

## Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales

Baltasar Mayo, Ana Belén Flórez, Lucía Guadamuro, Lucía Vázquez e Irene Ordóñez



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



De izquierda a derecha, Lucía Vázquez (FPI), Irene Ordóñez (Técnico), Lucía Guadamuro (FPI), Baltasar Mayo (IP), Marta Bednarek (Invitada) y Ana Belén Flórez (Posdoctoral).

### PRESENTACIÓN

La formación seminal del grupo de “**Cultivos Lácteos Funcionales**” se inicia alrededor del año 1996. La actividad investigadora del grupo CLF se reparte entre las tres líneas de investigación prioritarias del IPLA-CSIC: (i) calidad, (ii) seguridad de productos lácteos y (iii) productos lácteos y salud. El grueso de nuestras labores está enmarcado en la línea de “calidad de productos lácteos” sublínea de “tecnología de productos lácteos”. El grupo de CLF trabaja en dos objetivos de investigación unidos por una metodología similar y una misma finalidad: “la identificación, selección y caracterización de microorganismos de interés tecnológico para su empleo en las fermentaciones lácteas”. Uno de los objetivos aborda la caracterización microbiológica y bioquímica de quesos tradicionales para la selección de fermentos, cultivos adjuntos y de maduración (Fig. 1). En un segundo objetivo se ha llevado a

cabo la caracterización microbiana de secciones del tracto gastrointestinal humano (Fig. 2) con el fin de identificar y seleccionar cepas que puedan utilizarse como probióticos más robustos y/o más específicos que los comerciales que se emplean en la actualidad. El estudio de estos nichos ecológicos tan diferentes es, sin embargo, similar e incluye la utilización de técnicas básicas de microbiología de cultivo<sup>1,2,3</sup> y técnicas novedosas de microbiología cultivo-independiente (como DGGE<sup>4</sup>, PCR cuantitativa a tiempo real, FISH, construcción y análisis de librerías génicas, metagenómica<sup>5</sup>, etc.).

### LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

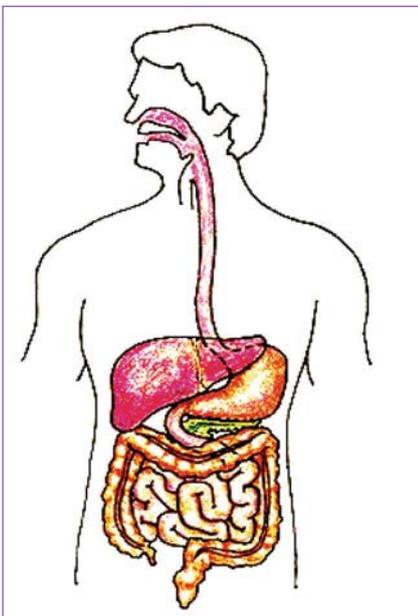
#### 1. Tipificación microbiana de quesos tradicionales y diseño de fermentos

Es la línea más tradicional del grupo. A lo largo de los años hemos participado en la

caracterización y tipificación microbiana de diversos quesos tradicionales de Asturias, incluyendo los de Peñamellera<sup>1</sup>, Cabrales<sup>2,4</sup> y Casín<sup>3</sup> (Fig. 1). El queso de Cabrales, con DOP desde el año 1981, es uno de los quesos españoles más famosos y el producto estrella de los quesos tradicionales asturianos. El queso Casín es una de las joyas gastronómicas del Principado de Asturias y uno de los quesos tradicionales españoles más original, debido al amasado semanal de la pasta, lo que le confiere un sabor fuerte y picante al queso maduro. Cuenta también desde 2008 con la marca DOP. Por su parte, el queso de Peñamellera es uno de los quesos asturianos responsables del resurgir de los quesos tradicionales. Con una producción residual en los años 90 del siglo pasado, es en la actualidad por volumen de producción uno de los más apreciados quesos artesanos de Asturias. Además, hemos colaborado también en la tipificación microbiana de quesos extranjeros,



**Figura 1.** Quesos tradicionales asturianos. Izquierda a derecha: Peñamellera, Cabrales y Casín.



**Figura 2.** Representación esquemática de las secciones del tracto gastrointestinal humano.

como los quesos iraníes Livghan y Kooshe, el queso polaco Oscypek<sup>5</sup> y otros productos lácteos como yogur y kéfir. El objetivo es seleccionar cepas con buenas propiedades y aptitudes tecnológicas para el diseño de fermentos específicos para todos estos quesos y útiles para la industria láctea en general.

