

Epidemiology and phylogeny of *Vibrio vulnificus* biotype 2

Eva Sanjuán Caro

Directora: **Carmen Amaro González**
Dto. Microbiología y Ecología. Facultad de Biológicas. Universidad de Valencia.

Vibrio vulnificus es una bacteria gram negativa, heterogénea de ambientes marinos y salobres. La especie está constituida por cepas avirulentas y virulentas para el hombre o peces que se aíslan del ambiente o de muestras clínicas. Basado en varias diferencias fenotípicas, la especie se subdivide en tres biotipos; el biotipo 1 está formado por aislados ambientales (agua, marisco...) y muestras clínicas humanas aisladas alrededor del mundo, el biotipo 2 son muestras clínicas aisladas de peces y unas pocas humanas (aislados de la serovariedad E) con una distribución mundial. Y el biotipo 3 son muestras clínicas de brotes infecciosos en humanos limitados geográficamente a Israel. No obstante, esta clasificación no refleja la verdadera situación de la especie dado que los caracteres usados para el biotipado no son válidos cuando se intenta caracterizar los nuevos aislados. El objetivo de este trabajo fue analizar la verdadera estructura de la especie así como las relaciones entre los aislados de los diferentes biotipos.

Para este propósito, primero incrementamos nuestra colección de cepas de *V. vulnificus* de los tres biotipos aislados de diferentes muestras y orígenes geográficos. Hemos centrado el trabajo en el biotipo 2 de la especie puesto que tiene gran incidencia en la anguicultura en España. Este biotipo era considerado un patógeno obligado debido a la ausencia de aislados ambientales, pero trabajos publicados por nuestro grupo demostraron que este patógeno puede sobrevivir en el agua durante largos periodos de tiempo. Nuestro primer objetivo fue, por lo tanto, el desarrollo de un protocolo específico de aislamiento de muestras ambientales del biotipo 2. Usando suero de anguila en un tampón salino fuimos capaces de aislar el biotipo 2 de diferentes muestras de agua y de anguilas sanas.

En paralelo con este estudio, realizamos una comparación genómica (Técnica SSH) entre cepas del biotipo 1 y del 2 intentando encontrar algún loci genético que se relacionase con la especificidad de hospedador. Estos análisis se realizaron en un proyecto de colaboración entre nuestro grupo y el laboratorio de la Dra. Lien-I Hor (Tainan, Taiwán). Se encontraron pocas diferencias, lo que remarca el gran parecido entre ambos biotipos. Pero, pese a esto, encontramos 3 secuencias que eran específicas del biotipo 2 y otras 3 que estaban presentes solo en las cepas de la serovariedad E. Las primeras están localizadas en un plásmido que posteriormente se ha demostrado que es esencial para la virulencia en peces. Usando algunas de estas secuencias diseñamos una PCR múltiple que permite la caracterización rápida y conjunta de la especie, del biotipo y de la serovariedad zoonótica.

Una vez incrementa la diversidad genética de nuestra colección llevamos a cabo diferentes análisis que incluían test fenotípicos, moleculares (ribotipado) y genéticos (análisis de la secuencia de genes de mantenimiento celular y de virulencia junto con el tipado genómico de varios loci) de tipado bacteriano. Estos resultados demostraron claramente la heterogeneidad de la especie. Fenotípicamente no pudimos encontrar un perfil específico que pudiera asociarse a un biotipo, serovariedad u origen de la cepa. El polimorfismo en varios genes ellos asociados con aislados de septicemia humana y el otro más ambiental.

Divisiones similares a esta se observaron con las otras técnicas usadas (ribotipado y MLSA). Basado en todos estos resultados pudimos concluir que el biotipo 1 es el más heterogéneo, mientras que el biotipo 3 es muy homogéneo formando un clado que ha evolucionado recientemente. En cuanto al biotipo 2, las filogenias muestran que estos aislados han emergido de diferentes muestras ambientales y que la virulencia para peces podría adquirirse al incorporar el plásmido de virulencia.

En conclusión, nuestro estudio no apoya la actual división de la especie en biotipos. Nuestros datos indican que hay dos poblaciones distintas dentro de *V. vulnificus* que se correlacionan bien con todas las técnicas de tipado genético empleadas. Estas dos divisiones podrían ser la base de un nuevo esquema de clasificación de la especie.

