

INFORME TÉCNICO FINAL

PROGRAMA ASTURIAS

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE I+D+i

Referencia proyecto	IDI/2018/000091		
Acrónimo	REBIOAL		
Título del Proyecto	Cribado y análisis de recursos biológicos de matrices alimentarias para su valorización e implementación en los procesos productivos de alimentos		
Periodo de Justificación	Desde :	01/01/2018	Hasta: 31/12/2020

En Noreña , a 30 de marzo de 2020



1. MEMORIA TÉCNICA

HITO 1. Creación de un banco biológico de microorganismos aislados de diferentes nichos

Tarea 1.1. Prospectiva bibliográfica y selección de nichos ambientales/matrices alimentarias

Por definición, los microorganismos son organismos microscópicos invisibles al ojo humano y que, tradicionalmente, se asocian exclusivamente con aislados bacterianos (procariotas) o virus.

Los microorganismos bacterianos han sido tradicionalmente utilizados en procesos biotecnológicos. Su caracterización ha permitido aprovechar sus capacidades metabólicas para ser explotadas en procesos industriales como las fermentaciones de alimentos y la bioproducción de metabolitos de interés industrial (Bourchidon et al., 2012). Aunque el conocimiento y aplicación de aislados bacterianos con aplicación biotecnológica nació hace décadas, se hace necesario continuar con la investigación y la búsqueda de nuevos aislados y nuevas aplicaciones, en línea con la filosofía de bioeconomía y el aprovechamiento de recursos biológicos.

Por otro lado, las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos que generan biomasa a partir de CO₂ como fuente de carbono y a partir de luz como fuente de energía. Aunque filogenéticamente están muy alejadas de los microorganismos bacterianos, las microalgas son capaces de sintetizar metabolitos en condiciones de laboratorio de forma similar al cultivo bacteriano, lo que las hace idóneas para su estudio a pequeña escala y su aplicación en procesos biotecnológicos y en la industria alimentaria. En comparación con las bacterias, las microalgas acaban de aterrizar en la filosofía de su aprovechamiento como reactores biológicos, y su conocimiento y estudio es un hecho muy reciente. La producción de microalgas es un mercado aún inmaduro, pero con mucho potencial para producir compuestos bioactivos de alto valor añadido (Barba et al., 2017; Roohinejad et al., 2017; Liang et al., 2018).

Existen, en general, dos formas de aprovechar tecnológicamente los microorganismos:

- Como microorganismos vivos, aprovechando sus funciones metabólicas y siendo adicionados en distintos formatos como preparaciones microbianas.
- Metabolitos producidos por los microorganismos que puedan ser utilizados como aditivos o complementos en alimentos, como pudieran ser bacteriocinas, compuestos colorantes, compuestos antioxidantes, texturizantes, entre otros ejemplos.

Respecto a los requisitos que debe cumplir un producto o proceso susceptible de ser patentado, éstos



son:

- Grado de novedad
- Grado de invención
- Grado de aplicación industrial

Grupos de microorganismos de interés

Como se preveía, diversos estudios de la comunidad científica indican que el grupo bacteriano con mayor aplicabilidad en la industria alimentaria y también como clave en investigaciones básicas son las Bacterias del Ácido Láctico (BAL).

Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos Gram-positivos que comparten ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. En general, poseen una forma bacilar o cocoide, tolerantes al ácido, no esporulados, no pigmentados e inmóviles. Son anaerobios aerotolerantes y auxótrofos, es decir, requieren factores de crecimiento complejos que incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Carecen de ciclo de Krebs, por lo que generan ATP mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados. La característica común a todas las BAL es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de su metabolismo fermentativo de azúcares (Dellaglio et al., 1994), variando el patrón de fermentación en función de la fuente de carbono y de diferentes parámetros fisicoquímicos del ambiente. Asimismo, poseen una significativa capacidad proteolítica y lipolítica con aplicación tecnológica en el desarrollo y modulación de propiedades sensoriales de interés. El grupo de las BAL pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y comprende 9 familias. Los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* (la especie *thermophilus*), *Lactococcus* y *Leuconostoc* son los que se encuentran normalmente en los cultivos lácticos iniciadores utilizados en la industria (Fox et al., 2000; Hassan y Frank, 2001). El uso de BAL en la elaboración de productos fermentados está considerado como "GRAS" (*Generally Recognized As Safe*, generalmente reconocido como seguro), permitiéndose su utilización para tal fin, y muchas cepas han recibido el status "QPS" (*Qualified Presumption of Safety*, presunción cualificada de seguridad) por la EFSA (*European Food Safety Authority*, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (Bourchidon et al., 2012).

La aplicación biotecnológica de las BAL en la industria alimentaria está documentada. Se aplican en fermentaciones de alimentos y bebidas, formación de aromas y sabor, bioconservación de alimentos, producción de exopolisacáridos (Welman and Maddox, 2003), producción de bacteriocinas (de Vuyst and Leroy, 2007), producción de ingredientes (Hugenholtz et al., 2002), producción de químicos como el ácido láctico, polioles y vitamina B (Kwon et al., 2001; Wisselink et al., 2002; Burgess et al., 2004).



La aplicación más ampliamente extendida de las BAL es su uso como cultivos iniciadores o *starters* en la industria láctea (quesos, yogur, kefir), en la elaboración de productos cárnicos fermentados (chorizo, salami, salchicha), vegetales (aceitunas, chucrut, pepino) y cereales (kimchi, bushera o pozol). Además, son aplicados como cultivos adjuntos para mejorar las características organolépticas de productos, como por ejemplo, mejorar la textura de yogur mediante la síntesis de exopolisacáridos, acelerar la maduración y favorecer aromas y sabores en quesos mediante proteólisis, o controlar la fermentación maloláctica del vino (Bintsis 2018).

Otro de los usos de BAL con mayor impacto en la industria alimentaria es su efecto bioprotector gracias a la síntesis de bacteriocinas (Silva et al., 2018). Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias con efecto bactericida o bacterioestático sobre determinados grupos bacterianos. El ejemplo por excelencia es la bacteriocina nisina, producida por el microorganismo *Lactococcus lactis*, y que actualmente es utilizada como bioconservante en al menos 50 países en distintos productos alimentarios (EFSA, 2017). Otros ejemplos de bacteriocinas que se han aplicado experimentalmente en alimentos son la lacticina 3147, reuterina, sakacina M, curvacina A, lactocina AL705, pediocina PA-1/AcH, plantaricina A, entre otras (Ramu et al., 2015; Johnson et al., 2018; Singh, 2018).

Las microalgas o algas microscópicas se encuentran en la base de la cadena alimentaria dentro de los ecosistemas acuáticos. Sus características metabólicas permiten la adquisición y transformación de agua y CO₂, con luz solar, en compuestos orgánicos complejos que secretan al exterior o que mantienen en su citoplasma para mantener la estructura celular y llevar a cabo funciones fisiológicas. Son microorganismos con gran capacidad de adaptación a distintas condiciones de estrés como altas o bajas temperaturas, sequía, salinidad, fotooxidación, falta de oxígeno o presión osmótica. Por otro lado, combinan propiedades metabólicas de organismos eucariotas (capacidad fotosintética) y procariontes (elevadas tasas de crecimiento y capacidad de producir y acumular metabolitos), además de ser relativamente fácilmente cultivables en biorreactores de gran volumen (Sánchez et al., 2008). Todas estas características respaldan a las microalgas como potentes herramientas biotecnológicas para ser explotadas como biorreactores en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Las especies de microalgas con mayor aplicación en la industria alimentaria pertenecen a los géneros *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Chlorella* y *Spirulina*. Algunos ejemplos concretos de su aplicación son su uso en alimentación animal, como colorantes, antioxidantes, compuestos antimicrobianos y como suplemento alimentario por su elevado valor nutricional (Pulz and Gross, 2004; Richmond, 2004; Guedes et al., 2011). La aplicación de microalgas para usos concretos en la industria está respaldado por le EFSA



(ver Tarea 2.1.).

