

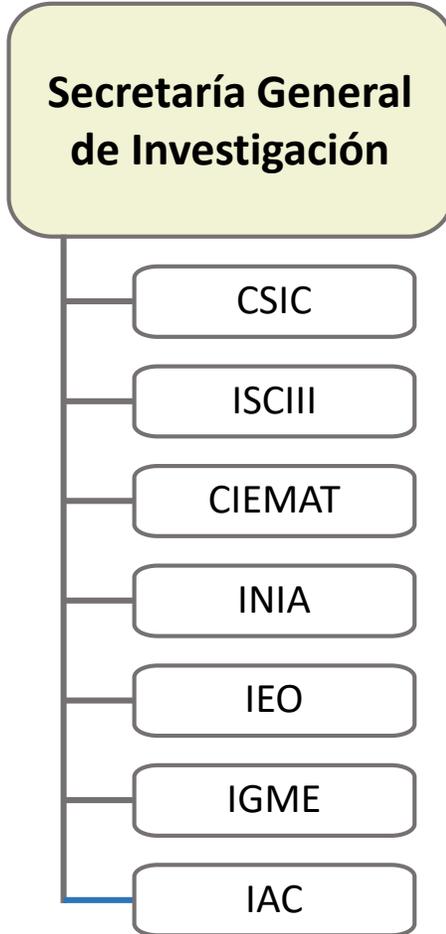
Colección de microorganismos INIA

Antonia Picón y Juan L. Arqués

INIA - Departamento de Tecnología de Alimentos

mmedina@inia.es; apicon@inia.es; arques@inia.es





- Uno de los siete Organismos Públicos de Investigación
- Único OPI dedicado exclusivamente a la investigación agroalimentaria y forestal
- 1.100 personas, 800 en tareas de investigación



Subdirección General de Investigación y Tecnología (SGIT)



Líneas de investigación

- Seguridad microbiológica de alimentos
- Tecnología de productos lácteos y cárnicos
- Calidad y seguridad de alimentos vegetales



Planta de Tecnología de Alimentos

- Altas presiones
- Salas de lácteos y cárnicos
- Sala y laboratorios de higiene de alimentos



Patógenos



- **Tecnología y calidad**

Bacterias de origen lácteo

Función: Mejorar el sabor y aroma del queso

- **Seguridad microbiológica**

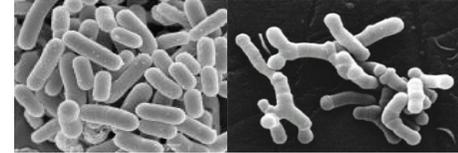
Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas o reuterina

Función: Mejorar la seguridad de alimentos

- **Bacterias probióticas**

Bacterias lácticas y bifidobacterias de origen humano

Función: Desarrollar nuevos alimentos probióticos



GRAS / QPS

Asociadas a fermentaciones

Cultivos iniciadores

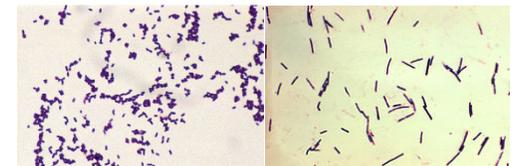
Cultivos protectores

Probióticos

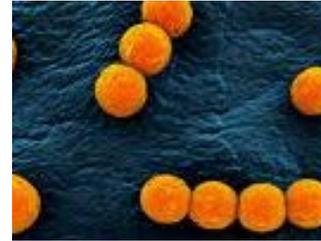
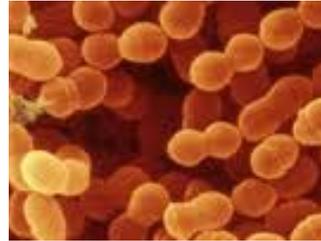
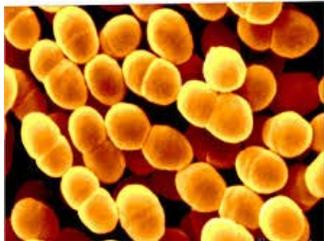
- **Bacterias patógenas y alterantes**

Listeria monocytogenes

Clostridium spp.