Para el queso de Cabrales desarrollamos un fermento específico (CAB-00) (Fig. 3) tras un exhaustivo estudio de este queso a lo largo de la elaboración y maduración

y la caracterización (bioquímica, genética, tecnológica y de seguridad) de numerosos aislados<sup>6,7</sup>. El fermento CAB-00 incluye cepas de la especie *Lactococcus lactis* de las subespecies *lactis* y *cremoris*. Las cepas de la mezcla se han transferido a Biogés Starters SA, empresa que produce el fermento en exclusiva para el Consejo Regulador del Cabrales. Los elaboradores de Cabrales lo vienen utilizando desde hace más de tres años con muy buenos resultados sensoriales y sin haber reportado accidentes tecnoló-

gicos reseñables. También seleccionamos cepas de *Penicillium roqueforti* con buenas propiedades, pero no hemos encontrado empresa capaz de producir esporas de forma competitiva para los artesanos. Además, cepas de varios de estos quesos (de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*) se han transferido también a diversas empresas e industrias del sector.

En el futuro estamos interesados en aplicar las modernas técnicas moleculares de Eco-

<p><b>CAB 00 10/250</b>                  Fermento láctico concentrado y liofilizado                  Ingredientes: Cultivo microbiano de <i>Lactococcus lactis</i> y leche en polvo.</p>	<p><b>Cantidad neta: 10 g para 250 L de leche</b>                  Conservar congelado (-20°C)                  Modo de empleo: Diluir con leche a temperatura y añadir a la cuba de cuajado.</p>
<p><b>Lote: CAB 00 140610</b></p>	
<p>Fermento autóctono para queso cabrales comercializado bajo licencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España)                  Contiene lactosa. Antes de usar ver ficha técnica.</p>	<p>Usar preferentemente antes del fin de : 12/2011                  Fabricado por: Bio-Ges Starters, S.A. Avda. Portugal, 41 24071 León (ESPAÑA)                  Tfno.: 987 291813 Fax: 987 291947                  CIF: A-24469249                  RGSA: 31.02073/LE</p>

**Figura 3.** Etiqueta comercial del fermento específico diseñado para el queso de Cabrales compuesto de cepas autóctonas de *Lactococcus lactis*.

logía Microbiana (metagenómica, proteómica, transcriptómica) al estudio de los quesos tradicionales. Con estas técnicas esperamos obtener nuevos conocimientos sobre las fermentaciones lácteas con los que esperamos contribuir a mejorar la calidad integral de los productos.

## 2. Microbiología del tracto gastrointestinal humano y selección de probióticos

En el año 2000 iniciamos una nueva línea centrada en la microbiología gastrointestinal humana y dirigida a la identificación de bifidobacterias y lactobacilos con propiedades beneficiosas para la formulación de probióticos. El tracto gastrointestinal humano (Fig. 2) presenta en todos sus segmentos una gran diversidad microbiana con grandes diferencias interindividuales<sup>8,9</sup>. Tanto del intestino como del estómago se recuperaron numerosas cepas con propiedades deseables que se han propuesto como potenciales candidatas a probióticos. Procedente del estómago, por ejemplo, hemos encontrado una cepa de *Lactobacillus reuteri* (CECT 8395) capaz de inhibir al patógeno *Helicobacter pylori*<sup>10</sup> (Fig. 4). La utilización de dicha cepa para paliar patologías intestinales se ha protegido mediante una patente (P201331271- PCT/ES2014/070666). Dentro de esta línea, en la actualidad es-

tamos estudiando la modulación de las poblaciones intestinales por las isoflavonas de la soja y caracterizando cepas activadoras de isoflavonas (que liberan las agliconas) y cepas productoras de equol (compuesto derivado de las isoflavonas con mayor actividad estrogénica)<sup>11,12</sup>.

Como resultado de nuestros trabajos disponemos de una gran colección de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias de origen gastrointestinal humano que constituyen la base de muchos estudios posteriores tanto de nuestro grupo como de otros grupos del IPLA. Entre las cepas que presentan un interés más aplicado, disponemos de tres cepas de lactobacilos capaces de crecer en leche de soja y liberar las isoflavonas de sus respectivos glicósidos, actividad que se ha protegido bajo patente (P2012/30152-PCT/ES2013/070047). Otras cepas de interés industrial se han transferido a empresas biotecnológicas.

