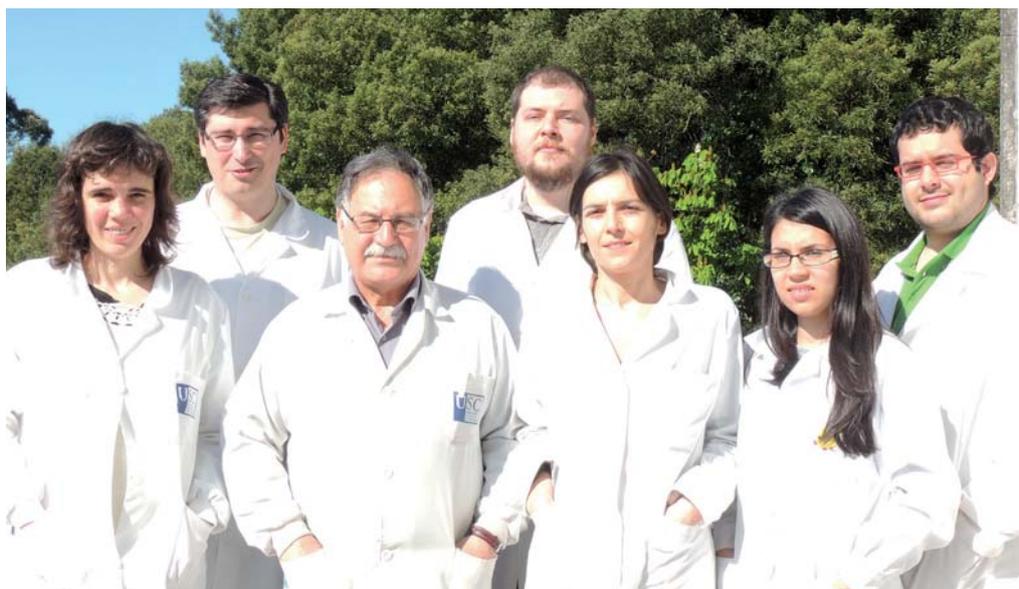


Biotecnología Microbiana y Alimentaria

Tomás G. Villa, Pilar Calo Mata y Jorge Barros Velázquez

tomas.gonzalez@usc.es
p.calo.mata@usc.es
jorge.barros@usc.es

Facultad de Farmacia/Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela



Sección de Santiago



Sección de Lugo

Nuestro grupo comenzó su andadura hace más de 30 años. El grupo de investigación posee amplia experiencia en clonación y explotación de genes con potencial indus-

trial en los ámbitos farmacéutico, ingeniería de procesos y tecnología de alimentos. En sus investigaciones destacan los trabajos en genética de levaduras y hongos filamentosos

mediante estrategias alternativas a la ingeniería genética, basándose en conocimientos de genética clásica de microorganismos eucariotas. Por otra parte hemos contribuido el desa-

rollo de técnicas moleculares de detección e identificación directas de microorganismos patógenos en alimentos, especialmente en el ámbito de los métodos miniaturizados y la proteómica. Finalmente, hemos prestado atención a los métodos de lucha contra los microorganismos patógenos de mayor relevancia en el ámbito alimentario, destacando componentes naturales, extractos de algas, bacteriocinas o enzimáticos.

Dentro de este gran ámbito que representa la aplicación de herramientas biotecnológicas a la industria alimentaria, en los últimos cinco años hemos desarrollado específicamente las siguientes grandes líneas:

1. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE COMPONENTES DE VALOR AÑADIDO PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

En el grupo de investigación se ha trabajado con las poligalacturonasas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Medicago sativa*. Se han caracterizado, clonado y expresado en diferentes organismos tales como *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y *Arabidopsis thaliana*. Como resultado de esta experiencia se han aislado y conseguido cepas superproductoras de poligalacturonasa, tanto de modo natural como recombinante, susceptibles de aplicación industrial con excelentes resultados. También se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de genes de *S. cerevisiae* implicados en la formación de espuma en el vino con la finalidad de clonarlos en levaduras cerveceras, *Saccharomyces carlsbergensis*, para aumentar la cantidad y calidad de la espuma obtenida en la cerveza.

Se ha prestado asimismo especial atención a la selección de genes responsables de la biosíntesis de beta-caroteno, licopeno o xantofilinas y su expresión heteróloga en *P. pastoris*. Componentes todos ellos de gran valor añadido en la biotecnología alimentaria. Asimismo se ha abordado el estudio de quimosinas de grado alimentario y recombinantes para la producción quesera.

