

Grupo de Cultivos Lácteos Funcionales (IPLA-CSIC)

BALTASAR MAYO Y ANA BELÉN FLÓREZ

IPLA-CSIC, Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias

✉ baltasar.mayo@ipla.csic.es | abflores@ipla.csic.es



Grupo Cultivos Lácteos Funcionales (IPLA-CSIC). De izquierda a derecha: José Alejandro Valenzuela López (Predoctoral), Universidad Nacional del Noroeste (Argentina); Javier Rodríguez Álvarez (Predoctoral), contrato Severo Ochoa del Principado de Asturias; Lucía Vazquez Iglesias (Postdoctoral), contratada con cargo al ISPA; Ana Belén Flórez (Investigadora), Científica Titular OPIs; Baltasar Mayo (IP del grupo), Profesor de Investigación OPIs; Paula Rosa Suárez Vaquero (Titulada superior), contratada, programa "Yo investigo"; y Cristina Lobato Flecha (Titulada superior), contratada a proyecto.

Introducción

El grupo de investigación "Cultivos Lácteos Funcionales" (CLF), liderado por el Dr. Baltasar Mayo, se constituye en el IPLA-CSIC en el año 1996. La actividad investigadora del grupo CLF tiene como objetivo seleccionar microorganismos con propiedades relevantes para su utilización en productos lácteos. A lo largo de estos años, el grupo ha trabajado en dos líneas de investigación principales: **1) Tipificación microbiana de productos lácteos**

tradicionales y diseño de fermentos y 2) Microbiología del tracto gastrointestinal humano y selección de probióticos. Conceptualmente, estas líneas tan distintas están unidas por un objetivo común y una metodología similar. El objetivo de ambas es el aislamiento y la selección de microorganismos beneficiosos con propiedades tecnológicas o funcionales deseables para su empleo como fermentos acidificadores, fermentos de maduración o cultivos probióticos en productos lácteos. Estas líneas principales se complementan

con una tercera transversal que da apoyo a las dos anteriores: **3) Caracterización funcional de microorganismos de interés en matrices lácteas.** En esta línea estudiamos las bases bioquímicas y genéticas de las propiedades deseables e indeseables de los microorganismos, contribuyendo a un desarrollo racional y eficiente de los cultivos.

La actividad del grupo CLF se puede consultar en el enlace de la página web del IPLA: <http://www.ipla.csic.es/cultivos-lacteos>

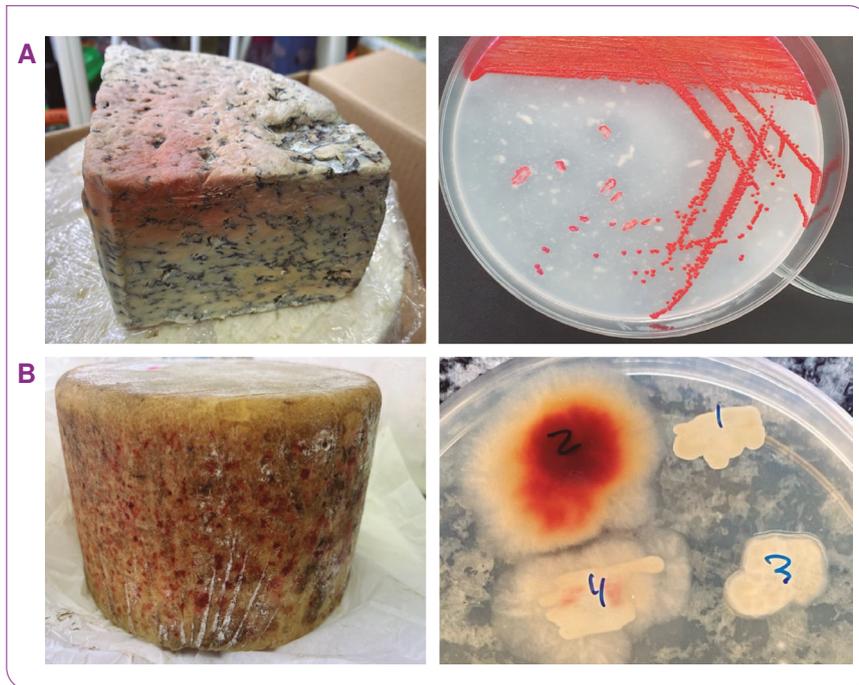


Figura 1. Quesos con defectos de coloración y microorganismos responsables. Panel A, queso azul con color rojo (izquierda) y cepa de *Serratia marcescens* productora de prodigiosina aislada del queso (derecha). Panel B, queso de oveja con manchas marrones en su superficie (izquierda) y cepa de *Epicoccum lauyense* que las produce (derecha, 2).