Propuesta de metodología para la evaluación del potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de sustratos naturales y destinadas a alimentación animal

Carles Adelantado Faura

Directora: **Dra. M^a Ángeles Calvo Torras**
Centro de realización: Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona.

Centro de presentación: Centro de Visión por Computador, Universitat Autònoma de Barcelona.

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral fue proponer una sencilla metodología *in vitro* que permitiera el aislamiento, la identificación y la evaluación de la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, aisladas de diferentes sustratos naturales, asegurando al mismo tiempo que son seguras e inocuas para ser utilizadas en alimentación animal. Los objetivos específicos de esta investigación se concretaron en dos partes bien diferenciadas: por una parte, el aislamiento de cepas de *Lactobacillus* a partir de sustratos naturales (epitelio gastrointestinal y heces de vacuno, cereales), así como de productos comerciales para consumo humano que sirvieron de controles. La segunda parte consistió en la evalua-

ción y la selección de las cepas de *Lactobacillus* aisladas, mediante diferentes pruebas que pusieron de manifiesto su capacidad probiótica.

A partir de los resultados obtenidos se pudo observar que existen diferencias entre la capacidad probiótica de las cepas del género *Lactobacillus* destinadas a alimentación animal, en función del sustrato del que se aíslan. Se pudo constatar asimismo, que los mejores sustratos para la obtención de estas cepas potencialmente probióticas son las heces de vacuno, según los criterios prefijados en este estudio. Los cereales también son una fuente de cepas de *Lactobacillus* con propiedades interesantes, que pueden utilizarse con otras finalidades.

La metodología *in vitro* propuesta en esta tesis, se compone de un conjunto de pruebas que caracterizan de manera fenotípica y genotípica las cepas aisladas, y de pruebas que evidencian su posible capacidad probiótica.

Las pruebas propuestas son: aislamiento de cepas a partir de heces en medio de cultivo caldo MRS sin antibióticos, aislamiento de colonias en agar MRS sin antibióticos, incubación de cepas de 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia (5% de CO₂), pruebas morfológicas y bioquímicas básicas (tinción de Gram, tinción de esporas, prueba de la catalasa, capacidad hemolítica en agar sangre), identificación a nivel de género (PCR), identificación a nivel de especie (API50CHL), mantenimiento de cepas (liofilización, usando como crioprotector una solución con 15% de leche en polvo desnatada y 4% de sacarosa), evaluación de la resistencia a condiciones físico-químicas del tracto gastrointestinal (300µg/mL de lisozima, valores de pH entre 2 y 4, 30µg/mL de peróxido de hidrógeno), determinación de la producción de sustancias antimicrobianas por el método de difusión en disco, valoración de la resistencia a antibióticos por el método de difusión en disco, teniendo en cuenta las especificaciones de la EFSA, y caracterizar la cinética de crecimiento de las cepas con el objetivo de producir las a escala industrial.

Efectos de varios tratamientos químicos descontaminantes sobre la calidad sanitaria y la vida útil de la carne de pollo. Estudio del riesgo potencial para el consumidor

Elena María del Río Nistal

Directores: **Rosa María Capita González** y **Carlos Alonso Calleja**

Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria- Campus de Ponferrada y Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

El elevado consumo de carne de pollo justifica el interés de la Industria y la Administración por obtener un producto seguro para el consumidor, con una vida útil prolongada y con adecuadas características organolépticas. Sin

embargo, las particularidades de producción hacen que este alimento sea un vehículo importante de microorganismos patógenos y alterantes. Los tratamientos antimicrobianos o descontaminantes pueden ser una medida complementaria para mejorar la calidad higiénica y sanitaria de la carne de pollo. Esta Tesis Doctoral, presentada en la modalidad de "Compendio de Publicaciones", ha tenido como objetivo estudiar el efecto de cuatro tratamientos químicos descontaminantes (fosfato trisódico -FTS-, clorito sódico acidificado -CSA-, ácido cítrico -AC- y peroxiácidos -PA-), así como la influencia del arrastre mecánico por el agua, sobre la carga microbiana (se estudiaron 16 grupos microbianos patógenos y alterantes, con atención especial a *Pseudomonas* spp.) y la calidad sensorial de la carne de pollo. Asimismo se comparó, *in vitro* y en carne, la evolución de las poblaciones de microorganismos patógenos y alterantes en presencia de diferentes tratamientos antimicrobianos para determinar si la multiplicación de los microorganismos patógenos hasta niveles peligrosos podría ocurrir antes de que la alteración haga el alimento rechazable, hecho que implicaría un riesgo potencial para el consumidor.

La carne de pollo adquirida inmediatamente después del sacrificio presentó niveles excesivamente elevados, superiores a los criterios microbiológicos, de varios grupos microbianos. Todos los tratamientos estudiados redujeron significativamente, respecto a las muestras no tratadas, la carga microbiana de la carne de pollo, sin modificar sus características sensoriales. Fueron especialmente efectivos el FTS, el CSA y el AC, que consiguieron prolongar en dos días la vida útil de este alimento. En las condiciones de tratamiento el AC fue el compuesto más efectivo frente a las bacterias Gram-positivas, y el CSA frente a las Gram-negativas, siendo el FTS el segundo compuesto más efectivo en ambos casos. Los recuentos microbianos de las bacterias alterantes y patógenas fueron similares en las muestras tratadas con agua y en las no tratadas, lo que pone de manifiesto el nulo efecto del arrastre mecánico de los microorganismos por el agua. Las especies de *Pseudomonas* detectadas, *P. putida* y *P. fluorescens*, presentaron intensidades de actividad enzimática muy variables, especialmente por lo que se refiere a la actividad lipolítica, no observándose diferencias entre las cepas procedentes de muestras descontaminadas y no tratadas. Se observaron diferentes agrupamientos de las cepas según se considerasen los resultados de las pruebas genéticas o bioquímicas, lo que nos sugiere que algunas cepas se manifiestan fenotípicamente de forma similar, a pesar de presentar diferentes secuencias genéticas. Tras los tratamientos, la piel de las muestras sumergidas en soluciones de FTS presentó los valores más elevados de pH, y la de las muestras tratadas con AC y CSA los más bajos. Los valores de pH fueron similares en las muestras no tratadas y en las sumergidas en agua y en soluciones de PA, hecho que puede contribuir a explicar el escaso efecto antimicrobiano de los PA. El FTS a concentraciones bajas incrementó el ritmo de crecimiento de las bacterias patógenas (*Salmonella* serotipo Enteritidis y *Listeria monocytogenes*) con respecto a las muestras control, hecho que sugiere un riesgo potencial para el consumidor.

Métodos rápidos para el control de *B. cereus* en alimentos

Juan Fco. Martínez Blanch

Directores: Esperanza Garay Aubán, Rosa Anzar Novella y Federico Uruburu Fernández

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA). CSIC. Valencia.

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo esporulado contaminante habitual de alimentos tanto frescos como procesados. La detección y cuantificación de este patógeno de alimentos se realiza habitualmente por técnicas culturales. Dichas técnicas consumen mucho tiempo y, en ocasiones, llevan a identificaciones erróneas. Como alternativa, las técnicas moleculares basadas en la PCR tienen como ventaja una mayor rapidez y seguridad en la identificación del microorganismo, e incluso permiten su cuantificación mediante PCR a tiempo real (Q-PCR).

A partir de una colección de cepas de referencia y aislados de alimentos, identificados previamente (fenotípicamente, ISO 7932 y API-50CH/B y genotípica, ISR-PCR y RAPD), se determinó la presencia de genes relacionados con factores de virulencia mediante PCR convencional. El gen *pc-plc* se detectó en un mayor porcentaje en las cepas del "Grupo *B. cereus*", y dado que se encuentra en una única copia por genoma, fue seleccionado como gen diana. Se diseñaron 4 oligonucleótidos para el desarrollo de procedimientos de Q-PCR en modo SYBR Green y Taqman. Se optimizaron los parámetros de la reacción de cuantificación, y se evaluó su especificidad para el "Grupo *B. cereus*", resultando más adecuado el procedimiento de SYBR Green Q-PCR. A continuación se ensayó la capacidad para la detección y cuantificación en alimentos contaminados artificialmente: huevo líquido y leche en polvo infantil. Como resultado el sistema desarrollado ha demostrado su capacidad para la cuantificación de *B. cereus* entre 10^5 y 10^6 ufc/ml a partir de la matriz ensayada, que corresponde al mismo nivel que el método de referencia por recuento en placa.