BACTERIAS LÁCTICAS PARA MEJORAR LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE ALIMENTOS



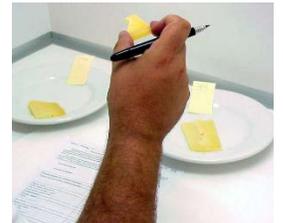
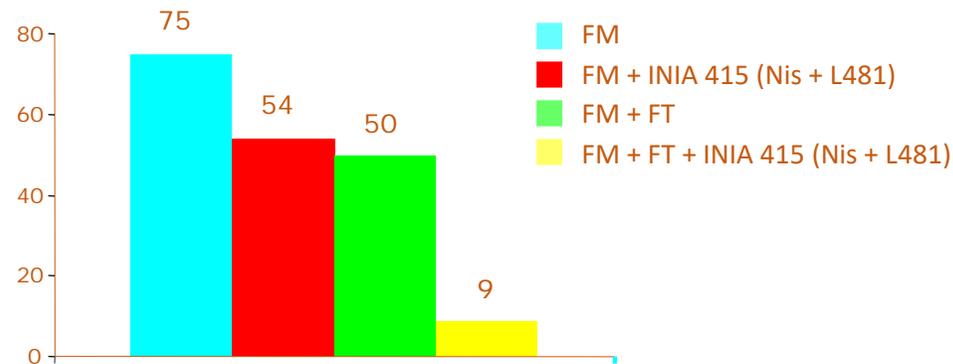
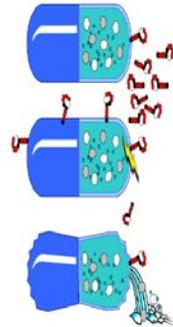
- **Mejora de las características sensoriales del queso**

Potenciación del aroma y sabor

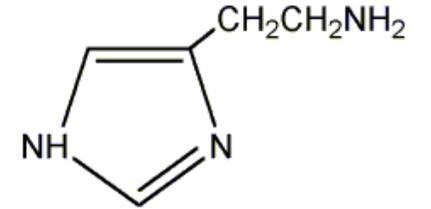
Reducción del periodo de maduración

Cultivos adjuntos de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

(Días para alcanzar intensidad de sabor = 6)



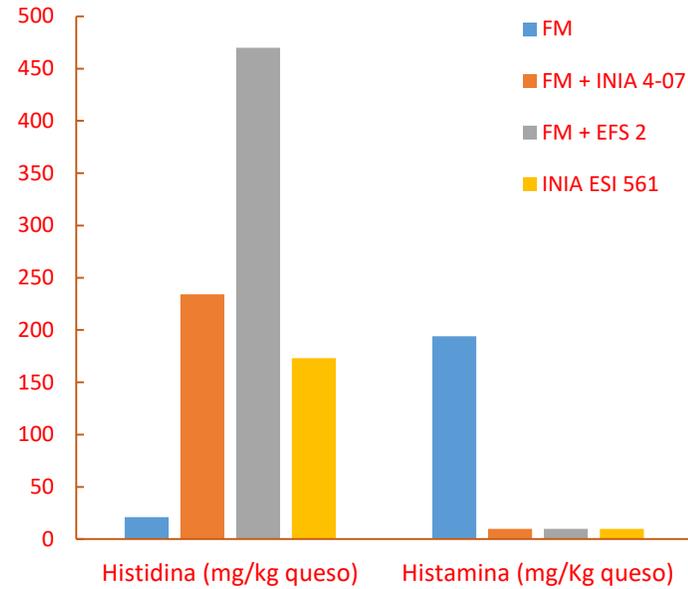
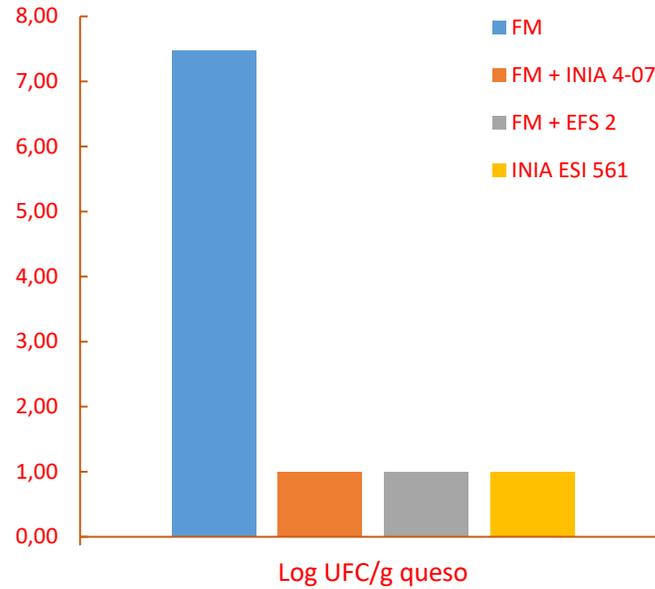
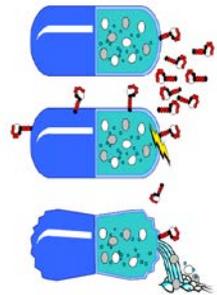
- Eliminación de la formación de aminas biógenas en queso