1. Tipificación microbiana de productos lácteos tradicionales y diseño de fermentos

Esta es la línea más tradicional del grupo. En ella la actividad investigadora se centra en la caracterización y tipificación microbiana de quesos tradicionales de Asturias (Peñamellera, Cabrales y Casín), de otros quesos extranjeros (Oscypek de Polonia y Lighvan y Koozeh de Irán) y de otros productos lácteos (yogures, leches fermentadas). El objetivo del trabajo es la identificación y selección de cepas que puedan ser empleadas en el diseño de fermentos específicos para esos quesos y útiles para la industria láctea en general. Entre los logros tecnológicos más importantes de esta línea podemos destacar la gran colección de bacterias de origen lácteo que hemos ido reuniendo a lo largo del tiempo, y principalmente de bacterias ácido-lácticas (BAL), muchas de las cuáles se encuentran bien caracterizadas en sus propiedades tecnológicas y de seguridad alimentaria. Hemos desarrollado también

fermentos específicos para los quesos de Peñamellera y Cabrales. El fermento para este último queso, CAB-00, incluye cepas seleccionadas de las especies *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*. Las cepas del fermento se han licenciado a la empresa Biogés Starters SA, quienes producen el fermento a petición del Consejo Regulador. CAB-00 se lleva utilizando de forma exitosa desde hace más de 12 años. Otras cepas de BAL caracterizadas se han licenciado a empresas de fermentos como Christian Hansen (Dinamarca) o CSK Food Enrichmen (Holanda).

La actividad investigadora actual del grupo en esta línea está siendo reorientada hacia un enfoque de Ecología Microbiana para el estudio de la diversidad y las relaciones entre los componentes de la microbiota de los productos lácteos. Para ello estamos utilizando diversas técnicas ómicas de última generación (genómica, metagenómica, transcriptómica, metabolómica, etc.) acopladas con técnicas convencionales de cultivo. En último término, las relaciones entre los microorganismos tienen una gran implicación en la calidad y seguridad higiénico-sanitaria de los productos lácteos. Así, de forma reciente,

hemos identificado, aislado y caracterizado cepas de *Serratia marcescens* productoras de prodigiosina como responsables de una coloración roja atípica en quesos azules, o cepas del hongo *Epicoccum lauyense* que causan una coloración marróncea en la superficie de quesos tipo Castellano de leche de oveja y elaborados con leche cruda (Figura 1).

2. Microbiología del tracto gastrointestinal humano y selección de probióticos

En esta línea, fuimos uno de los grupos pioneros —allá por el año 2000— en aproximarse a la microbiología gastrointestinal humana desde el Área de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Dada la influencia que la dieta tiene en la microbiota y la particular dieta saludable de los españoles (dieta mediterránea), el objetivo inicial del estudio contemplaba la posibilidad de identificar y seleccionar cepas que pudieran utilizarse como probióticos más robustos y/o más específicos que los comerciales. A lo largo de los años, hemos colaborado en la caracterización de la microbiota de algunas secciones del intestino humano como la mucosa colónica o el estómago. De estos estudios se han recuperado numerosas cepas con potencial probiótico. Así, procedente de las heces de un individuo sano, por ejemplo, se identificó una cepa de *Lactocaseibacillus rhamnosus* que posee resistencia no transmisible a eritromicina y otros macrólidos debido a una mutación puntual en el gen que codifica el ARNr 23S. La utilización de la cepa se patentó (ES2328651) y se transfirió a la empresa Biópolis SA. Procedente del estómago, por su parte, identificamos una cepa de *Limosilactobacillus reuteri* (CECT 8395) con una elevada actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*. La utilización de dicha cepa para paliar patologías intestinales se protegió también mediante patente (P201331271-PCT/ES2014/070666) y la

patente se transfirió a la empresa Protein International (UK). Durante los últimos años, hemos estudiado también las relaciones bidireccionales entre la microbiota y las isoflavonas de la soja, con el fin de determinar si los beneficios atribuidos a estos compuestos de la dieta pudieran estar mediados por las poblaciones intestinales.