Dado que *B. cereus* puede estar presente en alimentos tanto en forma vegetativa como esporulada, para su detección por PCR se abordó, asimismo el desarrollo de un protocolo para asegurar la liberación del DNA a partir de esporas. Se partió de suspensiones calibradas de esporas que fueron sometidas a diferentes tratamientos: a) térmicos y b) adición de germinadores en diferentes combinaciones. Tras los tratamientos, se realizó la extracción de DNA con DNeasy Tissue kit (Qiagen) se cuantificó y se evaluó el rendimiento espectrofluorimétricamente (PicoGreen, Invitrogen) y mediante PCR convencional y SYBR-Green Q-PCR. El tratamiento de germinación con 0,5 mM L-alanina-inosina resultó el más eficiente en suspensiones concentradas de esporas. Sin embargo, cuando se ensayó en alimentos inoculados (10^4 - 10^6 esporas/ml), la extracción con DNeasy Tissue Kit, sin necesidad de tratamientos previos, resultó satisfactorio.

Por último, se realizó una aproximación cuantitativa para la detección de formas viables de *B. cereus*. Para ello se desarrolló un procedimiento de PCR a tiempo real con transcripción inversa (Q-RT-PCR) utilizando como diana el RNA mensajero del gen *pc-plc*, como indicador del estado de viabilidad celular. El nivel de sensibilidad obtenido por Q-RT-PCR es de 30 células/reacción a partir de suspensiones celulares, y de 847 células/reacción en presencia de huevo líquido.

Como conclusión, los sistemas de Q-PCR y Q-RT-PCR desarrollados son eficientes para detectar la presencia de las especies del "Grupo *B. cereus*" en alimentos, al menos al mismo nivel que el método de referencia, permitiendo además la cuantificación incluso de formas viables.

Estudio de las características genéticas de levaduras de velo de flor responsables de la crianza biológica del vino fino de Jerez y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda

M^a Luisa Espinazo Romeu

Directores: Jesús Manuel Cantoral Fernández, Emilia Matallana Redondo y Agustín Aranda Fernández

Centro de realización: Facultad de Ciencias del Mar (CASEM). Universidad de Cádiz/ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Valencia.

Centro de presentación: Facultad de Ciencias del Mar (CASEM). Universidad de Cádiz.

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización mediante el uso de técnicas de Biología Molecular de la microbiota de levaduras del género *Saccharomyces* pertenecientes al sistema bajo crianza biológica de la Manzanilla, vino adscrito a la DD.OO Jerez-Xérès-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda y vinagre de Jerez en la provincia de Cádiz. Las técnicas principalmente utilizadas en este apartado fueron la electroforesis de Campo Pulsante (CHEF) y el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción del DNA mitocondrial. Se detectaron 8 patrones electroforéticos distintos a lo largo de las distintas escalas, siendo mayoritaria las especies del género *Saccharomyces cerevisiae* raza beticus, y en menor medida cepas pertenecientes a la raza montuliensis. Estos patrones se clasifican en 4 grupos en función de estudios de similitud, observándose el predominio de las cepas pertenecientes al Tipo I. También se observó la ausencia de cambios en la microbiota presente en una bodega cuando es trasladada a otra de distinta ubicación, punto a considerar cuando hay reestructuración de bodegas.

Por otro lado, hemos querido estudiar la implicación del gen *BTN2* en el comportamiento de las levaduras de velo de flor. En bibliografía anterior, se ha demostrado que este gen estaba inducido por etanol y acetaldehído en estudios realizados mediante chips de DNA en levaduras