En un próximo futuro se pretende generar nuevas cepas productoras de estos compuestos de uso industrial. Actualmente se

está trabajando en la mejora de las cepas recombinantes de la levadura *Pichia pastoris* incrementando la dosis génica para aumentar la producción de astaxantina, licopeno y β -caroteno. De igual manera se está procediendo a terminar el adaptado de cepas de la misma levadura para la producción de una nueva proteasa aspártica de origen vegetal, para la elaboración de quesos tradicionales. Las cepas productoras de espuma y poligalacturonasa de uso alimentario están siendo escaladas para uso industrial.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

- Araya-Garay J, Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2012). Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls. *AMB Express* 2:24.
- Vallejo JA, Ageitos JM, Poza M y Villa TG.** (2012). A comparative analysis of recombinant chymosins. *J Dairy Sci* 95: 609-613.
- Araya-Garay JM, Feijoo-Siota L, Rosa-dos-Santos F, Veiga-Crespo P y Villa TG.** (2012). Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopene and β -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2483-2492.
- Blasco L, Veiga-Crespo P, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2012). Cloning and Characterization of the Beer Foaming Gene CFG1 from *Saccharomyces pastorianus*. *J Agric Food Chem* 60: 10796-10807.
- Ageitos JM, Vallejo JA, Serrat M, Sánchez-Pérez Á, Villa TG.** (2013). In Vitro Ca²⁺-Dependent Maturation of Milk-Clotting Recombinant Epr: Minor Extracellular Protease: From *Bacillus licheniformis*. *Mol Biotechnol* 54: 304-311.
- Vallejo JA, Serrat M, Pérez-Portuondo I, Sánchez-Pérez A, Ageitos JM y Villa TG.** (2012). A novel *Kluyveromyces marxianus* strain with an inducible flocculation phenotype. *AMB Express* 1: 38. doi:10.1186/2191-0855-2-38.
- Vallejo JA, Sánchez-Pérez A, Martínez JP y Villa TG.** (2013). Cell aggregations in yeasts and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 2305-2318.
- Vallejo JA, Miranda P, Flores-Félix JD, et al.** (2013). Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Syst Appl Microbiol* 36(8): 560-564.
- Seiro C, Villa TG, da Silva AF, García-Fraga B y Vilanova M.** (2014). Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chem* 145: 179-185.
- Feijoo-Siota L, Blasco L, Rodríguez-Rama JL, De Miguel T, Barros-Velázquez J, Sánchez-Pérez A y Villa TG.** (2014). Recent advances in microbial proteases for the dairy industry. *Recent Adv DNA and Gene Seq* 8: 44-45.

2. DESARROLLO DE MICROARRAYS Y BIOMARCADORES DE HUELLA PEPTÍDICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

En el ámbito de la proteómica, hemos tenido la oportunidad de colaborar desde el principio de nuestra existencia como grupo, con los equipos dirigidos por el Prof. José M. Gallardo en el IIM-CSIC y por el Prof. Benito Cañas en la UCM. En el ámbito de la tecnología de microarrays basados en la detección de la reacción de ligación, venimos colaborando desde hace varios años con el grupo dirigido por la Dra. Bianca Castiglioni en el IBBA-CNR (Milán, Italia) y con el Dr Stefano Morandi del grupo dirigido actualmente por la Dra Milena Brasca en el ISPA-CNR (Milán, Italia). Fruto de esta actividad ha sido la creación de una base de datos de acceso libre, Spectrabank (www.spectrabank.org o www.spectrabank.eu), que permite acceder a los perfiles MALDI-TOF de las principales especies microbianas de interés alimentaria, a sus listas de masas, etc. Dicha base de datos ha sido realizada en colaboración con la USC y el Centro de Supercomputación de Galicia, gracias a sendos proyectos financiados por el MEC y la Xunta de Galicia y representa actualmente la WEB de acceso libre más completa a nivel internacional en el ámbito de la identificación microbiana mediante MALDI-TOF.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

- Fernández-No IC, Böhme K, Calo-Mata P, Cañas B, Gallardo JM y Barros-Velázquez J.** (2012). Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaged refrigerated seafood products. *Food Microbiol* 30: 91-97.
- Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B y Calo-Mata P.** (2012). SPECTRABANK: an open access tool for microorganism identification by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33: 2138-2142.
- Böhme K, Morandi S, Cremonesi P, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33: 2355-2364.
- Fernández-No I, Böhme K, Díaz-Bao M, Cepeda A, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P.** (2013). Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiol* 33: 235-242.

Böhme K, Fernández-No I, Pazos M, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B y Calo-Mata P. (2013). Identification and classification of sea-food-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing vs MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis* 334: 877-887.

Böhme K, Fernández-No I, Pazos M, Gallardo JM, Barros-Velázquez J, Cañas B y Calo-Mata P. (2013). Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 34: 2240-2250.

Böhme K, Cremonesi P, Severgnini M, Villa TG, Fernández-No I, Barros-Velázquez J, Castiglioni B y Calo-Mata P. (2014). Detection of spoilage and pathogenic bacteria based on ligation detection reaction coupled to flow-through hybridization on membranes. *Biomed Research Int.* 2014 (DOI: 10.1155/2014/156323).