Histamina

Cultivos adjuntos de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

Lb. buchneri St2A (productor de histamina) inoculado en leche

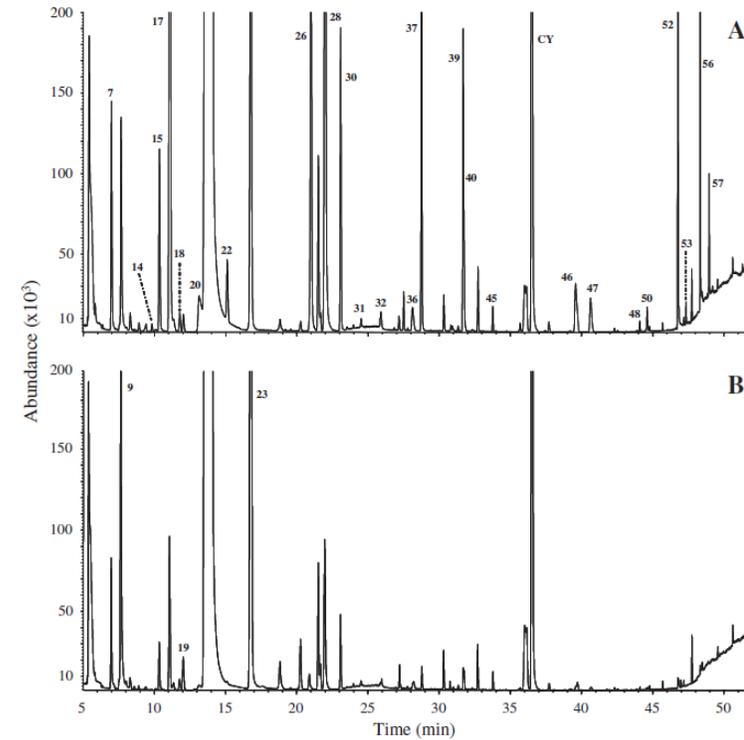
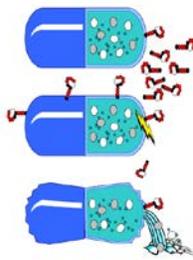