de laboratorio, pero no se había estudiado cual era el comportamiento de las cepas industriales en ausencia de este gen. Para ello realizamos la delección del gen *BTN2* tanto en una cepa de 1^a fermentación como en una cepa de velo de flor mediante recombinación homóloga (es el primer estudio en el que se realiza la delección de un gen en cepas de velo de flor). En él se ha podido observar la implicación del gen *BTN2* en la resistencia al etanol, la formación de biofilm y la capacidad fermentativa de las cepas estudiadas. De esta forma las cepas mutantes para el gen *BTN2*, muestran menor resistencia a una alta presencia de etanol en el medio que sus cepas parentales. Este gen se encuentra activado en presencia de altas concentraciones de acetaldehído, sin embargo resulta reprimido en los estreses con etanol, alta concentración de azúcares y bajo pH. Sin embargo una sobreexpresión del gen *BTN2* bajo el control del promotor de estrés *SP11*, causa un defecto en el crecimiento en la mayoría de los medios de crecimiento utilizados, sobre todo en aquellos cuya fuente de carbono no era fermentable, indicando que es esencial una correcta regulación de *BTN2* en condiciones de metabolismo respiratorio en las levaduras de velo de flor. También se realizó un análisis global de expresión génica comparada entre la cepa de flor 11.3 y su mutante delta-*btn2*, incubados en vino, vinculando la función del gen *BTN2* con mecanismos de regulación del pH celular y, particularmente a nivel de la vacuola, ya que en dicho mutante se observa mayor nivel de expresión de genes relacionados con dichos procesos. La delección de *BTN2* también altera el patrón de expresión de la floculina *FLO11/MUC1*, alterando la capacidad de la levadura de adoptar un crecimiento en biofilm.

Análisis comparativo de las poblaciones microbianas de las cuevas con pinturas rupestres de Covalanas y La Haza (Ramales de la Victoria, Cantabria)

Víctor Manuel Rivalta Gascó

Directores: **Diego A. Moreno y M. Isabel Sarró**
Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Madrid.

El deterioro de las pinturas rupestres de la Cueva de Altamira ocasionado por la afluencia turística, y que motivó el cierre al público de la cavidad, supuso el punto de partida de diferentes estudios acerca de las condiciones ambientales y naturales de las cuevas en España, especialmente de aquellas que contienen arte rupestre.

El presente trabajo aborda el estudio de las poblaciones bacterianas presentes en el agua, aire y paredes de las cuevas de Covalanas y la Haza (Ramales de la Victoria, Cantabria), así como la determinación de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa y

concentración de CO₂) en estas cuevas, ambas con pinturas rupestres y pertenecientes al mismo sistema cárstico, pero sometidas a diferentes regímenes de visitas.

Para este estudio se ha combinado el uso de técnicas dependientes de cultivo con técnicas de Biología Molecular como PCR, DGGE y secuenciación, además de microscopía de epifluorescencia. Las muestras se obtuvieron en verano, otoño, invierno y primavera con el fin de comparar en un ciclo anual las bacterias presentes y evaluar la posible influencia de los visitantes. En total se aislaron e identificaron bacterias de 35 géneros diferentes, pertenecientes a los grupos de Alfa-proteobacteria, Flavobacteria, Sphingobacteria, Actinomycetales y Firmicutes. El grupo de los actinomicetos fue el más abundante.

Los parámetros ambientales de las cuevas se obtuvieron empleando sensores de temperatura y humedad relativa del aire, localizados en diferentes sectores de las cuevas. La temperatura media anual de la Cueva de Covalanas fue de 13,03 °C, y la de la Cueva de La Haza de 14,66 °C, con una humedad relativa en ambas cuevas próxima al 100%. Los valores de CO₂ fueron de alrededor de 700 ppm en ambas cuevas. Este trabajo pone de manifiesto la utilidad del estudio de los parámetros ambientales como apoyo a la gestión de cuevas turísticas.

Estrategias de estudio de genómica comparativa en microorganismos con niveles de información pregenómica y complejidad génica diferentes.

José Luis Lavín Trueba

Directores: **Antonio Gerardo Pisabarro de Lucas y José Antonio Oguiza Tomé**
Universidad Pública de Navarra.

En esta Tesis Doctoral se abordan diversas estrategias de estudio de genómica comparada en microorganismos con niveles diferentes de información pregenómica y de complejidad genética.

Se han aportado las herramientas bioinformáticas, para afrontar los estudios de genómica comparada en organismos con grados de complejidad muy diferentes y que abarcan un espectro lo suficientemente amplio (tanto a nivel filogenético como de estudios previos a nivel pregenómico) como para ilustrar la manera de abordar este tema desde diferentes enfoques.

Se afrontan este tipo de estudios teniendo en cuenta en cada caso la metodología de enfoque y las posibilidades presentes actualmente para llevarlos a cabo en lo que a recursos bioinformáticos se refiere. Se analiza también cómo procesar los datos de partida para llegar a conclusiones precisas y con significado biológico reseñable, que puedan ser exportadas a la experimentación de laboratorio.

Respecto a los microorganismos con elevada cantidad de información pregenómica y estructura genética menos compleja, la estrategia que se plantea es la de aprovechar esos dos

factores para hacer un abordaje más cómodo y con una mayor rapidez que el usado en los microorganismos con menor cantidad de información pregenómica. Además de los datos preexistentes sobre estos organismos, por su menor complejidad y tamaño de su material genético, están disponibles en la actualidad una serie de herramientas bioinformáticas que posibilitan rastreos y búsquedas en todo el genoma en tiempos relativamente cortos y lo que es más importante, con un grado de precisión muy elevado.

Un problema diferente es el que se plantea a la hora de afrontar un estudio de este tipo en organismos con baja o nula información pregenómica y con mayor complejidad en su estructura genética. Para estos casos, las herramientas disponibles actualmente, para resolver el problema de realizar un estudio de genómica comparativa con garantías son escasas y bastante menos precisas. En estos microorganismos, al ser menor la cantidad de genes descritos experimentalmente en el laboratorio y teniendo en cuenta que las herramientas predictivas no son tan precisas (debido a la mayor complejidad genética de estos organismos) hay que intentar obtener todos los datos que faltan a nivel particular para los diferentes organismos. Para ello hay que utilizar herramientas bioinformáticas eficaces, intentando conformar bases de datos que puedan ser cruzadas entre organismos con cierta proximidad filogenéticas, para extrapolar conocimientos sobre sus genomas y así avanzar en el conocimiento sobre su genómica, proteómica y metabolómica.

Utilización de distintas proporciones de coagulante vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus* en la maduración del queso de oveja

Elena Galán Larrubia

Director: **José Fernández-Salguero Carretero**

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

Se ha estudiado el efecto del empleo de diversas concentraciones del coagulante vegetal en polvo (CVP ó CVL) procedente de las flores desecadas del cardo *Cynara cardunculus* L., obtenido mediante liofilización de extractos acuosos, sobre las características del queso de oveja de gran formato elaborado tanto con leche cruda como con leche pasteurizada a lo largo del proceso de maduración.

En quesos fabricados con leche de oveja cruda se ha comparado la utilización de una cantidad normal del coagulante vegetal en polvo (CVP; 100 %) y del doble cantidad de coagulante vegetal (2CVP; 200 %) con quesos obtenidos con cuajo de ternera, mediante la determinación las características químicas, físico-químicas, bioquímicas y organolépticas del queso durante seis meses de maduración. En la mayo-

ría de los parámetros químicos estudiados no se observaron diferencias entre los distintos tipos de coagulantes ensayados. Únicamente, la actividad de agua fue significativamente inferior ($p < 0,05$) en los quesos obtenidos con coagulante vegetal (CVP y 2CVP), a partir de los dos meses de maduración, respecto a los obtenidos con cuajo animal.

La cantidad de coagulante vegetal utilizado sí influyó sobre la hidrólisis de las caseínas, medida en función del nitrógeno soluble (NS), nitrógeno no proteico (NNP), nitrógeno aminoácido (NAA) y nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$), ya que se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), a partir de los 2 días de maduración, entre los quesos producidos con 2PVC en comparación con los obtenidos con la cantidad normal de CVP. Por su parte, en estos quesos (CVP) sólo se obtuvieron tasas de NS y NNP significativamente más elevadas ($p < 0,05$) en comparación con los fabricados con cuajo animal (CA).