Fernández-No I, Böhme K, Caamaño-Antelo S, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P. (2015). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 16S rRNA gene of foodborne *Bacillus* spp. *Food Microbiol* 46: 239-245.

Caamaño-Antelo S, Fernández-No I, Böhme K, Azat-Alnakip M, Quintela-Baluja M, Barros-Velázquez J y Calo-Mata P. (2015). Genetic discrimination of pathogenic and spoilage *Bacillus* spp based on three housekeeping genes. *Food Microbiol* 46: 288-298.

Calo-Mata P, Carrera M, Böhme K, Caamaño-Antelo S, Gallardo JM, Barros-Velázquez J y Cañas B. (2015). Novel Peptide Biomarker Discovery for Detection and Identification of Bacterial Pathogens by LC-ESI-MS/MS. *J Anal Bioanal Technol* 7(1): 296. (doi:10.4172/2155-9872.1000296).

3. DESARROLLO DE MÉTODOS NATURALES DE LUCHA CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE RELEVANCIA EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO.

El uso abusivo de antibióticos convencionales ha provocado la aparición de microorganismos resistentes a un amplio espectro de estos fármacos, por lo que la efectividad de terapias antibacterianas se ha visto mermada.

Por esta razón se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes.

Dentro de estos posibles agentes terapéuticos se encuentran los enzibióticos, enzimas líticas que emplean los virus bacteriófagos en algún momento durante su ciclo lítico. Si el concepto de enzibiótico se extiende a aquellos enzimas capaces de actuar sobre las paredes fúngicas como las actividades glucanásicas y las quitinasas producidas por hongos como *Trichoderma harzianum* o la bacteria *Bacillus circulans*, la batería terapéutica se amplía enormemente. Este grupo de investigación, ha estado trabajando en la aplicación para el tratamiento de enfermedades fúngicas de las enzimas endoglucanasa.

Esta línea de investigación ha incluido asimismo el aislamiento de microbiota ácido láctica productora de compuestos antimicrobianos, fundamentalmente bacteriocinas. Se ha descrito el aislamiento de cepas de enterococos multiproductoras de diversas enterocinas con actividad frente a patógenos humanos y de peces y que actualmente se están evaluando como ingredientes de piensos en la industria acuícola. Asimismo se ha abordado el desarrollo de bacteriocinas híbridas, por colaboración del equipo del Prof. Augusto Bellomio (Conyset, Argentina).

Las perspectivas futuras incluyen no solo la profundización en el estudio de enzibióticos y de nuevas bacterias productoras de bacteriocinas, sino también en otras fuentes de origen natural, como extractos de algas marinas, dotadas de actividad antimicrobiana.

Bibliografía seleccionada (diez publicaciones de los últimos cinco años)

Fusté E, Galisteo GJ, Jover L, Vinuesa T, Villa TG y Viñas M. (2012). Comparison of antibiotic susceptibility of old and current *Serratia*. *Future Microbiol* 7(6): 781-786.

Chahad OB, El Bour M, Calo-Mata P, Boudabous A y Barros-Velázquez J. (2012). Discovery of novel preservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their applications in seafood products. *Res Microbiol* 163: 44-54.

Chahad Bourouni O, Elbour M, Calo-Mata P, Mraouana R, Abedellatif B y Barros-Velázquez J. (2012). Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Can J Microbiol* 58: 463-474.

Veiga-Crespo P, Sanchez-Perez A y Villa TG. (2014). Enzybiotics: The Rush Toward Prevention and Control of Multiresistant Bacteria (MRB). In: *Antimicrobial Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 215-235.

Villa TG, Veiga-Crespo P, eds. (2014) *Antimicrobial Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-40444-3.

Acuña L, Corbalán N, Fernández-No I, Morero R, Barros-Velázquez J y Bellomio A. (2015). Inhibitory effect of the hybrid bacteriocin Ent35/MCCV on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in model and food systems. *Food Bioprocess Technol* 8: 1063-1075.

El-Jeni R, Elbour M, Calo-Mata P, Böhme K, Fernández-No I, Barros-Velázquez J y Bouhaouala-Zahar B. (2016). In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* lactic acid bacteria strains from Tunisian freshwater fish. *Can J Microbiol* 62: 60-71.

Villa TG, Feijoo-Siota L, Rama JLR, Sánchez-Pérez A y de Miguel-Bouzas T. (2016). Enzybiotics In: *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier: 491-502. doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00040-1.

Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P y Villa TG. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.018.

Miranda JM, Ortiz J, Barros-Velázquez J y Aubourg S. (2016). Quality enhancement of chilled fish by including alga *Bifurcaria bifurcata* extract in the icing medium. *Food Bioprocess Technol* 9: 387-395.