- Eliminación de la hinchazón tardía en queso

Cultivos adjuntos de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

A: *Clostridium beijerinckii* INIA 63 + *Lactococcus lactis* INIA 415-2

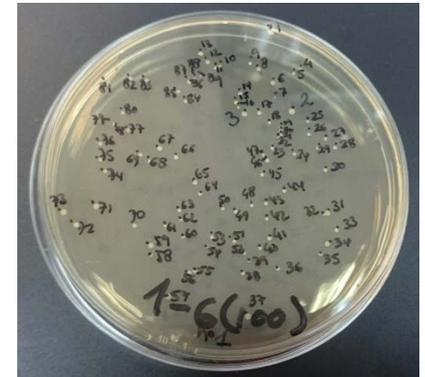
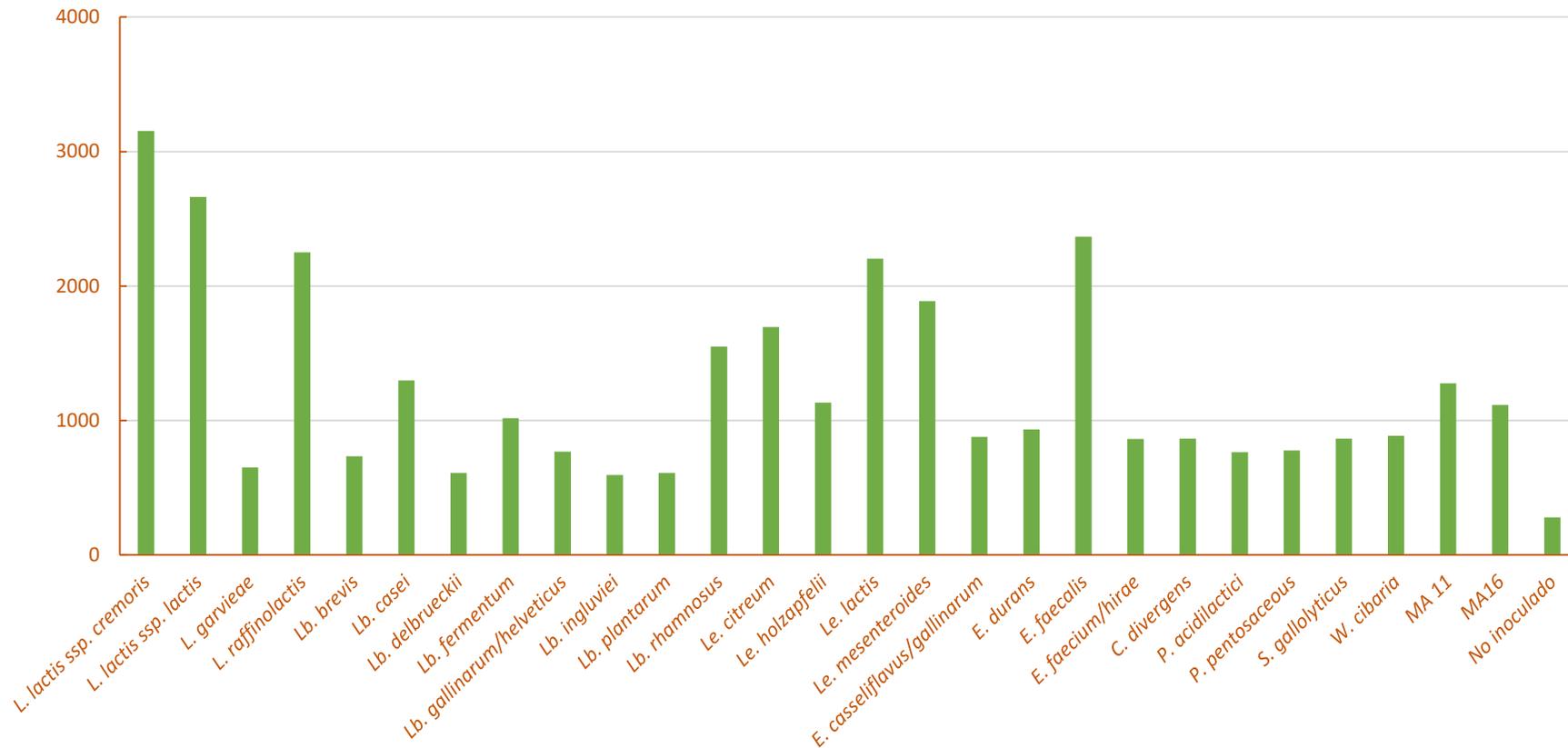
B: *Clostridium beijerinckii* INIA 63 + *Lactococcus lactis* INIA 415 (Nis + L481)



- Nuevos cultivos iniciadores para queso**

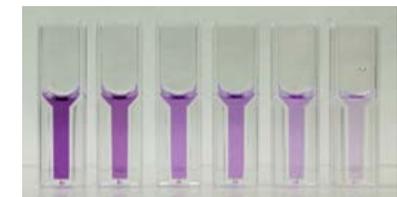
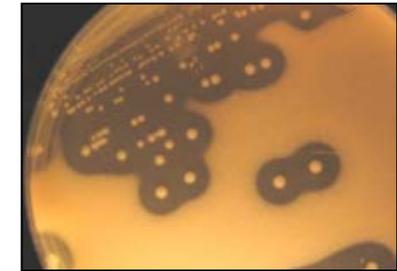
Producción de compuestos volátiles por cepas autóctonas de bacterias lácticas