La utilización de coagulante vegetal aceleró ($p < 0,05$) las características organolépticas de los quesos en comparación con los fabricados con cuajo de ternera, siendo particularmente intensas en los quesos elaborados con 2CVP que ya a los 60 días de maduración obtuvieron puntuaciones de olor e intensidad de sabor similares a las de los quesos fabricados con cuajo de ternera a los 180 días. El sabor amargo de los quesos obtenidos con 2CVP no fue significativamente mayor ($p > 0,05$) que los producidos con una cantidad normal de coagulante vegetal (CVP). De ahí que la intensa actividad proteolítica de las cipsosinas del coagulante vegetal (especialmente si se utiliza doble cantidad de coagulante, 2CVP) puede hacer que los fabricantes obtengan quesos completamente madurados, con las características organolépticas genuinas de éste tipo de quesos, aproximadamente tres meses antes que si se utiliza cuajo de ternera.

En quesos fabricados con leche de oveja

pasteurizada se ha comparado la utilización de una cantidad normal del coagulante vegetal liofilizado (CVL; 100 %) y de una mezcla de coagulante vegetal y cuajo de ternera (CM; 50 %: 50 %) en comparación con quesos obtenidos con cuajo animal (CA; 100%), mediante la determinación de las características químicas, físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y organolépticas del queso durante ocho meses de maduración. En la mayoría de los parámetros químicos estudiados no se observaron diferencias entre los distintos tipos de coagulantes ensayados. La actividad de agua fue inferior en los quesos obtenidos con coagulante vegetal (CVL y CM) respecto a los obtenidos con cuajo animal.

El nitrógeno soluble (NS) de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CVL y CM) aumentó a lo largo de la maduración de manera significativamente más intensa ($p < 0,05$) que el de los que se fabricaron con cuajo animal (CA). Igualmente se ha observado que los niveles alcanzados de NS en los quesos fabricados con el coagulante vegetal liofilizado son muy similares a los obtenidos con la mezcla de coagulante vegetal + cuajo de ternera. Las tasas de NNP, NAA y $N-NH_3$ de los quesos fabricados con CVL y con CM fueron superiores a las de aquellos elaborados con CA en prácticamente todos los periodos madurativos estudiados.

Se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de péptidos hidrófobos, y en consecuencia en el índice de péptidos hidrófobos/hidrófilos, presentes en los distintos tipos de queso, de forma que tanto los elaborados con CVL como los de CM, presentaron valores superiores a los elaborados con CA.

Los aminoácidos libres mayoritarios encontrados durante la maduración en quesos elaborados con los tres tipos de coagulante fueron histidina, lisina, isoleucina, ornitina, valina, leucina y alanina, siendo mayor la concentración total de aminoácidos en los quesos obtenidos

con coagulante vegetal (CVL y CM) respecto a los elaborados con cuajo de ternera (CA).

En líneas generales, los recuentos de los grupos microbianos bacterias aerobias mesófilas, enterobacteriáceas, coliformes, estafilococos, micrococos, bacterias ácido-lácticas, levaduras y mohos disminuyeron a lo largo de la maduración sin que se observen diferencias en función del coagulante ensayado.

Los quesos elaborados tanto con coagulante vegetal liofilizado (CVL) como con mezcla al 50 % (CM) presentaron en general mayor intensidad de olor y sabor, menor dureza y firmeza y mayor cremosidad, mayor picazón bucal, así como un sabor amargo ligeramente superior frente a los elaborados con cuajo.

En general, en los quesos fabricados con leche pasteurizada también se puede acelerar el proceso de maduración de forma sustancial utilizando una mezcla de coagulante vegetal/cuajo de ternera al 50/50 al mismo tiempo que se consiguen unas características organolépticas similares a la de los quesos elaborados solamente con coagulante vegetal.

Péptidos bioactivos: En un estudio preliminar sobre la secuenciación de los péptidos presentes en varias de las muestras estudiadas, se han encontrado algunos referenciados en bibliografía como péptidos bioactivos, tales como: YQEPVL, YQEPVLPV, GPVVRGPFPI, YQEPVLPVVRGPFPI, GPVVRGPFPI, todos ellos antihipertensivos, YQEPVLPVVRGPFPI, de actividad antimicrobiana, YPFTGPIPN, con actividad opioide y YQEPVLPV que presenta propiedades inmunomoduladoras.

Parte de esta tesis ha sido publicada en: Galán, E, Prados, F., Pino, A., Tejada, L & Fernández-Salguero, J (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheese made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18, 93-98.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

Actualidad SEM publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos Teseo es apropiado también.

Actualidad SEM se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.