Como conclusión, aunque muchos microorganismos están siendo actualmente aprovechados por la industria, la mayor parte de la biodiversidad existente en nuestro planeta es aún desconocida, y representa una fuente altamente rica de recursos biológicos de interés para ser utilizados de forma sostenible, hecho que ha servido de base en el planteamiento de este proyecto.

Características metabólicas de los microorganismos de interés

De la información recopilada se ha obtenido una descripción de las características genéticas, fisiológicas y metabólicas que son deseables en los microorganismos con potencial aplicación en la industria alimentaria, incluyendo bacterias y microalgas:

- Clasificación taxonómica aceptada en el contexto regulatorio.
- Elevada tasa de crecimiento: esto reduciría coste en medios de cultivo y nutrientes necesarios para el cultivo de los microorganismos. Reduciría asimismo el tiempo necesario para obtener una concentración elevada de masa microbiana.
- Condiciones de cultivo de bajo coste: temperaturas medias (no extremas), medios de cultivo de bajo coste y/o de fórmula sencilla.
- Facilidad de propagación y de conservación, y estabilidad durante su producción y almacenamiento en los formatos preparados.
- Ausencia de problemas durante el escalado.
- Robustez tecnológica: resistencia a condiciones de estrés tecnológico (temperatura elevada, congelación, liofilización, secado, ataque por bacteriófagos, presencia de compuestos antimicrobianos).
- Producción de metabolitos de interés.
- Ausencia de factores de patogenicidad o actividad tóxica (por ejemplo, la producción de aminas biógenas).
- Ausencia de genes de resistencia a antibióticos.
- Estabilidad genética.

Metabolitos de interés con aplicabilidad biotecnológica/industrial

A continuación, se recopila una lista de productos del metabolismo microbiano de bacterias y microalgas con potencial aplicación:

- Compuestos aromatizantes/saborizantes: ácidos, acetaldehído, diacetilo, alcoholes, cetonas,

entre otros. La mayoría de estos metabolitos son producto de la actividad enzimática (proteolítica y/o lipolítica) de los microorganismos.

- Compuestos antimicrobianos: ácidos, diacetilo, bacteriocinas. Estos metabolitos contribuyen a la autoprotección y dominancia sobre la microbiota competitiva y, por lo tanto, a la conservación del producto.
- Compuestos texturizantes: exopolisacáridos
- Compuestos *health-promoting*: exopolisacáridos
- Compuestos antioxidantes: ficocianina, astaxantina
- Compuestos colorantes: β -caroteno, fucoxantina

Selección de nichos/matrices alimentarias como fuente de microorganismos

Las matrices alimentarias en las que se encuentran BAL en mayor proporción son aquellas en las que el producto final es fruto de un proceso fermentativo, fruto de la actividad metabólica de estos microorganismos. Estas son: productos lácteos fermentados, productos cárnicos crudo-curados y bebidas fermentadas.

Con el objeto de obtener aislados naturales, en la selección de matrices alimentarias se evitaron aquellos productos cuya producción sea derivada de la adición de *starters* comerciales.

El estudio bibliográfico realizado indicó que los nichos alimentarios donde sería más probable encontrar BAL son mayoritariamente los productos fermentados, encontrándose en menores niveles en otras matrices. En base a esto, se decidió focalizar el muestreo en los siguientes productos:

- productos lácteos fermentados
- productos lácteos frescos
- bebidas fermentadas
- productos cárnicos fermentados
- productos cárnicos frescos
- productos pesqueros
- productos hortofrutícolas

Optimización de condiciones de cultivo de microorganismos en el laboratorio

El análisis bibliográfico de los ecosistemas bacterianos en matrices alimentarias apuntó que, en cada ambiente o nicho específico, los microorganismos se multiplican utilizando las fuentes de nutrientes disponibles y en las condiciones ambientales específicas de ese nicho. Por tanto, en una matriz

alimentaria concreta será probable encontrar microorganismos adaptados a esas condiciones y que fisiológicamente posean actividades enzimáticas concretas que les hagan dominar en ese ambiente (Brooks et al., 2011). A priori, y en base a esto, las condiciones idóneas para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos presentes en las matrices alimentarias serían aquellas que simularan el alimento per sé, teniendo en cuenta la temperatura de fabricación y conservación del alimento, la actividad de agua a lo largo de su vida útil, el pH y los nutrientes disponibles.

Sin embargo, el objetivo planteado es cultivar los microorganismos presentes en los alimentos en condiciones de laboratorio con el objeto de obtener cultivos puros, identificarlos y buscar la vía de aplicación más eficiente en el contexto biotecnológico. Aunque las condiciones de laboratorio por defecto se alejan de las condiciones naturales del alimento, se siguieron las pautas establecidas por estándares internacionales para el crecimiento de BAL (ISO 15214:1998).

Respecto a las microalgas, aunque su potencial biotecnológico está documentado y se encuentra actualmente en estudio, su producción a gran escala aún no está asentada en la industria agroalimentaria. Esto es debido, entre otras causas, a la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo requeridas para cada especie (Guedes et al., 2011). El óptimo crecimiento de las microalgas y, por extensión, la producción de biomasa y metabolitos de interés, depende íntimamente de la especie, composición del medio de cultivo, condiciones ambientales y montaje de los biorreactores. Así, la tecnología para el cultivo de microalgas aún se encuentra en desarrollo con objeto de optimizarla para incrementar rendimientos y reducir costes de producción.

La optimización de las condiciones de cultivo consistirá en el ajuste de los siguientes parámetros: pH, aireación, agitación, radiación, salinidad, acorde a cada especie cultivada.

Brevemente, se definieron dos grupos de microorganismos de interés:

- Bacterias ácido lácticas (BAL), grupo bacteriano con mayor aplicación en la industria alimentaria.
- Microalgas, como nueva fuente de recursos biológicos.

Tarea 1.2. Aislamiento de bacterias y microalgas y creación de un banco biológico

Selección de matrices para aislamiento de bacterias

Se analizaron para el aislamiento y selección de microorganismos, bacterias ácido lácticas (BAL) fundamentalmente, de diferentes matrices alimentarias pertenecientes a distintos sectores. En todos los casos las matrices seleccionadas deberían poseer microbiota presente de forma natural. En unos casos estos productos se correspondían con materias primas naturales, no sometidas a ningún

tratamiento tecnológico que pudiera disminuir la microbiota natural presente, este sería por ejemplo el caso de la leche cruda no sometida a tratamiento de pasteurización. Otro tipo de productos, en su mayoría, se correspondieron con productos fermentados, donde los microorganismos presentes son los responsables de que los procesos fermentativos tengan lugar y por tanto constituyen una fuente de microorganismos con potencial tecnológico para diferentes procesos alimentarios. En la selección de productos fermentados se evitó aquellos en los que para su elaboración se usaban de manera habitual cultivos iniciadores o “starters” dando prioridad a aquellas matrices alimentarias sometidas a fermentación espontánea, de manera que los propios microorganismos naturalmente presentes fueran los responsables de que los procesos fermentativos tuvieran lugar.