Diferencias en el número y la abundancia de compuestos volátiles generados

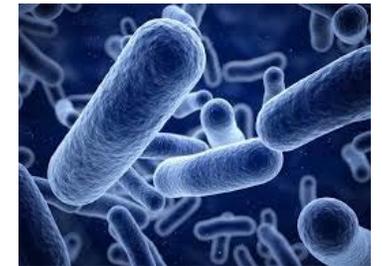
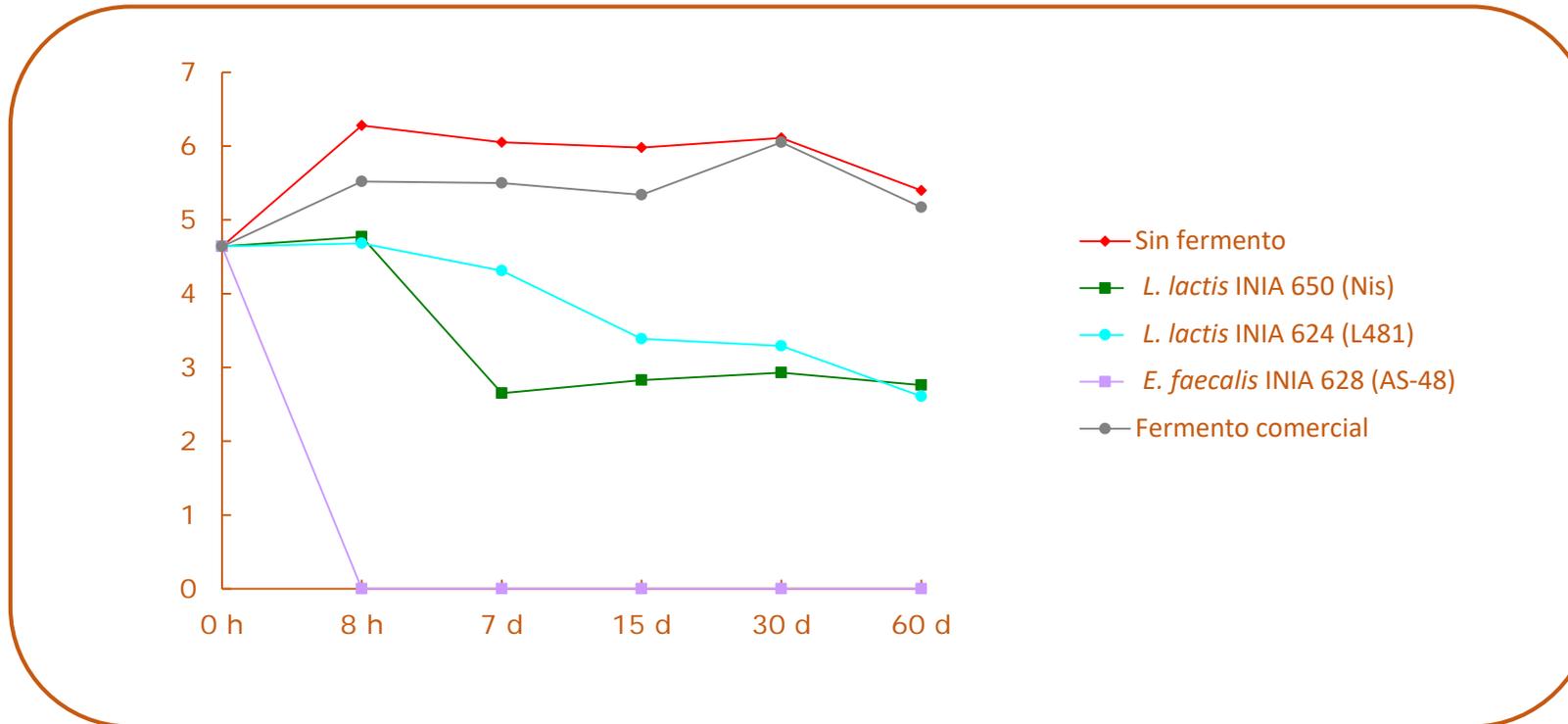


- Seguridad microbiológica de alimentos: Bioconservación

- *L. lactis* subsp. *cremoris* INIA 624 ➔ Lacticina 481
- *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 626 ➔ Nisina Z + Lacticina 481
- *L. lactis* subsp. *lactis* INIA ESI 515 ➔ Nisina A
- *E. faecium* INIA 607 ➔ Enterocinas A y B
- *E. faecalis* INIA 652 ➔ Enterocina I
- *E. faecalis* INIA 4 ➔ Enterocina AS-48
- *L. lactis* INIA CL2 ➔ Nisina A + Pediocina PA-1
- *Lb. reuteri* P572 ➔ Reuterina
- *Lb. reuteri* P576 ➔ Reuterina

