alimentaria, y Genómica Bacteriana) y en actividades formativas: cursos dirigidos al sector lácteo, Programas de Doctorado y Masters en distintas Universidades (Oviedo, Pablo de Olavide-Sevilla, Autónoma de Madrid, La Rioja) y cursos de Extensión Universitaria (Universidad de Oviedo).

Finalmente, queremos destacar la experiencia en actividades I+D del grupo, al haber asumido la Presidencia del Comité Organizador del XII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM), celebrado en Oviedo en el año 2000.

ALGUNAS PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS:

- Rilla N, Martínez B, Delgado T y Rodríguez A (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *Int J Food Microbiol.* 85:23-33.
- Sánchez JI, Martínez B y Rodríguez A (2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int J Food Microbiol.* 105:377-387.
- Sánchez JI, Martínez B, Guillén R, Jiménez-Díaz R and Rodríguez A (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Appl Environ Microbiol.* 72:7495-7502.

- Martínez B, Zomer A, Rodríguez A, Kok J y Kuipers OP (2007). Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the lactococcal two component system CesSR. *Mol Microbiol.* 64:473-486.
- García P, Madera C, Martínez B y Rodríguez A (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy J.* 17:1232-1239.
- García P, Rodríguez L, Rodríguez A and Martínez B (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Sci Technol.* 21:373-382.
- Rodríguez L, Martínez B, Zhou Y, Rodríguez A, Donovan DM y García P (2011). Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiPLA88. *BMC Microbiol.* 11:138.

Desarrollo y evaluación de métodos de detección, caracterización y eliminación de microorganismos en la industria alimentaria

ainia

centro tecnológico

David Tomás, Amparo de Benito, Alejandro Rodrigo, Sonia Marco, Sonia Porta, Laura Verdú, Irene Llorca y Rafael Soro.

Ainia. Centro tecnológico. Parque Tecnológico de Valencia.
C/Benjamin Franklin 5-11 46980 Paterna (Valencia)

www.ainia.es

El grupo de microbiología de alimentos de ainia cuenta con más de 25 técnicos e investigadores procedentes de diferentes disciplinas académicas y que trabajan en un amplio rango de tecnologías, que implican desde las técnicas analíticas propias de laboratorio hasta aspectos relacionados con la ingeniería de procesos o equipamiento e higiene industrial.

En este sentido y con el principal objetivo de contribuir a la innovación y desarrollo tecnológico de las industrias alimentarias, se trabajan en diferentes líneas de una forma multidisciplinar, entre las que podemos destacar:

- Desarrollo de métodos rápidos para detección de microorganismos de riesgo.
- Estudios de conservación y modelización de técnicas de inactivación de microorganismos.
- Higiene y diseño higiénico en la industria alimentaria. Evaluación de biofilms.
- Normalización y validación de métodos analíticos convencionales y alternativos.

El grupo cuenta con el reconocimiento como Agente Investigador en riesgos biológicos en la Plataforma de Investigación de Seguridad Alimentaria (PISA N°-23) de la D. G. de Salud Pública de la Generalitat Valenciana, así como participa en el Grupo de Seguridad Alimentaria de la Plataforma Food for Life Spain.

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

La detección y caracterización rápida y automatizada de microorganismos de interés en la industria alimentaria

suponen una herramienta clave para garantizar la seguridad de los mismos, reducir costes y conocer en mayor profundidad los microorganismos implicados en los procesos de producción de alimentos.

Las principales tecnologías que se emplean para esta aplicación son técnicas moleculares basadas tanto en PCR convencional, como en PCR a Tiempo Real PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) y DGGE (Denaturalization Gradient Gel Electrophoresis) para la detección y caracterización de bacterias, virus entéricos y hongos. También se han puesto a punto técnicas de Rep-PCR, habiendo tipificado más de 500 cepas de *Salmonella* de más de 180 serotipos diferentes así como la tipificación de levaduras implicadas en el proceso de fermentación de la aceituna.

Así mismo cuenta entre sus infraestructuras con un laboratorio de contención biológica de nivel P-3.

ESTUDIOS DE CONSERVACIÓN Y MODELIZACIÓN DE TÉCNICAS DE INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS

El aseguramiento de la calidad microbiológica de los alimentos, depende en muchos casos de la aplicación de tratamientos de inactivación de microorganismos, que pueden darse tanto en el alimento como en los envases que los contienen.

Los tratamientos que comúnmente se aplican en la industria, tienen diversas limitaciones, por lo que se han desarrollado estudios para evaluar diferentes tecnologías convencionales (tratamientos térmicos, aditivos...) así como soluciones alternativas (ozono, UV pulsado, CO₂ supercrítico, envases activos, extractos naturales...) y tratamientos combinados de las mis-