3 Caracterización funcional de microorganismos de interés en matrices lácteas

La caracterización de BAL y otros biotipos para su utilización como fermentos y/o probióticos implica el estudio de diversos aspectos de su fisiología y genética. En este sentido el grupo ha contribuido a la caracterización de numerosos plásmidos de BAL y bifidobacterias, algunos de los cuales se han empleado en el desarrollo de vectores de clonación y expresión que permiten abordar estudios moleculares en estos grupos bacterianos y facilitan su manipulación genética. En particular, resultó muy exitoso el vector bifuncional bifidobacterias-*Escherichia coli* pAM1 que se encuentra depositado en la Colección Belga de Microorganismos (BCCM) (Ref. LMBP-8058).

Con el objetivo de no extender la resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria, hemos sido pioneros también en el estudio de la resistencia a antibióticos en cepas de BAL y bifidobacterias de origen lácteo e intestinal. La presencia de resistencias transmisibles se utiliza como criterio negativo en los procesos de selección de fermentos y probióticos. Este tema nos permitió colaborar en el desarrollo de la norma ISO10932 para el ensayo de resistencia a antibióticos en estos grupos bacterianos y nos ha dado gran visibilidad internacional. Además de la caracterización de numerosos genes de resistencia a antibióticos y los elementos sobre los que se asientan, hemos determinado también la evolución de las poblaciones resistentes y la carga de genes de resistencia en productos lácteos.

Publicaciones seleccionadas (últimos 10 años)

Delgado, S., Cabrera, R., Mira, A., Suárez, A., Mayo, B. 2013. Microbiological survey of the human gastric ecosystem by culturing and pyrosequencing approaches. *Microbial. Ecol.* 65: 763-772.

Delgado, D., Rachid, C. T. C. C., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, A., Peixoto, R. S., Mayo, B. 2013. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol.* 36: 103-111.

Delgado, S., Leite, A.M.O., Ruas-Madiedo, P., 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.

Flórez, A. B., Mayo, B. 2015. The plasmid complement of the cheese isolate *Lactococcus garvieae* IPLA 31405 revealed adaptation to the dairy environment. *PLoS One* 10: e0126101

Flórez, A. B., I. Campedelli, S. Delgado, Á. Alegría, E. Salvetti, G. E. Felis, B. Mayo, S. Torriani. 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.

Delgado, S., Flórez, A. B., Guadamuro, L., Mayo, B. 2017. Genetic and biochemical characterization of an oligo- α -1,6-glycosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 246: 32-39.

Flórez, A. B., Vázquez, L., Mayo, B. 2017. A functional metagenomic analysis of tetracycline resistance in cheese bacteria. *Front. Microbiol.* 8: 907.

Guadamuro, L., Flórez, A. B., Vázquez, L., Mayo, B. 2017. characterization of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* β -glucosidases involved in the release of aglycones from isoflavone-glycosides. *Food Res. Int.* 100: 522-528.

Flórez, A. B., Mayo, B. 2018. Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* LL441 and genetic characterisation of the locus for the lantibiotic plantaricin C. *Front. Microbiol.* 9: 1916.

Flórez, A. B., Vázquez, L., Rodríguez, J., Redruello, B., Mayo, B. 2019. Transcriptional regulation of the equol biosynthesis gene cluster in *Adlercreutzia equolifaciens* DSM19450^T. *Nutrients* 11: 993.

Sirichoat, A., Flórez, A. B., Vázquez, L., Buppasiri, P., Panya, M., Lulitanond, V., Mayo, B. 2020. Antibiotic resistance-susceptibility profiles of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus* spp. from the human vagina, and genome analysis of the genetic basis of intrinsic and acquired resistances. *Front. Microbiol.* 11: 1438.

Flórez, A.B., Vázquez, L., Rodríguez, J., Mayo, B. 2021. Direct recovery and molecular characterization of antibiotic resistance plasmids from cheese bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 7801.

Rodríguez, J., Fernández-López, R., Vázquez, L., González-Guerra, A., Flórez, A.B., de la Cruz, F., and Mayo, B. 2022. Isolation and phenotypic and genomic characterization of *Tetragenococcus* spp. from two Spanish traditional blue-veined cheeses made of raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 371: 109670

Rodríguez, J., Vázquez, L., Flórez, A.B., Mayo, B. 2022. Phenotype testing, genome analysis, and metabolic interactions of three lactic acid bacteria strains existing as a consortium in a naturally fermented milk. *Front. Microbiol.* 13:1000683.

Flórez, A.B., Vázquez, L., Rodríguez, J., Mayo, B. 2023. Phenotypic and safety assessment of the cheese strain *Lactiplantibacillus plantarum* LL441, and sequence analysis of its complete genome and plasmidome. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 605.

.....