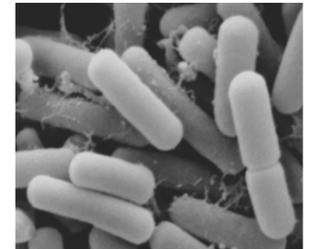
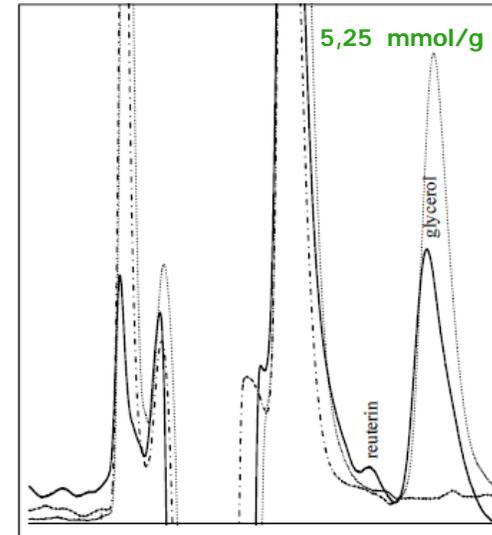
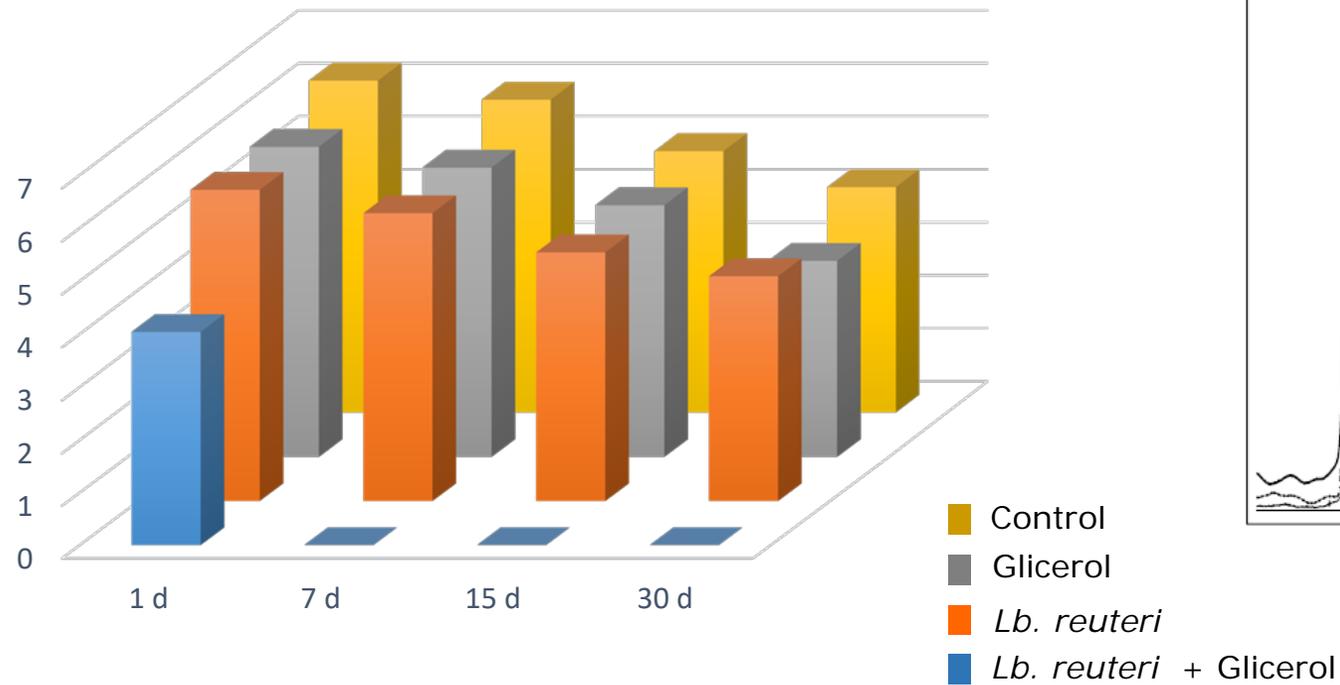