## 3. Caracterización funcional de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias.

La identificación y caracterización de bacterias ácido-lácticas y bifidobacterias para su utilización como fermentos o probióticos implica el estudio de diversos aspectos de su fisiología y genética. Es particularmente relevante el estudio de sus plásmidos<sup>13,14</sup>,

en los que codifican propiedades esenciales que pueden perderse y por la utilidad que tienen para el desarrollo de vectores y otras herramientas genéticas. Así, hemos contribuido a caracterizar plásmidos de cepas de los grupos estudiados con los que se han desarrollado vectores de clonación y expresión que permiten abordar la manipulación de las bacterias de estos grupos. En particular ha resultado muy exitoso el vector pAM1<sup>13</sup> (Fig. 5), bifuncional en bifidobacterias y *Escherichia coli*. El vector se halla depositado en la Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM; referencia LMBP-8058). Estamos interesados igualmente en el estudio de la resistencia a antibióticos en bacterias lácticas y bifidobacterias (Fig. 6) con el objetivo de no extender la resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria, así como en la caracterización de los genes codificadores<sup>15,16</sup> y en su cuantificación en productos lácteos. Este es, sin duda, uno de los temas que nos ha dado mayor visibilidad internacional. Finalmente, la caracterización de las cepas en estudio incluye en ocasiones la secuenciación y el análisis genómico completo para evaluar las propiedades de seguridad de las mismas y sus potencialidades bioquímicas y tecnológicas<sup>16,17</sup>. Ocasionalmente, empleamos también técnicas de ingeniería genética, incluyendo clonación, expresión de genes homólogos y heterólogos, disrupción génica y otras.

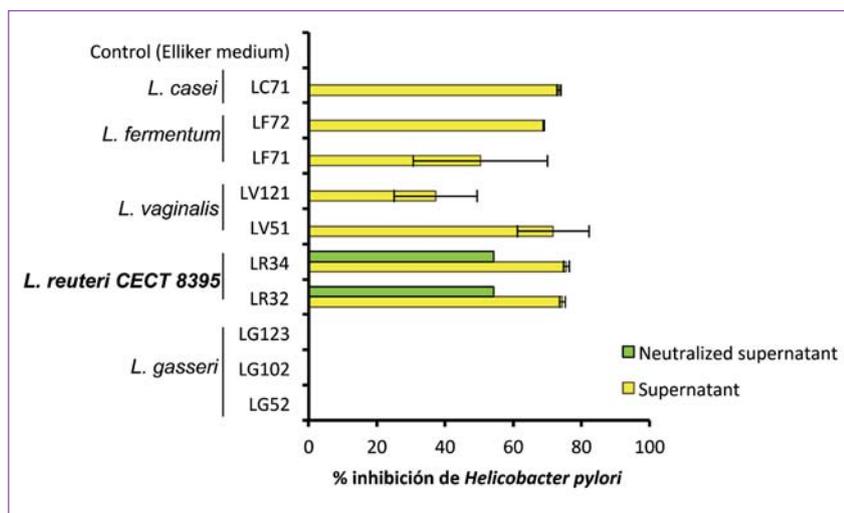


Figura 4. Inhibición de *H. pylori* por cepas de lactobacilos aislados del estómago humano. Destacada en negrita, *Lactobacillus reuteri* CECT 8395.

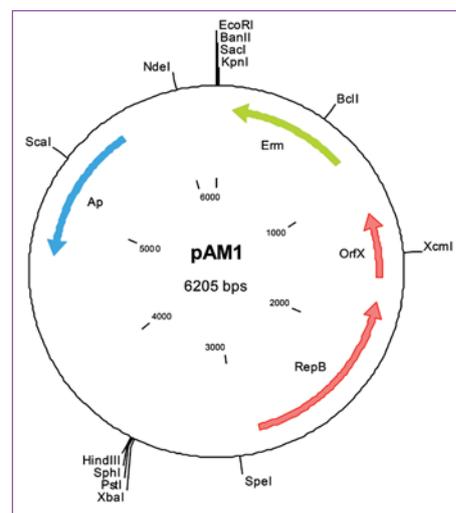
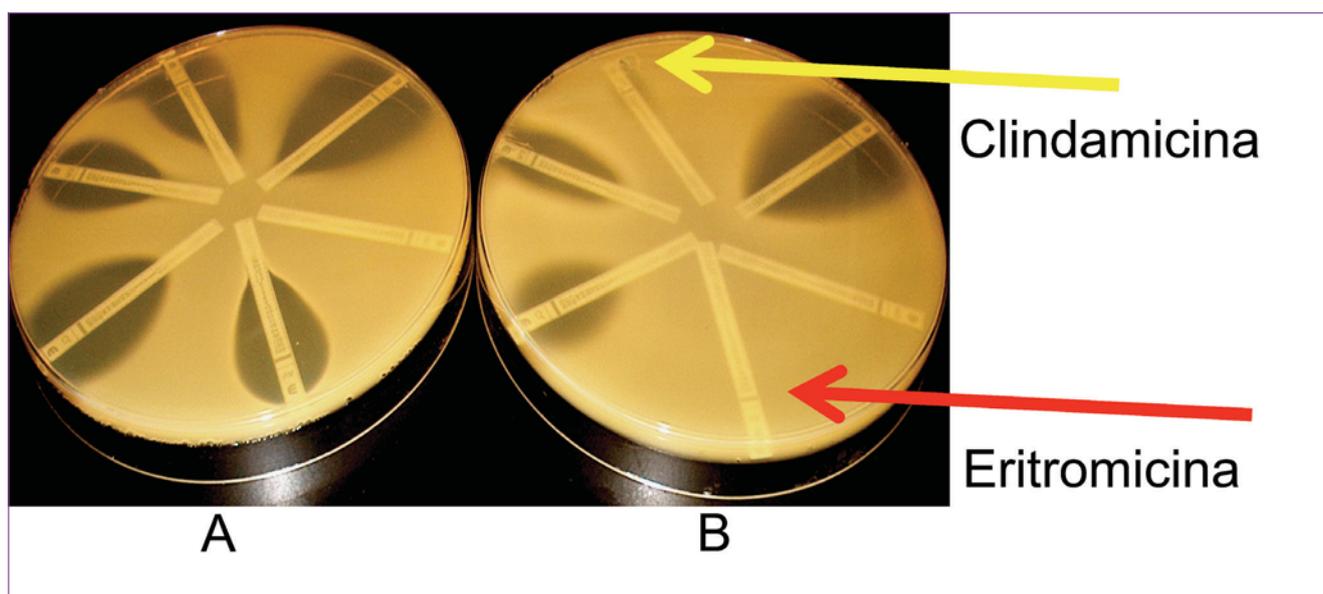


Figura 5. Organización genética de pAM1, vector bifuncional *Escherichia coli*-bifidobacterias.



**Figura 6.**

Cepa resistente a eritromicina y clindamicina (placa B) y comparación con una cepa sensible a los dos antibióticos de la misma especie (placa A).

## PUBLICACIONES RELEVANTES DEL GRUPO

1. 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: 737-46.
2. Flórez AB, Álvarez-Martín P, López-Díaz TM y Mayo B. (2006). Microbiological characterisation of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *Eur Food Res Technol* 223: 503-8.
3. Alegria 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.
4. 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* 110:165-71.
5. Alegria A, Szczesny P, Mayo B, Bardowski J y Kowalczyk M. (2012). Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Appl Environ Microbiol* 78: 1890-8.
6. 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: 309-19.
7. Fernández E, Alegria 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: 5324-35.
8. Delgado S, Suárez A y Mayo B. (2006). Bifidobacterial diversity determined by culturing and by 16S rDNA sequence analysis in feces and mucosa from ten healthy Spanish adults. *Dig Dis Sci* 51: 1878-85.
9. Delgado S, Cabrera R, Mira A, Suárez A y Mayo B. (2013). Microbiological survey of the human gastric ecosystem by culturing and pyrosequencing approaches. *Microb Ecol* 65: 763-72.
10. Delgado S, Leite AMO, Ruas-Madiedo P y Mayo B. (2015). Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front Microbiol* 5: 766.
11. Guadamuro L, Delgado S, Redruello B, Suárez A, Martínez-Cambor P, Flórez AB y Mayo B. (2015). Equol status and changes in faecal microbiota in postmenopausal women receiving long-term treatment for menopause symptoms with a soy-isoflavone concentrate. *Front Microbiol* 6: 777.
12. Guadamuro L, Jiménez-Girón A, Delgado S, Flórez AB, Martín-Álvarez PJ, Suárez A, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV y Mayo B. (2016). Profiling of phenolic metabolites in faeces from equol-producing and non-producing menopausal women after long-term isoflavone supplementation. *J Agric Food Chem* 64: 210-6.
13. 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: 4656-65.
14. Flórez AB y Mayo B. (2015). The plasmid complement of the cheese isolate *Lactococcus garvieae* IPLA 31405 revealed adaptation to the dairy environment. *PLoS One* 10: e0126101.
15. Flórez AB, Ammor MS, Álvarez-Martín P, Margolles A y Mayo B. (2006). Molecular analysis of *tet(W)* gene-mediated tetracycline resistance in dominant intestinal *Bifidobacterium* species from healthy humans. *Appl Environ Microbiol* 72:7377-9.
16. Flórez AB, Campedelli I, Delgado S, Alegria A, Salvetti E, Felis GE, Mayo B y Torriani S. (2016). Antibiotic susceptibility profiles of dairy *Leuconostoc*, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. *PLoS One* 11: e0145203.
17. Alegria A, Delgado S, Guadamuro L, Flórez AB, Felis GE, Torriani S y Mayo B. (2014). The genome of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* IPLA 36007, a human intestinal strain with isoflavone-activation activity. *Gut Pathogens* 6: 31.