Finalmente, las matrices alimentarias que fueron empleadas como fuente de bacterias ácido lácticas, se resumen a continuación.

Se incluyeron en el estudio un total de 86 matrices alimentarias de las que se obtuvieron BAL y la obtención finalmente de un total de 365 aislados bacterianos para constituir el biobanco.

Obtención de aislados bacterianos

Los análisis microbiológicos fueron realizados de acuerdo a las premisas descritas en la norma ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination”. Mientras que el procesado de las muestras para la realización de los análisis microbiológicos se llevó a cabo en base a las directrices definidas en las normas de la serie ISO 6887:2017 “Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination”.

Al inicio del análisis se tomaron porciones representativas de 10 g de cada una de las muestras a analizar, dispensando posteriormente 90 ml de agua de peptona tamponada estéril (PW) para preparar la dilución madre 1:10, requisito previo en la preparación de muestras para el análisis microbiológico. Las muestras así preparadas fueron homogeneizadas en el homogeneizador de paletas durante 2 min a temperatura ambiente. Para la realización de los recuentos microbianos, se prepararon diluciones decimales de las muestras. Las diluciones decimales seriadas son suspensiones o diluciones obtenidas al mezclar un volumen determinado en un volumen nueve veces superior de diluyente y repitiendo esta operación con diluciones sucesivas, hasta llegar a un nivel de dilución adecuado para el recuento. Las determinaciones microbianas cuantitativas se realizaron mediante siembra en masa.

A partir del banco de diluciones se realizaron siembras en superficie en dos medios de cultivo: un medio de cultivo general (PCA, *Plate Count Agar*) que permite el crecimiento de la mayoría de



microorganismos, y en medio selectivo para BAL (MRS, *Man Rogosa Sharpe*) que favorece el desarrollo de este grupo microbiano. Las placas se incubaron durante 24-72 horas a 30 °C y 37 °C respectivamente.

Sobre estas placas se realizó el recuento total de microorganismos (ufc/g), lo que permitió conocer la carga microbiana original de los alimentos analizados. El recuento en PCA permitió obtener la concentración de aerobios mesófilos. El recuento en MRS permitió obtener la concentración de flora láctica.

Como ya venía siendo apuntado, en es estos productos donde las BAL juegan un papel tecnológico fundamental en su elaboración y los procesos tecnológicos que se desarrollan, manteniéndose viables a lo largo del proceso de fermentación y también de maduración. Las bacterias ácido lácticas en estos procesos son las encargadas de que los procesos fermentativos tengan lugar, mediante la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, produciéndose una bajada de pH y como consecuencia la coagulación proteica. Esta bajada de pH ejerce un efecto conservador evitando que se desarrolle microbiota alterante o incluso patógena que pudiera estar potencialmente presente. Además, durante el proceso de maduración, se producen diferentes compuestos orgánicos responsables de las propiedades sensoriales de los productos u otros compuestos de interés con capacidad antimicrobiana (bacteriocinas) o antioxidantes entre otros.

Una vez analizadas las diferentes matrices alimentarias y tras el recuento de las BAL obtenidas en placas de MRS, se realizó una inspección visual de las placas atendiendo al fenotipo de las colonias (tamaño, color, diámetro, número aproximado de aislados similares, etc.). A partir de la mayor dilución con recuento obtenida y para cada matriz analizada, se seleccionaron al azar y siempre que era posible, 5 colonias morfológicamente diferentes. La selección de colonias fenotípicamente diferentes aumenta la probabilidad de aislar microorganismos diferentes en cuanto a género, especie e incluso cepa, contribuyendo a la diversidad del biobanco.

Los criterios fenotípicos establecidos para llevar a cabo la selección de colonias fueron los siguientes:

- Tamaño: muy grande, grande, mediano, pequeño o muy pequeño.
- Color: blanco, blanquecino, blanco brillante, amarillo, amarillento, gris, grisáceo.
- Forma: circular, puntiforme, irregular, rizoide o fusiforme.
- Borde: liso, ondulado, lobulado, filamentoso, rugoso.

Cada una de las colonias seleccionadas y en base a los criterios mencionados, se aislaron mediante cultivo en superficie en medio MRS con el fin de obtener un cultivo puro y viable. Las placas así sembradas e cultivaron durante 24-72 horas a 37 °C según el caso. Esta etapa es fundamental, para

obtener un cultivo en el que únicamente esté presente el microorganismo seleccionado y aislado. Este cultivo puro se considerará el cultivo inicial del trabajo, entendido como primer pase de cada una de las cepas aisladas.

Para comprobar la viabilidad a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cada uno de los aislados y su pureza, se descongeló un vial de cada microorganismo conservado y se sembró asépticamente en medio sólido MRS. El periodo de incubación fue de entre 24-48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez comprobado el stock de cada uno de los aislados, se prepararon cepas de trabajo de cada microorganismo para la realización de la batería de pruebas planteadas en el desarrollo del proyecto aquí descrito.

Selección de matrices para aislamiento de microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos que tienen clorofila y pigmentos carotenoides, lo que las convierte en productores primarios de la cadena alimenticia acuática. En su mayoría son organismos fotosintéticos, unicelulares, filamentosos que forman cadenas, colonias o cenobios. Se caracterizan por habitar diferentes hábitats acuáticos donde existan condiciones simples para crecer.

Aislamiento de microalgas

A partir de las muestras de agua se procedió al aislamiento de una única unidad algal, siguiendo la filosofía del aislamiento de cultivo bacteriano. Para estudios posteriores se hace necesario el aislamiento puro de un único organismo.

En ningún caso se obtuvo cultivo en tubo para el aislamiento de una única especie microalgal.

Debido a los resultados obtenidos se procedió a utilizar microalgas procedentes de diferentes socios tecnológicos. De esta forma fue posible en tareas posteriores evaluar el potencial biotecnológico de las microalgas ensayadas.

Creación y mantenimiento del biobanco

El aislamiento y conservación en stock de microorganismos ha conducido a la creación de un banco biológico en el laboratorio de ASINCAR. Para mantener la trazabilidad de las muestras y los aislados derivados de ellas, el biobanco lleva asociado un registro en el que se especificaron: código del aislado, fecha de almacenamiento, matriz alimentaria de origen y código, empresa fabricante del alimento origen y lote, código de proyecto asociado, id bioquímico, tipificación genética, otras propiedades. El código asociado a cada aislado contiene el código de registro de las muestras analíticas para mantener



la trazabilidad.

Las especies de microalgas crecidas por los colaboradores están incorporadas al cepario de ASINCAR.

Tarea 1.3. Caracterización fisiológica y tipificación genética de los aislados

La caracterización de la fisiología y el metabolismo de microorganismos almacenados en formato ultracongelado conlleva unas etapas de reacondicionamiento previas a la realización de otros análisis. Esta revivificación de los microorganismos aislados se llevó a cabo mediante la descongelación progresiva de un criovial que posteriormente se utilizó para inocular medio de cultivo líquido y realizar una siembra en estría en placa para comprobar que no haya sufrido modificaciones.

Determinación de parámetros de crecimiento de los aislados bacterianos

La obtención y análisis del perfil de la curva de crecimiento de un microorganismo en condiciones específicas indica la capacidad que tiene ese microorganismo de adaptarse y multiplicarse en ese ambiente. Con vistas a aplicar y explotar la actividad metabólica de microorganismos desde un punto de vista tecnológico, se busca que el microorganismo sea capaz de multiplicarse en el menor tiempo posible, alcanzando un nivel de biomasa elevado y utilizando nutrientes específicos, preferiblemente de bajo coste.

La base para obtener una curva de crecimiento consiste en la medida de dos parámetros en el tiempo:

- Densidad óptica a una longitud de onda 550 nm en un espectrofotómetro (OD₅₅₀)
- Recuento de viables totales en medio de cultivo general.

En el laboratorio de ASINCAR hemos puesto a punto un método tipo HTS (*High Throughput System*) que permite la obtención de curvas de crecimiento combinando un elevado número de condiciones de crecimiento diferentes en el mismo ensayo, optimizando así recursos y tiempo. El sistema consistió en la inoculación y seguimiento del crecimiento microbiano en placas de microtitulación de 96 pocillos.

En paralelo a las medidas en el espectrofotómetro, se realizó un recuento de la concentración de microorganismo (ufc/ml) a lo largo del tiempo de incubación mediante siembra de diluciones en placa.

La obtención de las curvas de crecimiento permitió definir las fases de la curva de crecimiento de los microorganismos:

- Fase lag o de latencia, en la que los microorganismos no se multiplican y se están adaptando a las condiciones ambientales.
- Fase log o logarítmica, en la que los microorganismos se multiplican de forma exponencial. La



pendiente de la zona lineal de la fase logarítmica permitió calcular la tasa de crecimiento (μ), tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) y tiempo de generación (g).

- Fase estacionaria, en la que el número de microorganismos que se generan por división es igual al número que muere.
- Fase de muerte, en la que mueren más microorganismos de los que se reproducen por ausencia de nutrientes, reduciéndose la concentración de microorganismo en el medio.

Entre los criterios de selección de microorganismos con interés tecnológico se han seleccionado aquellos metabólicamente más activos en combinación con el resto de factores de selección. Por otro lado, estos datos son de ayuda para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos que serán seleccionados finalmente.

Perfil bioquímico y enzimático de los aislados bacterianos

El metabolismo celular es el proceso que permite el desarrollo (división y multiplicación) de los microorganismos y que consiste en la incorporación y transformación de sustratos específicos en productos específicos que sirven como fuente de energía y de elementos funcionales estructurales. Estas transformaciones bioquímicas son llevadas a cabo por enzimas (catalizadores biológicos de naturaleza proteica) con funciones específicas.

El análisis del perfil enzimático de un microorganismo permite identificar sus capacidades metabólicas, es decir, determinar qué tipo de sustratos es capaz de procesar o metabolizar. Esta información es de suma importancia con vistas a aplicar y explotar un microorganismo de forma industrial.

La capacidad metabólica de un microorganismo debe ir en consonancia con su capacidad de crecimiento, es decir, los microorganismos que buscamos en el proyecto REBIOAL deben cumplir estas dos premisas con vistas a ser aplicados de forma óptima en la industria:

- Tasa de crecimiento elevada en condiciones de bajo coste
- Capacidades metabólicas de interés

Un sistema eficiente de analizar el perfil bioquímico y *pool* enzimático de un microorganismo es utilizar el sistema miniaturizado API (Biomerieux). En base al perfil enzimático, este sistema permite identificar el microorganismo testado con un determinado grado de identidad.

Teniendo en cuenta que la previsión era obtener microorganismos pertenecientes al grupo de las BAL capaces de crecer en MRS, se escogió la galería API 50CHL (Biomerieux), diseñada para la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos. En los casos en que se dio un perfil bioquímico

con un bajo porcentaje de identificación, se utilizaron otras galerías API diseñadas para identificar otros grupos de microorganismos.

Se ha llevado a cabo el perfil bioquímico de los aislados bacterianos. Con la información extraída del análisis, se determinó la capacidad metabólica de los microorganismos, sirviendo de nuevo esta información para la puesta a punto de su cultivo y escalado.

Tipificación genética de los aislados bacterianos

Mediante la tipificación genética se consigue la identificación precisa de género y especie de microorganismos. La secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S es una técnica universalmente extendida en los laboratorios de microbiología y se ha escogido para poder asignar identidad genética a todos los aislados incluidos en el biobanco creado.

La tipificación genética es un proceso consistente en las siguientes etapas: 1- Extracción de ADN genómico; 2-Reacción de amplificación del gen de interés mediante la técnica de PCR; 3-Secuenciación del producto de PCR; 4-Edición de la secuencia de nucleótidos obtenida y análisis bioinformático.

Se han llevado a cabo las extracciones de ADN a partir de los aislados depositados en el biobanco.

La pureza y concentración de las muestras de ADN obtenidas se comprobó mediante su análisis en un espectrofotómetro de ADN. Este es un paso crítico ya que una eficiente secuenciación depende de un ADN de calidad en elevada concentración. A partir de las muestras de ADN extraídas que se conservaron congeladas a -20°C se realizó la secuenciación del gen ARN 16S con objeto de identificar genéticamente los microorganismos aislados.

Caracterización de aislados de microalgas

Como se indicó anteriormente se ha trabajado con especies de microalgas procedentes de colaboradores biotecnológicos puesto que no ha sido posible el aislamiento y caracterización a partir de nichos naturales.

Acorde a la revisión bibliográfica sobre su potencial aplicación en la industria agroalimentaria sean escogido los siguientes géneros y/o especies:

- *Dunaliella salina*
- *Haematococcus pluvialis*
- *Tetraselmis chuii*
- *Chlorella vulgaris*
- *Spirulina sp.*



Cada uno de los géneros y especies son verificados mediante el uso de la microscopía óptica en base a sus características morfológicas.

HITO 2. Evaluación del potencial biotecnológico de los microorganismos del biobanco

En esta evaluación se plantean el análisis del contexto regulatorio que hace que un microorganismo o sus productos del metabolismo sean aplicables de forma segura en alimentos. Respecto a las propiedades biotecnológicas de interés el proyecto se focaliza en dos características:

- La capacidad bioconservante de los microorganismos, es decir, su capacidad para producir compuestos con actividad antimicrobiana (bacteriolítica o bacterioestática) que inhiba el crecimiento de microorganismos indeseados en el contexto alimentario, como son patógenos y alterantes.
- La capacidad de producir metabolitos que mejoren las propiedades nutricionales y/o sensoriales de los alimentos en los que se apliquen.

Tarea 2.1. Evaluación de la aplicabilidad de los microorganismos en industria alimentaria

Tras el estudio final de los requisitos establecidos para la aplicación de microorganismos en industria alimentaria, los aislados deben ser considerados como GRAS (*Generally Recognised as Safe*), así como la lista QPS (*Quality Presumption of Safety*) emitida por la EFSA (*European Food Safety Agency*). Hemos concluido que el uso de BAL en la elaboración de productos fermentados está considerado como “GRAS” (*Generally Recognized As Safe*, generalmente reconocido como seguro), permitiéndose su utilización para tal fin, y muchas cepas han recibido el status “QPS” (*Qualified Presumption of Safety*, presunción cualificada de seguridad) por la EFSA (*European Food Safety Authority*, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

Así, una vez identificados y caracterizados los microorganismos bacterianos aislados y determinada su posible capacidad tecnológica, se determina en cada caso su viabilidad para empleo en matrices alimentarias.

Por otro lado, a fecha 1 de enero de 2018 se aplica el nuevo Reglamento EU 2015/2283 sobre *Novel Foods* o nuevos alimentos, que sustituye al Reglamento EC 258/97 y EC 1852/2001, y que también se ha analizado para evaluar la aplicabilidad de microorganismos en alimentos y de microalgas. Además, y en relación a reglamento se hace énfasis en que los productos alimenticios deben ser seguros y saludables y por tanto debe ser autorizado su consumo en la Unión Europea. Tanto los microorganismos, los derivados de los microorganismos, al igual que las microalgas y sus derivados, entrarían en la aplicación



de la legislación comunitaria sobre *Novel Food*. Se hizo una prospectiva bibliográfica de los reglamentos de autorización de comercialización de nuevos alimentos en base al artículo 10 del Reglamento EU 2015/2283.

En base a la información obtenida sobre el grado de aplicabilidad y explotación de microorganismos/metabolitos en alimentos, junto con los datos de secuenciación, se evaluó si los microorganismos depositados en el biobanco cumplen con los requisitos indicados.

Respecto a las propiedades biotecnológicas de interés el proyecto se focaliza en dos características:

- La capacidad bioconservante de los microorganismos, es decir, su capacidad para producir compuestos con actividad antimicrobiana (bacteriolítica o bacterioestática) que inhiba el crecimiento de microorganismos indeseados en el contexto alimentario, como son patógenos y alterantes. El estudio de la capacidad antimicrobiana se centró en la prospectiva de las bacterias ácido lácticas aisladas.
- La capacidad de producir metabolitos que mejoren las propiedades nutricionales y/o sensoriales de los alimentos en los que se apliquen y en base a los datos encontrados en relación a la aplicabilidad del reglamento de *Novel Food* y sus autorizaciones.

De todos los aislados obtenidos y tras la evaluación de su potencial biotecnológico, los trabajos finalmetne se centraron en dos cepas microbianas que mostraron las mejores perspectivas en cuanto a su capacidad tecnológica, fundamentalmente su capacidad bioconservante, antagonista frente a *Listeria monocytogenes*.

Ambas cepas fueron depositadas en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) siguiendo el Tratado de Budapest, reconocimiento internacional del depósito de microorganismos y procedimiento a seguir en materia de patentes pare este caso. La transmisión de un microorganismo debe realizarse a una autoridad internacional de depósito que es quien lo recibe y lo acepta, en este caso la CECT.

Las cepas depositadas fueron:

- *Lactobacillus plantarum* CECT 9747.
- *Lactobacillus plantarum* CECT 30051.

Tarea 2.2. Evaluación de la capacidad antimicrobiana

Durante las primeras etapas del desarrollo de la Tarea 1.2., se llevó a cabo un estudio documental sobre los requisitos en el contexto regulatorio de la aplicabilidad de cultivos microbianos y/o sus metabolitos

en alimentos.

La conclusión es que, a pesar del objetivo común de regular el uso seguro de cultivos microbianos en alimentos, no existe una regulación universal que especifique los requisitos a aplicar, existiendo por ejemplo regulaciones diferentes a nivel europeo y americano.

En Europa, la *General Food Law Regulation* asegura la protección de la vida humana y los intereses de los consumidores en lo que a alimentos se refiere. Los cultivos microbianos utilizados directamente en la producción de alimentos son considerados ingredientes alimentarios, y como tales, deben cumplir con los requisitos establecidos en la ley mencionada (nº 178/2002 art 14).

Asimismo, se han estudiado los requisitos establecidos para que la aplicación de microorganismos se considere GRAS (*Generally Recognised as Safe*), así como la lista QPS (*Quality Presumption of Safety*) emitida por la EFSA (*European Food Safety Agency*). Hemos concluido que el uso de BAL en la elaboración de productos fermentados está considerado como “GRAS” (*Generally Recognized As Safe*, generalmente reconocido como seguro), permitiéndose su utilización para tal fin, y muchas cepas han recibido el status “QPS” (*Qualified Presumption of Safety*, presunción cualificada de seguridad) por la EFSA (*European Food Safety Authority*, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (Bourchidon et al., 2012).

Por otro lado, a fecha 1 de enero de 2018 se aplica el nuevo Reglamento EU 2015/2283 sobre *Novel Foods* o nuevos alimentos, que sustituye al Reglamento EC 258/97 y EC 1852/2001, y que también se ha analizado para evaluar la aplicabilidad de microorganismos en alimentos.

Los microorganismos poseen sistemas de defensa para protegerse frente la acción de otros microorganismos que puedan encontrar en su mismo medio y que puedan suponer una amenaza, ya sea por ser competidores por los nutrientes disponibles o porque sintetizan algún compuesto tóxico.

Esta capacidad antimicrobiana o inhibitoria intrínseca puede ser aprovechada desde un punto de vista biotecnológico. En ese sentido, en el proyecto REBIOAL se buscó identificar microorganismos que sintetizan algún metabolito que inhiba el desarrollo de otros microorganismos, en concreto patógenos que encontramos a lo largo de la cadena alimentaria y que puedan suponer un problema de seguridad alimentaria.

Además, cabe señalar, que la obtención de compuestos antimicrobianos como son las bacteriocinas, puede resultar una estrategia viable a medio plazo para evitar el uso de antibióticos en determinados contextos.



En el laboratorio se ha puesto a punto la metodología para evaluar la capacidad antimicrobiana de microorganismos mediante un test de difusión en agar. Este método se basa en la difusión de un posible compuesto antimicrobiano, producido por las bacterias lácticas aisladas, a través de medio de cultivo semisólido en el que se cultivan los microorganismos patógenos, y donde aparece un halo de inhibición alrededor de la muestra analizada en caso de que el microorganismo de interés produzca una bacteriocina o compuesto antimicrobiano que inhiba el patógeno testado.

En la puesta a punto del ensayo se seleccionaron dos cepas patógenas: *Salmonella enterica* CECT 4594 y *Listeria monocytogenes* CECT 935.

La nisina empleada como control es de carácter comercial y para su preparación fue diluida en ácido acético concentrado al 0,05 %.

Gracias a los ensayos de inhibición en placa se detectaron microorganismos del biobanco con capacidad inhibitoria, lo que les hacía buenos candidatos para su aplicación bioconservante, bien mediante el uso de los microorganismos aislados directamente, o bien mediante el aislamiento y caracterización de los productos derivados de su actividad metabólica y que pudieran ser de interés.

Tras la evaluación de los aislados del biobanco se ha obtenido caracterizar 10 microorganismos con actividad inhibitoria con un diámetro por encima de 8 mm, bien para *Salmonella enterica* o bien para *Listeria monocytogenes*. En un caso se ha detectado actividad inhibitoria para ambos patógenos.

Finalmente, de todos los aislados analizados, se encontraron dos cepas con muy buenas perspectivas en cuanto a su aplicabilidad y explotación biotecnológica. Los trabajos se centraron finalmente en estas dos cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas y con actividad anti-*Listeria*. Esas cepas fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo:

- *Lactobacillus plantarum* CECT 9747
- *Lactobacillus plantarum* CECT 30051

Se midieron los diámetros de inhibición en todos los casos para determinar la capacidad inhibitoria in vitro del aislados frente al patógeno.

Tarea 2.3. Evaluación de la capacidad de producción de metabolitos de interés

La producción de metabolitos por microorganismos con aplicabilidad en la industria alimentaria/biotecnológica debe ser eficiente. Esto significa que:

- Las condiciones de producción de los metabolitos, que corresponden a las condiciones de



crecimiento de los microorganismos, deben ser económicamente rentables.

- El nivel de producción de metabolitos dependerá del nivel de biomasa microbiana generada, buscándose que sea la máxima posible en el menor tiempo.
- Los metabolitos de interés deben ser estructuralmente y funcionalmente estables en las condiciones de producción, es decir, deben mantener su actividad y estructura a lo largo del tiempo.

Para cumplir estos requisitos, la optimización de las condiciones de cultivo es un punto crucial. Esta evaluación para optimizar la síntesis de metabolitos específicos se está llevando a cabo actualmente basándonos en:

- Prospectiva bibliográfica (realizada en la Tarea 1.1.), que sentó el punto de partida para seleccionar condiciones de cultivo y metabolitos de interés según el tipo de microorganismos.
- El análisis de las capacidades enzimáticas de los aislados (Tarea 2.1.) que sirve como indicativo de qué tipo de metabolitos podrían sintetizar.

En base a esto, algunos de los metabolitos de interés industrial que se pretenden obtener a partir de los microorganismos serían:

- Bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos
- Antioxidantes
- Colorantes

De forma general, estos metabolitos son secretados al exterior celular durante el crecimiento y desarrollo de las actividades metabólicas llevadas a cabo por bacterias y microalgas. En este contexto, aunque no se descartan otras metodologías, se ha decidido utilizar la centrifugación como método para separar y purificar los metabolitos de interés, por ser una técnica sencilla y poco costosa.

La producción de metabolitos a partir de microalgas está muy estrechamente ligada a las condiciones de cultivo y a la disponibilidad de nutrientes. Es por ello que hay numerosos parámetros que ajustar; intensidad de luz, temperatura, nutrientes y salinidad entre otros. Entre los nutrientes se plantea en futuros experimentos exponer las microalgas a ambientes limitados de nitrógeno, ya que esto supone una disminución de clorofila y por tanto una tendencia a acumular pigmentos carotenoides como respuesta.

HITO 3. Escalado de la producción de metabolitos por los microorganismos del biobanco.



Tarea 3.1. Puesta a punto del biorreactor

Analizada la potencialidad biotecnológica de los aislados, se planteó el escalado con el fin de obtener una elevada concentración de los metabolitos de interés.

El escalado de los microorganismos de interés en un biorreactor BiostatA (Sartorius). El biorreactor tiene una vasija de 1 L de capacidad, con diferentes sondas de control y accesorios, una torre de bombeo y alimentación y un PC para el control de parámetros.

En el cultivo en el biorreactor se trató de obtener el mayor rendimiento de biomasa y en paralelo el mayor rendimiento de los metabolitos de interés, en el caso que nos ocupa y tras el desarrollo de las tareas anteriormente descritas, la producción de bacteriocinas como bioconservantes naturales.

En una primera etapa se desarrollaron pruebas con las distintas sondas que controlan los parámetros de crecimiento (sonda de pH, temperatura y sonda de nivel), así como pruebas de ciclos de autoclavado del equipo.

Hay varios parámetros clave en el cultivo de microorganismos que es necesario adecuar en cada caso:

- Los nutrientes aportados con los medios de cultivo.
- La temperatura de incubación.
- Se ajustó la velocidad de agitación-aireación.
- El nivel de espuma.
- La presión de CO₂ y O₂.

Una vez ajustados los parámetros y para la preparación de los cultivos, se llena la vasija del biorreactor con cultivo recién preparado y se acopla la placa de accesorios con todas las sondas autoclavables. Se realizó el tratamiento de esterilización en autoclave. Previamente a la preparación de cualquier cultivo se comprobó que se obtenían condiciones de esterilidad.

Pruebas de optimización para el crecimiento de los microorganismos

Determinación de la evolución del pH

Previo al cultivo y para cada uno de los microorganismos de interés en el biorreactor se hacía necesario determinar las condiciones óptimas de crecimiento para poder parametrizarlas.

El trabajo, una vez realizado la selección inicial de microorganismos, se centró en las dos cepas de la especie *Lactobacillus plantarum* que mayores perspectivas para un futuro uso tecnológico presentaban.

Se determinó la evolución del pH en cultivo previo al escalado.



Determinación de la concentración de inóculo para el escalado

Otro de los parámetros a determinar previo al escalado es la cantidad de inóculo necesaria de partida para que el cultivo en biorreactor tenga el rendimiento esperado. Es por ello que se ensayaron dos concentraciones de inoculación diferentes, determinando pH y concentración microbiana (en base a la densidad óptica, DO) a lo largo del tiempo.

El cultivo de las BAL seleccionadas se vió favorecido en el biorreactor con un inóculo inicial a una concentración del 0,01 %.

Determinación de la temperatura de crecimiento

Otro de los factores claves en la proliferación microbiana es el perfil de temperatura óptima. Se hicieron ensayos de proliferación microbiana a 8, 20, 30 y 37 °C, determinando a lo largo del tiempo la proliferación microbiana en base a la DO.

La temperatura óptima de crecimiento de ambos cultivos fue de 37 °C.

Tarea 3.2. Cultivo escalado de los microorganismos seleccionados

A medida que se iban obteniendo los resultados descritos en el desarrollo de la Tarea 3.1. se iban ajustando las condiciones de crecimiento de los microorganismos de interés.

Se determinó el medio MRS como medio de cultivo para un mayor rendimiento, partiendo de una concentración inicial de inóculo al 0,1 %. A partir de las 24 horas de cultivo, el pH se estabilizaba y la temperatura óptima de proliferación se situaba en ambos casos entre 30-37 °C. Se establecieron condiciones de cultivo de aerobiosis.

En esta etapa se comenzó con los cultivos escalados. Se planteó hacer es escalado a diferentes temperaturas para determinar si la temperatura no solo influía en la proliferación bacteriana, sino también en la producción de bacteriocinas como compuestos de interés.

Así se plantearon cultivos a diferentes temperaturas en el escalado en el biorreactor, en este caso y para disponer de los datos más precisos, además de determinar la densidad óptica de los cultivos, se hizo recuento microbiano de cultivo en placa.

Otro de los parámetros a determinar fue el rendimiento de producción del compuesto de interés, en el caso que nos ocupa, bacteriocinas para la bioconservación. A partir de los cultivos obtenidos a diferentes temperaturas se hicieron ensayos de inhibición en placa sobre el microorganismo *Listeria*



monocytogenes, sensible a las bacteriocinas producidas por las dos cepas aisladas de *Lb. plantarum* y con interés tecnológico.

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de inhibición:

- Ensayos de inhibición con el cultivo en biorreactor directamente.
- Ensayos de inhibición con el sobrenadante de los cultivos.

Finalmente, el control de la producción escalada en el biorreactor se realizó mediante visualización microscopio óptico, y la monitorización de crecimiento celular mediante medida de densidad óptica y/o cultivo en placa.

HITO 4. Aplicación de microorganismos vivos y metabolitos de interés industrial en alimentos

Tarea 4.1. Obtención de preparaciones de microorganismos vivos

Los microorganismos aislados se han preparado en dos formatos para su aplicación en alimentos:

- Cultivo líquido, para uso directo en las diferentes aplicaciones. Ha sido comprobado que los cultivos aguantan congelación -80 °C manteniendo su capacidad antimicrobiana.
- Liofilizado. Se han hecho pruebas de liofilización de los cultivos. Ha sido comprobado que los cultivos aguantan los procesos de liofilización tras su producción en el biorreactor y que mantienen su actividad antimicrobiana.

Para alcanzar esos recuentos mínimos ha sido necesario estandarizar los inóculos bacterianos previo a su conservación. Para la estandarización de los inóculos se emplea como método el recuento indirecto por turbidimetría de inóculos. El fundamento es que la luz absorbida o difractada por una suspensión de células es directamente proporcional a la concentración celular. El método se basa en correlacionar la medida de absorbancia de una suspensión celular con los recuentos de ufc en placa obtenidos tras el cultivo.

Además, en todos los casos ha sido necesario realizar pruebas de:

- Viabilidad. Se hizo un control cualitativo, comprobando que hubo crecimiento en todas las siembras realizadas.
- Pureza. Supone ausencia de contaminación, el cultivo obtenido debe ser axénico o puro. Se controló mediante la observación microscópica y crecimiento en medio de cultivo general (TSB), comprobando la existencia de un solo tipo de colonias.
- Autenticidad. Requiere la comprobación de las características metabólicas y de crecimiento de

la cepa. Se emplearon pruebas de identificación bioquímica.

Tarea 4.2. Obtención y purificación de metabolitos de interés

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y de la actividad fisiológica de la cepa productora. Además, las bacteriocinas presentan una cinética de metabolito primario y, por tanto, su producción está íntimamente correlacionada con el aumento de biomasa. Es por ello que en el desarrollo del proyecto ha sido de suma importancia la optimización de producción de biomasa bacteriana en el biorreactor en cuanto a tiempos de producción, temperatura y pH fundamentalmente.

La biomasa ha sido procesada para la purificación de cultivos de interés. Se comprobó que los metabolitos antimicrobianos de origen bacteriano, además de estar presentes en las células bacterianas son excretados al medio de cultivo. La secreción de bacteriocinas tiene lugar a través de la membrana citoplasmática y por tanto pueden encontrarse en una elevada cantidad en el medio de producción de biomasa bacteriana.

Como la producción de bacteriocinas depende del crecimiento y de la actividad fisiológica de la cepa productora, el control de las condiciones de producción ha sido un factor muy importante. También la fuente de carbono, que en el caso que nos ocupa ha sido glucosa para mejorar el rendimiento.

Como se comentó anteriormente, a lo largo del desarrollo del proyecto, la producción de los cultivos tipo que se ajustada debido a un fallo en una de las sondas del biorreactor que posteriormente fue solucionado. Así el cultivo tuvo que ser ajustado desde unas condiciones de turbulencia y flujo dinámico, con regulación de pH y oxígeno, a condiciones estáticas de cultivo.

Tras la obtención de los cultivos obtenidos, tanto en el biorreactor en condiciones controladas, como en condiciones estáticas de cultivo, se iniciaron los procesos de extracción de los compuestos de interés a mayor escala mediante centrifugación.

En todos los casos se partía de un volumen de 1 litro de cultivo para el escalado.

En matrices fermentadas, en las que la aplicación de cultivos se podría hacer de forma directa, se considera suficiente su extracción mediante centrifugación y obtención de sobrenadante suficientemente clarificado.

En matrices no fermentadas donde no es posible la incorporación de microorganismos de forma directa, se evaluaron estrategias para la purificación de los compuestos bioactivos.

Hay descritos varios métodos rápidos de cromatografía que podrían permitir un mayor ajuste en cuanto



a la concentración de bacteriocina tales como, la separación múltiple por cromatografía, incluyendo el intercambio catiónico, filtración por gel, precipitación por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, interacción hidrofóbica o cromatografía líquida en fase reversa. Uno de los problemas detectados es que a lo largo de la purificación estas moléculas tienden a agregarse debido a su carácter hidrofóbico.

Las bacteriocinas son péptidos o pequeñas proteínas sintetizadas por los ribosomas y como ya ha sido comentado tienen una actividad antibacteriana, en el caso que nos ocupa sobre *Listeria monocytogenes*. Ambas cepas productoras pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum*, por lo que las bacteriocinas producidas probablemente eran plantaricinas.

Se corrobora tras la revisión bibliográfica que la producción de bacteriocinas es un aspecto estrechamente vinculado al genoma de las bacterias productoras y debido a este hecho se estableció en el desarrollo del proyecto un número limitado de pases y/o cultivo desde las cepas originales hasta la producción, con el fin de evitar posibles cambios o mutaciones en el genoma desde la cepa original.

En el estudio aquí descrito se trató de obtener y purificar el compuesto de interés, aislándolo y purificándolo en la medida de lo posible a partir de los cultivos bacterianos.

Para la purificación de las bacteriocinas procedentes de ambas cepas y tras la centrifugación, se llevó a cabo una extracción para la eliminación de sales. Así, a los sobrenadantes obtenidos a partir de ambas cepas tras una doble centrifugación, se añadió sulfato de amonio al 70 % de saturación y se sometió a un nuevo centrifugado a 8000 rpm durante 20 minutos y la fracción activa fue posteriormente centrifugada con filtros absolutos de 0,22 μm para evitar la presencia de cualquier microorganismo residual en la muestra.

Se volvieron a realizar los ensayos de inhibición para determinar la fracción activa en cada caso con efecto anti-*Listeria* y ésta se mantenía.

A partir de los sobrenadantes obtenidos por centrifugación, se determinó el efecto del tratamiento por calor en la bacteriocina. La termorresistencia de las plantaricina/s es especialmente relevante si van a ser aplicadas sobre producto que será sometido a tratamiento térmico (producto pasteurizado, por ejemplo) y así determinar si la molécula sigue teniendo actividad anti-*Listeria* tras el proceso tecnológico de elaboración de los alimentos.

Una vez obtenidos los resultados se comprobó que las bacteriocinas aisladas presentan termorresistencia en las condiciones incluidas en el estudio.

El método finalmente seleccionado fue la filtración a través de membrana. Esta técnica permite separar



moléculas de pequeño tamaño, disueltas en fluidos y cuyo criterio de separación es el tamaño molecular, aunque otros factores como la estructura molecular y la carga pueden influir en la separación. Las moléculas de mayor tamaño son retenidas en el filtro. Además, la ultrafiltración permite eliminar la etapa de adición de sulfato de amonio para la precipitación de las sales y sustancias interferentes presentes en el cultivo.

Una de las dificultades encontradas fue seleccionar un adecuado tamaño de filtración teniendo en cuenta además que la retención en la membrana de ultrafiltración no depende únicamente del peso molecular del compuesto a purificar.

Los resultados no quedan claros en el caso de la bacteriocina aislada de la cepa *Lb. plantarum* CECT 9747. En el caso de la bacteriocina aislada de la cepa *Lb. plantarum* CECT 30051 se determinó que la biomolécula de interés se corresponde con un péptido de bajo peso molecular de menos de 1 KDa.

Una de las limitaciones a la hora de aplicar las bacteriocinas aisladas sobre diferentes matrices alimentarias fue los pequeños volúmenes obtenidos tras la ultrafiltración (entre 1-4 ml). Con las técnicas disponibles a escala laboratorio, no fue posible producir la cantidad de bacteriocina/s necesaria para su aplicación a escala preindustrial en la planta piloto.

Tarea 4.3. Aplicación de microorganismos y metabolitos en matrices alimentarias

Con la idea de aplicación de microorganismos de interés o sus metabolitos en diferentes matrices alimentarias y sustituir aditivos de síntesis química, se comenzaron los ensayos a escala preindustrial para su validación.

Metodología de aplicación a alimentos de las preparaciones de microorganismos viables y los metabolitos

En una parte de los experimentos se han empleado suspensiones de microorganismos vivos para validar su efecto. Al tratarse de microorganismos vivos se valoraron diferentes alternativas de ensayo, pero finalmente se optó por un alimento fermentado, donde los microorganismos y en concreto las bacterias ácido lácticas juegan un papel fundamental.

La matriz seleccionada fue un embutido crudo-curado fermentado, chorizo, al que se le añadieron directamente para las pruebas las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas por sus propiedades tecnológicas: producción de sustancias anti-Listeria, capacidad fermentativa, buen rendimiento de biomasa en cultivo y proliferación en un amplio rango de temperaturas.



Se evaluó la capacidad fermentativa en todos los casos, monitorizando el pH, comparando el proceso fermentativo frente un control sin adición de cultivos, recuento de BAL, determinación de la actividad de agua y evaluación del producto a nivel sensorial.

En los primeros ensayos no ha habido diferencias entre el control y el producto al que se le incorporaron las cepas de interés biotecnológico. Se hicieron ajustes en la formulación y en el proceso productivo para determinar si estos cambios podían suponer una mejora en el rendimiento tecnológico de las cepas.

Tras los ajustes en formulación y proceso no se han detectado diferencias significativas, por lo que se continuó con nuevos ensayos para tratar de mejorar la eficiencia fermentativa.

Validación de la capacidad antimicrobiana en matrices alimentarias

Se realizaron los ensayos de *Challenge test*. Los ensayos se realizaron bajo las premisas establecidas en la "ISO 20976-1 Microbiology of the food chain – Requirements and guidelines for conducting challenge test of food and feed products – Part 1: Challenge tests to study the growth potential, lag time and maximum growth rate".

Para la puesta a punto de los ensayos de desafío o de *Challenge tests* tuvo en cuenta los dos tipos de aplicación:

- Directamente los microorganismos sobre matriz alimentaria.
- Aplicación del producto procedente del metabolismo del cultivo de microorganismos viables.

En los ensayos de desafío o *Challenge test* se determina el potencial de crecimiento.

El potencial de crecimiento indica la capacidad del alimento de soportar el crecimiento del microorganismo en estudio.

Aplicación de microorganismos

La matriz elegida fue Chorizo asturiano.

Las muestras se inocularon *L. monocytogenes*. El método de contaminación seleccionado fue el de inoculación en profundidad. Para la contaminación en profundidad en este caso, fueron preparados inóculos calculando un 1% de volumen sobre el total de producto.

Se prepararon paralelamente unidades control no inoculadas con *L. monocytogenes*.

La aplicación de los cultivos con actividad bioconservante permite el control de *Listeria monocytogenes*

en embutido crudo curado con una reducción de más de 1 log ufc/g en el producto final.

Aplicación de metabolitos

Las matrices elegidas fueron:

- Hamburguesa
- Burguer meat

Las muestras se inocularon *L. monocytogenes*. El método de contaminación seleccionado ambas matrices fue el de inoculación en profundidad, metodología empleada para alimentos en los que sus ingredientes se encuentran más o menos homogeneizados o picados. Para la contaminación en profundidad en este caso, fueron preparados inóculos calculando un 1% de volumen sobre el total de producto.

Se prepararon paralelamente unidades control no inoculadas con *L. monocytogenes*.

En este caso se adicionó el producto derivado del metabolismo de las bacterias ácido lácticas, tras el proceso de centrifugación.

Ensayos con hamburguesa

Tras la contaminación de la masa de hamburguesa con *Listeria monocytogenes* y elaboración de las muestras control, sin adición de bacteriocina y de las muestras de análisis con bacteriocina, se monitorizó la vida útil de la hamburguesa para evaluar la proliferación o no de *Listeria monocytogenes*.

Se ensayaron 3 lotes de producción.

Se comprueba que la adición de bacteriocina al producto inhibe la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

Ensayos con burguer meat

Tras la contaminación de la masa de hamburguesa con *Listeria monocytogenes* y elaboración de las muestras control, sin adición de bacteriocina y de las muestras de análisis con bacteriocina, se monitorizó la vida útil de la hamburguesa para evaluar la proliferación o no de *Listeria monocytogenes*.

Se ensayaron 3 lotes de producción.

Se comprueba que la adición de bacteriocina al producto inhibe la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

Validación de la capacidad antioxidante y colorante en matrices alimentarias



Como ya fue comentado, la oxidación lipídica genera cambios indeseados en las propiedades organolépticas de los alimentos. En concreto, uno de los problemas más evidentes es el cambio de color en matrices cárnicas y la aparición de olores y sabores rancios. Se ha trabajado con efecto antioxidante de la astaxantina extraída de la microalga *Dunaliella salina* para prevenir reacciones de oxidación lipídica en embutidos y para mantener el color rojo al emplearse como colorante.

Se hicieron unos estudios preliminares del uso de astaxantina microalgal sobre chorizo asturiano, producto con alto contenido en grasa y con un color rojo brillante. La astaxantina fue aplicada como polvo liofilizado en la masa cárnica. En las pruebas realizadas se comprobó que el color que aportaba era excesivamente “anaranjado” y no el esperado “rojo intenso” característico del producto. Es por ello que se descartó esta línea de trabajo para centrar los esfuerzos en el desarrollo de los compuestos bioconservantes.

HITO 5. Coordinación y evaluación de resultados

Tarea 5.1. Coordinación del proyecto

La tarea de coordinación del proyecto es constante en el tiempo con el objeto de llevar a cabo una planificación, ejecución y revisión de las tareas adecuadas a la solicitud.

De forma coordinada se evalúan:

- Objetivos planteados para cada mensualidad
- Objetivos cumplidos
- Retos encontrados y resolución de problemas
- Necesidades de material

Una de las actividades más complejas en cuanto a la organización, fue la recopilación de diferentes matrices alimentarias, para lo que hubo que contar con la colaboración de empresas del sector agroalimentario. El objetivo planteado era tratar de alcanzar un mínimo de 300 aislados en el biobanco, que fue posible alcanzar y superar. Otro de los retos a resolver fue la viabilidad de algunas de las cepas aisladas tras la congelación, ya que no fue posible recuperar algunos de los microorganismos; en otras ocasiones el problema fue no disponer de cultivos puros.

Tarea 5.2. Explotación de resultados

El análisis y evaluación de resultados se ha llevado a cabo de forma continua a lo largo del desarrollo del proyecto y estableciéndose reuniones de carácter mensual que han permitido evaluar la evolución del



proyecto.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento se ha estudiado la forma de proteger el conocimiento generado y por otro lado la transferencia al tejido empresarial. Así, dos de las cepas bacterianas aisladas en el biobanco han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo en el contexto del protocolo de Nagoya y bajo las premisas del tratado de Budapest.

Finalmente se han alcanzado objetivos y conclusiones que se podrían sintetizar de la siguiente forma:

- Se ha desarrollado un biobanco de especies bacterianas, mayoritariamente de bacterias ácido lácticas, con potencial biotecnológico.
- En el desarrollo del proyecto se ha logrado identificar dos especies bacterianas con efecto bioconservante y antagonista frente a *Listeria monocytogenes*.
- Las bacteriocinas son actualmente la alternativa para la sustitución de los antibióticos ya que tienen menos efectos adversos. Esto podría suponer una futura línea de investigación en la producción primaria de alimentos.
- La producción de cultivos bacterianos bioactivos ha sido puesta a punto a escala preindustrial, tanto en condiciones de biorreactor como en condiciones de cultivo en estático.
- En el caso de las microalgas la forma más viable del uso de estos cultivos es mediante liofilizado una vez llevada a cabo la disrupción celular para que los compuestos activos se liberen al medio.
- No se han obtenido resultados satisfactorios en la utilización de microalgas como colorante o antioxidantes.
- La extracción de bacteriocina/s concentrada y purificada ha sido posible gracias a la técnica de ultrafiltración de péptidos de bajo peso molecular.
- Los ensayos de desafío o de Challenge test son una herramienta viable para la evaluación de la eficacia de bioconservación en matrices alimentarias a escala preindustrial.