- Inactivación de *Listeria monocytogenes* en queso



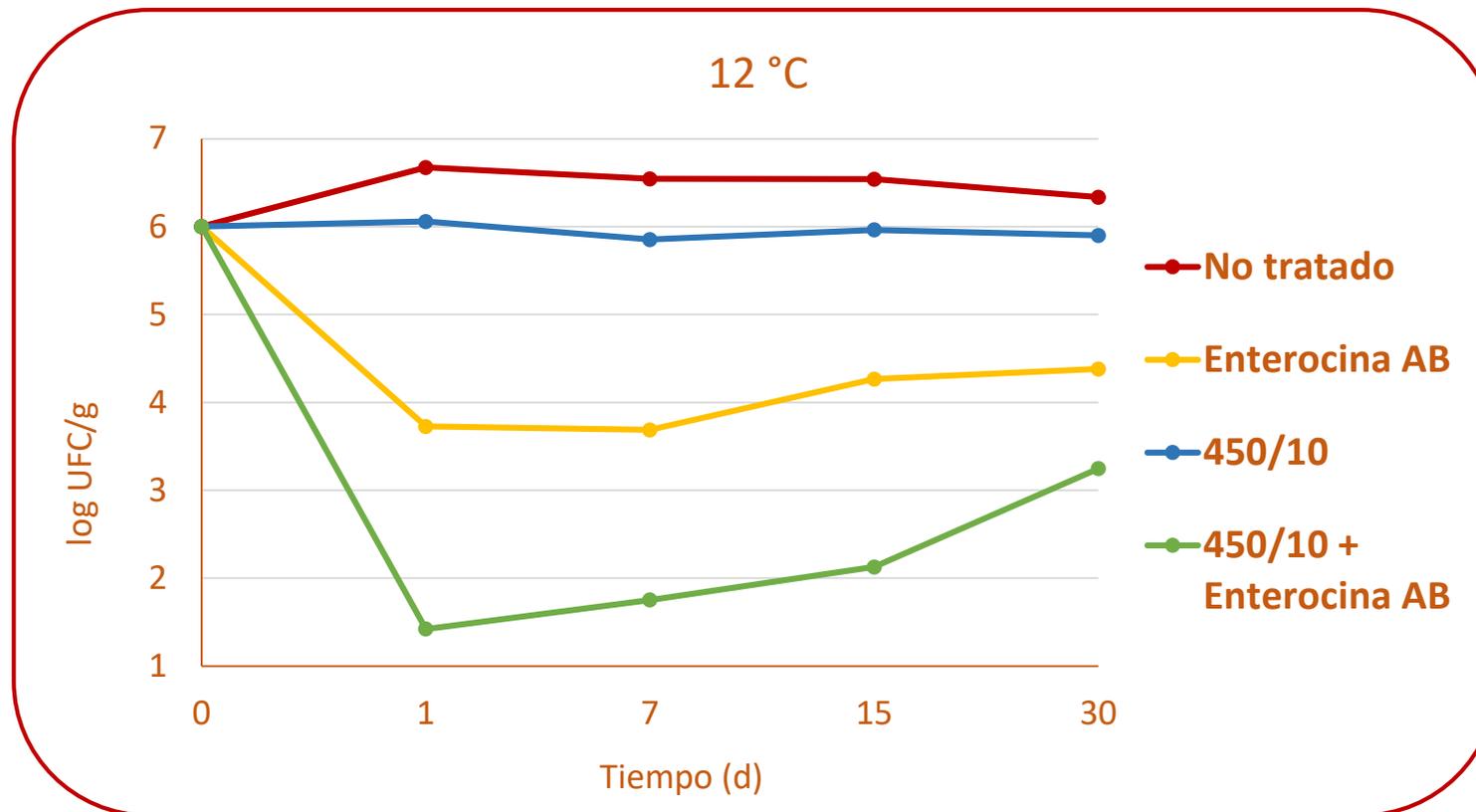
- Inactivación de *Listeria monocytogenes* en queso

+ *Lb. reuteri* INIA P572 (10^6 /ml)
+ glicerol (50 mM)

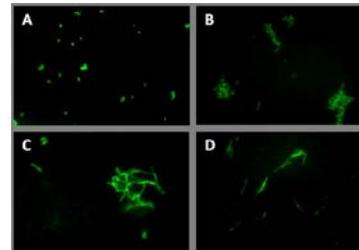
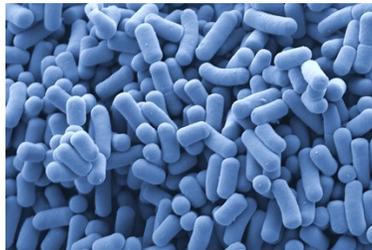


- Inactivación de *Listeria monocytogenes* en jamón curado

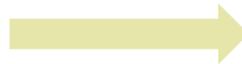
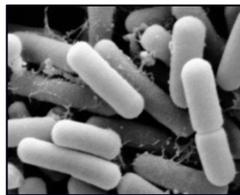
+ APH 450 MPa/10 min / + Enterocina AB (*E. faecium* INIA 607) / + tratamiento combinado



BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES



- Bacterias lácticas y bifidobacterias aisladas de leche materna y heces de bebés lactantes

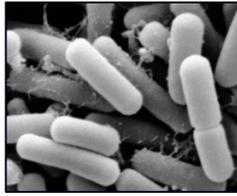


	Origen	Especie
MADRE-HIJO 1	Leche materna	<i>B. longum</i>
	Heces bebé	<i>B. longum</i>
	Heces bebé 2008	<i>B. bifidum</i>
	Heces madre 2009	<i>B. bifidum</i>
	Heces niño	<i>B. pseudocatenulatum</i>
MADRE-HIJO 2	Leche materna	<i>B. infantis</i>
	Heces bebé	<i>B. infantis</i>
MADRE-HIJO 3	Leche materna	<i>B. breve</i>
	Heces bebé	<i>B. breve</i>

Transmitidas de madre a hijo

PROBIÓTICOS

- Bacterias lácticas de origen lácteo y productoras de compuestos antimicrobianos



Cepas bioprotectoras

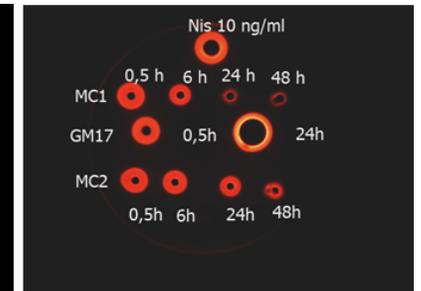
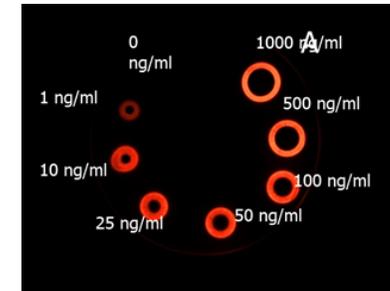


Cepas probióticas

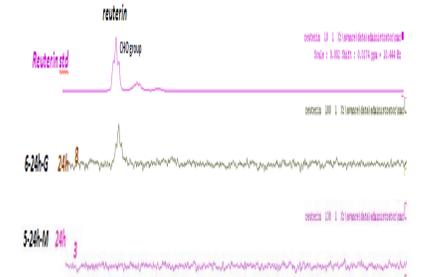
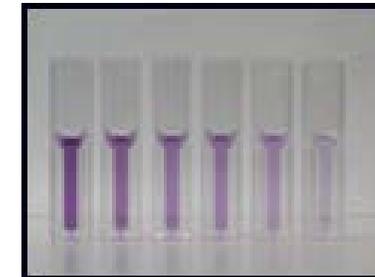
EFFECTO DOBLE
ALIMENTO-INTESTINO

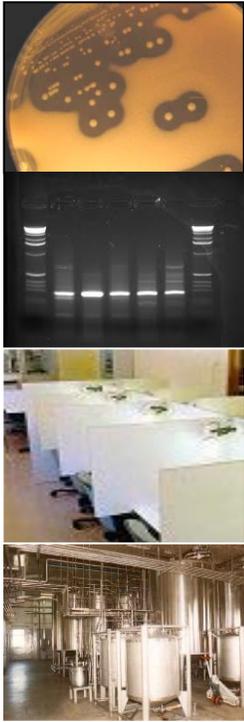


Lactococcus lactis INIA 650
Nisina



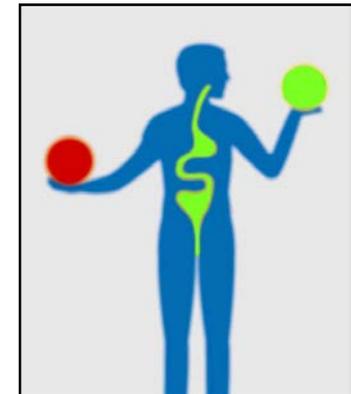
Lactobacillus reuteri INIA P572
Reuterina



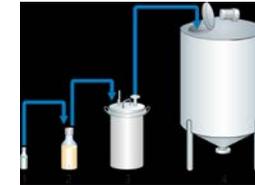


- ✓ Identificación
- ✓ Producción antimicrobianos / Antagonismo
- ✓ Producción de metabolitos bioactivos
- ✓ Resistencia a condiciones GI
- ✓ Seguridad
- ✓ Adhesión / Formación de biofilms
- ