



Foto 2. *Bifidobacterium longum* sobre cristales de bilis (A, barra 20 mm) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B, barra 5 mm) visualizados mediante cryo-SEM.



Foto 3. Dr. Probiota, ¿quién estudia a quién? (María Fernández y Toni Colom).

Turróni *et al.* (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc Nat Acad Sci USA*. 107:19514-19519.

Arbolea *et al.* (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol*. 149:28-36.

De los Reyes-Gavilán *et al.* (2011). Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol*. 162:514-519.

López *et al.* (2011). Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains support Treg/Th17 plasticity. *PLoS One* 6(9):e24776.

Ruiz *et al.* (2011). Evaluation of the ability of *Bifidobacterium longum* to metabolize human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*. 314: 125-130.

Salazar *et al.* (2011). Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA-R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA-E44 orally administered to Wistar rats. *Int J Food Microbiol*. 144:342-351.

Evaluación y control de microorganismos toxigénicos en productos cárnicos madurados

Miguel Ángel Asensio

Higiene y Seguridad Alimentaria. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Apto 643. 10003-Cáceres

Los productos cárnicos de larga maduración se mantienen en refrigeración hasta que se logra una reducción de la humedad que impide el desarrollo de la microbiota alterante y de las bacterias toxigénicas. A medida que disminuye la humedad del producto va limitándose el desarrollo de las bacterias, mientras que la población fúngica puede desarrollarse a lo largo de todo el procesado durante meses. Los primeros estudios del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria demostraron la presencia de mohos productores de toxinas en el jamón. Paralelamente se estudió la posible contribución de los microorganismos a la maduración del jamón, concluyéndose que tanto las micrococáceas como las levaduras y los mohos poseen una alta actividad proteolítica sobre proteínas miofibrilares y se demostró la

contribución de *P. chrysogenum* y *Debaryomyces hansenii* tanto a la proteólisis como a la formación de compuestos volátiles en lomos y jamones madurados (Martín y col., 2006; Benito y col., 2005; Andrade y col., 2009a).

Uno de los principales problemas que plantea el control de los microorganismos toxigénicos en el jamón curado radica en la presencia de una gran diversidad de especies que incluyen cepas productoras y no productoras de toxinas, junto a la dificultad de demostrar la producción de las toxinas dado el papel decisivo que desempeñan las condiciones ambientales en la producción de estos metabolitos secundarios. La actividad reciente del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria se ha centrado en controlar el desarrollo de microorganismos inde-



Componentes del Grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria en la Universidad de Extremadura en la actualidad.

seables en los productos cárnicos madurados, asegurando la presencia de los microorganismos que contribuyen a las características deseables. Se han desarrollado tres objetivos: a) la diferenciación de levaduras de productos cárnicos madurados mediante técnicas de ácidos nucleicos para seleccionar cepas como cultivos iniciadores, b) la selección de mohos y levaduras capaces de inhibir a los mohos toxigénicos para utilizarlos como cultivos protectores y c) el desarrollo de métodos basados en el estudio de ácidos nucleicos para determinar el potencial toxigénico de los mohos.

Para la diferenciación de las cepas de levaduras se han evaluado distintos métodos de tipificación del DNA. El análisis mediante RFLP de los ITS del rDNA del 5.8S y del 18S no permitió diferenciar las levaduras a nivel de especie, mientras que el análisis mediante RFLP del ADN mitocondrial en combinación con el análisis mediante RAPD con los cebadores para microsatélites (GTG)₅, (GAC)₅ y especialmente con (GACA)₄, permitieron la diferenciación tanto a nivel de especie como de cepas implicadas en el desarrollo del sabor (Andrade y col., 2006; 2009b).

Respecto a la selección de hongos con actividad antifúngica, se han seleccionado cepas de *P. chrysogenum* productores de proteínas antifúngicas (Acosta y col., 2009), habiéndose caracterizado una nueva proteína catiónica de bajo peso molecular (Rodríguez-Martín y col., 2010a) y una quitosanasa (Rodríguez-Martín y col., 2010b) que pueden ser de utilidad para evitar el desarrollo fúngico. Actualmente se trabaja en la detección de proteínas con actividad antifúngica en las levaduras presentes en el jamón curado.

Para detectar mohos toxigénicos entre una gran diversidad de mohos que incluyen cepas no toxigénicas se han desarrollado métodos basados en el estudio de ácidos nucleicos, inicialmente mediante sondas de DNA (Aranda y col., 2002) y RAPD (Martín y col., 2004). Los primeros estudios no ofrecían resultados plenamente satisfactorios, por lo que se desarrolló un método de extracción utilizando proteinasa K y liticasa seguido por una extracción con un sistema semiautomático a vacío que permitió la obtención de ADN fúngico de alta calidad (Sánchez y col. 2008). Posteriormente se han desarrollado otros procedimientos de extracción de ADN fúngico específicos para mohos productores de patulina (Luque y col., 2011a) y de Ocratoxina A (Rodríguez y col., 2011a) que permiten aumentar la sensibilidad de la detección mediante PCR. Por otra parte, distintas especies e incluso géneros pueden elaborar la misma micotoxina, y en una especie puede haber tanto cepas productoras como no productoras de esa toxina. Para determinar de forma específica y sensible el potencial toxigénico se han desarrollado métodos de PCR basando el diseño de los cebadores en genes implicados en la síntesis de las principales micotoxinas. Así, se han desarrollado métodos para detectar en distintas especies de *Aspergillus/Emericella* y de *Penicillium* la producción de patulina con cebadores basados en el gen de la isoeoxydon deshidrogenasa por PCR convencional (Luque y col., 2011b) y PCR en

tiempo real (qPCR) (Rodríguez y col., 2011b), así como de Ocratoxina A con cebadores basados en el gen de una péptido sintetasa no ribosómica mediante qPCR (Rodríguez y col., 2011c). También se han podido detectar los productores de Aflatoxinas en distintas especies de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium* con cebadores basados en el gen de la O-metil-transferasa mediante PCR convencional (Luque y col. 2011c) y mediante qPCR (Rodríguez y col., 2011d). Estas técnicas resultan de gran utilidad para el control de alimentos, ya que detectan o cuantifican niveles de contaminación de 1 a 100 esporas por gramo de alimento y se han validado no sólo en productos cárnicos madurados, sino también para otros alimentos en los que los mohos toxigénicos representan un problema, como cereales, frutos secos o especias. Actualmente ya se han desarrollado métodos mediante PCR múltiple que permiten la detección simultánea de mohos productores de tres micotoxinas distintas (aflatoxina, ocratoxina A y patulina) en un solo análisis, así como para la detección de verrucosidina con un control de amplificación interno, que se publicarán en breve.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta R, Rodríguez-Martín A, Martín A, Núñez F y Asensio MA (2009). Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol.* 135:39-46.
- Andrade MJ, Rodríguez M, Sánchez EM, Aranda E y Córdoba JJ (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol.* 107:48-58.
- Andrade MJ, Córdoba JJ, Sánchez B, Casado EM y Rodríguez M (2009a). Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. *Food Chem.* 113:457-463.
- Andrade MJ, Rodríguez M, Casado EM, Bermúdez E y Córdoba JJ (2009b). Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiol.* 26:578-586.
- Aranda E, Rodríguez M, Benito MJ, Asensio MA y Córdoba JJ (2002). Molecular cloning of verrucosidin-producing *Penicillium polonicum* genes by differential screening to obtain a DNA probe. *Int J Food Microbiol.* 76:55-61.
- Benito MJ, Núñez F, Córdoba Mg, Martín A y Córdoba JJ (2005). Generation of non-protein nitrogen and volatile compounds by *Penicillium chrysogenum* Pg222 activity on pork myofibrillar proteins. *Food Microbiol.* 22:513-519.
- Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez A, Rodríguez M y Córdoba JJ (2011a). Development of a Protocol for Efficient DNA Extraction of Patulin-Producing Molds from Food for Sensitive Detection by PCR. *Food Anal Methods* (en prensa).
- Luque MI, Rodríguez A, Andrade MJ, Gordillo M, Rodríguez M y Córdoba JJ (2011b). Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products. *Food Control.* 22:1831-1838.
- Luque MI, Rodríguez A, Andrade MJ, Martín A y Córdoba JJ (2011c). Development of a PCR Protocol To Detect Aflatoxigenic Molds in Food Products. *J Food Protect* (en prensa).
- Martín A, Jurado M, Rodríguez M, Núñez F y Córdoba JJ (2004). Characterization of Molds from Dry-Cured Meat Products and Their Metabo-

- lites by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA PCR. *J Food Protect.* 10:2234-2239.
- Martín A, Córdoba JJ, Aranda E, Córdoba MG y Asensio MA (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int J Food Microbiol.* 110: 8-18.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF y Córdoba JJ (2011a) A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control* (enviado).
- Rodríguez A, Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez M, Asensio MA y Córdoba JJ (2011b). Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiol.* 28:1190-1199.
- Rodríguez A, Luque MI, Justesen AF y Córdoba JJ (2011c) Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *Int J Food Microbiol.* 149:226-235.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Martín A y Córdoba JJ (2011d) Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin producing molds in foods. *Food Microbiology* (enviado).
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ y Asensio MA (2010a). Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Pep-tides.* 31:541-547.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ y Asensio MA (2010b). Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:519-528.
- Sánchez B, Rodríguez M, Casado EM, Martín A y Córdoba JJ (2008). Development of an Efficient fungal DNA extraction method to be used in Random Amplified Polymorphic DNA-PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. *J Food Protect.* 12: 2497-2503.

Actividad del Grupo de Bacterias Lácticas de Oviedo

Juan Evaristo Suárez Fernández,
en nombre de todos los integrantes, pasados y presentes, del grupo
Universidad de Oviedo

El grupo de bacterias lácticas del Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo se formó en 1992, por dos razones: a) la importancia de las fermentaciones alimentarias y especialmente las lácteas, en Asturias y b) el papel de ciertas cepas del género *Lactobacillus* en la protección frente al asentamiento de patógenos sobre las mucosas intestinal y vaginal y la posibilidad de utilizarlas como organismos probióticos, fundamentalmente como parte de alimentos funcionales. En 1996 se constituyó como Unidad Asociada al C.S.I.C a través del Instituto de Productos Lácteos de Asturias, asociación que ha sido renovada recientemente por novena vez.

Estudios preliminares mostraron que los lactobacilos mesófilos eran predominantes en muchas de las fermentaciones de vegetales y quesos llevadas a cabo en Asturias. Debido a ello, nuestro trabajo se centró inicialmente sobre cepas del género *Lactobacillus* y posteriormente se extendió a *Lactococcus*, habiéndose enfocado en la transformación de las materias primas dirigido por las BAL, en el análisis de sistemas naturales de conservación de los productos y en el estudio de los fagos responsables de alteraciones de la fermentación. De modo paralelo, hemos venido trabajando con lactobacilos aislados de vagina, centrándonos en la identificación de las especies más frecuentes, los mecanismos de reconocimiento entre las bacterias y las células epiteliales sobre las que se asientan y los sistemas de antagonismo microbiano que protegen a la mucosa de la invasión por microorganismos patógenos.

Dentro de los resultados obtenidos en estos años podríamos destacar los siguientes:

- Selección de cepas útiles en el desarrollo de iniciadores definidos para quesos artesanales. Para ello se analizaron diferentes propiedades biotecnológicas en 125 cepas de *Lactobacillus* y 600 de *Lactococcus*, aisladas a partir de fermentaciones espontáneas (Herrero *et al.*, 1996).
- Los genes de la α - y β -galactosidasa de *Lb. plantarum* han sido secuenciados y se ha estudiado su expresión (Mayo *et al.*, 1994).

- Se han identificado dos genes de estrés por frío en *Lb. plantarum* y se ha analizado su expresión (Mayo *et al.*, 1997).
- Se han caracterizado dos bacteriocinas producidas por *Lb. plantarum* y *Lc. lactis* respectivamente. La primera es un antibiótico que posee un amplio rango de cepas susceptibles y que ha sido producida en cultivo continuo para utilizarla como preservante natural de quesos. Se ha determinado su secuencia de aminoácidos, su estructura y su modo de acción: abre poros en las membranas biológicas (Turner *et al.*, 1999). La segunda es plasmídica y su gen estructural forma parte de un operón inducible formado por tres proteínas. Inhibe la formación de septos de división y es bactericida (Martínez *et al.*, 2000).
- Se han aislado fagos de *Lb. plantarum* y *Lb. casei*, habiéndose estudiado su morfología, rango de hospedador, estructura del genoma, ciclo de desarrollo, etc. Se ha determinado que la fuente principal de fagos en la industria láctea es la leche de partida, que la pasteurización actúa como agente selector principal sobre el tipo de fagos que se instalarán en la factoría y que ello determina que haya gran variabilidad entre los fagos que se convierten en endémicos (Madera *et al.*, 2004). El fago A2 (Fig. 1) de *Lb. Casei* se ha estudiado con mayor profundidad (Brüssow y Suárez, 2006). La secuenciación del genoma (García *et al.*, 2003), nos permitió conocer sus módulos funcionales. Entre ellos tenemos el conmutador genético que gobierna que el fago siga un ciclo lisogénico o lítico (García *et al.*, 1999). Utilizando el represor, se han diseñado cepas resistentes al virus que fermentan la leche en presencia del fago (Álvarez *et al.*, 1999). Igualmente se ha diseñado un sistema de cuantificación de compuestos genotóxicos muy sensible, que ha sido patentado (Soberón *et al.*, 2007). Adyacente al interruptor está el sistema de integración del genoma fágico, que se ha usado para desarrollar vectores de integración conteniendo el módulo integrasa-*attP*.