

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.

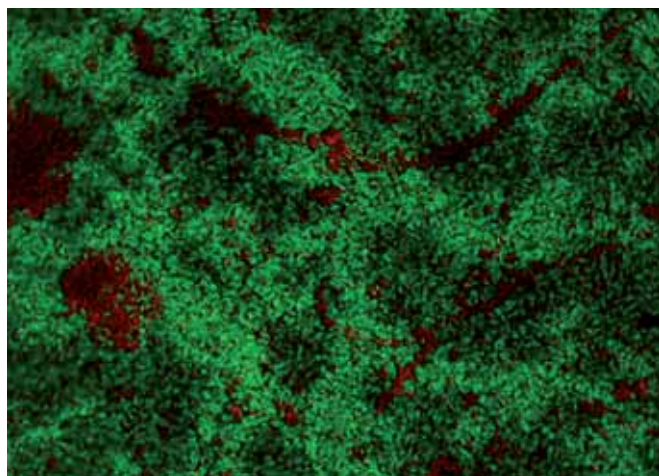
ESTUDIOS DE CONSERVACIÓN Y MODELIZACIÓN DE TÉCNICAS DE INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS

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-



Vista general del laboratorio de microbiología. Parque tecnológico. Valencia.



Biofilm de *P. aeruginosa* (63x); en verde: células viables; en rojo: células dañadas.

mas tanto sobre los alimentos (lácteos, bollería, encurtidos, especias, cárnicos...) como en material de envasado, incluyendo la realización de "challenge test" así como de modelos predictivos entre los que destaca el modelo para predecir a lo largo de la vida útil de productos cárnicos cocidos la evolución de *Listeria monocytogenes*, que se ha desarrollado a medida para una empresa de conservantes.

HIGIENE Y DISEÑO HIGIÉNICO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y EVALUACIÓN DE BIOFILMS

Uno de los elementos clave para garantizar la inocuidad de los alimentos, es la higiene industrial y el diseño higiénico de los equipos incluyendo su aptitud para ser limpiados y desinfectados con facilidad o "limpiabilidad".

En esta línea ainiá ha puesto a punto y acreditado un método internacional que consiste en someter al equipo a evaluar a un ensuciamiento controlado con leche agria y esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, limpiando posteriormente el equipo de una manera controlada y evaluando el residuo mediante el recubrimiento e incubación de las superficies del equipo con un medio de crecimiento selectivo. La validez de los resultados ha permitido que ainiá sea uno de los cinco centros en el mundo autorizados en los procesos de certificación EHEDG (European Hygienic Equipment Design Group)

Asimismo, uno de los principales problemas relacionados con la higiene industrial es la capacidad de los microorganismos de agregarse y adherirse a las superficies produciendo biofilms. Entre las líneas de investigación en este campo, se dispone de un sistema experimental con reactores de flujo continuo y régimen turbulento (CDC Reactor, *Biosurface Technologies*, USA), para desarrollar biofilms a escala de labora-

torio así como los métodos analíticos para monitorizar su formación y destrucción con técnicas de recuento de la biomasa, así como microscopía óptica, epifluorescencia y microscopía láser confocal.

Esta tecnología también se emplea para el desarrollo de técnicas rápidas y automatizadas para la detección de biofilms formados por *Listeria monocytogenes* en la industria, mediante sistemas que integran el sistema de toma de muestra en superficies con la detección del microorganismo con biosensores e iluminación láser y medida de fluorescencia.

NORMALIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE REFERENCIA Y ALTERNATIVOS

La implantación de métodos normalizados y alternativos tanto en los laboratorios de autocontrol como en los laboratorios públicos y privados son piezas clave tanto desde un punto de vista legal como económico y comercial. En éste área, ainiá desarrolla una intensa actividad, mediante la participación de sus técnicos como expertos en diferentes entidades como AENOR, CEN, ISO, ENAC y la propia SEM a través de la Comisión de Normalización y Validación.

Dentro de este campo se realiza la tarea de coordinación del Grupo Técnico de Contaminación Microbiana de AENOR (Ref. AEN/CTN 34/SC 4/GT6) y así como la representación española en el Comité Europeo de Normalización (Ref.: CEN/TC 275/WG 6) y la Organización Internacional de Normalización (Ref. ISO/TC34/SC09)

Desde el punto de vista de investigación en aspectos normativos, se lidera el proyecto para la futura norma ISO para detección de *Alicyclobacillus* en zumos (ISO/TC34/SC/09/WG12) así como se participa como expertos en la revisión y desarrollo de normas para validación de métodos microbiológicos (ISO/TC34/SC/09/WG03). En este último campo, se han realizado diversos proyectos de validación de métodos alternativos basados en diversas técnicas (impedancia, PCR, ELISA, citometría...) según la Norma ISO 16140:2003.

BIBLIOGRAFÍA

- De Benito A, Roa Y y Tomás D (2009). Desarrollo de modelos predictivos para la evaluación de un conservante frente a *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos cocidos loncheados. *Eurocarne*. 178:66-72.
- De Benito A, Padula NL, Setlow B y Setlow P (2008). Sensitization of *Bacillus subtilis* spores to dry heat and desiccation by pre-treatment with oxidizing agents. *Lett Appl Microbiol*. 46:492-497.
- Tomás D, Rodrigo A, Hernandez M, Ferrús MA (2009). Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in Chicken Feces Samples. *Food Anal Meth*. 2:180-189.
- Miñambres R, Rodrigo A, Villa-Carvajal M, García-Reverter J, Tomás D (2007). Molecular characterization and recuperation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from dry cured meat products. *J Biotechnol*. 131:51:235.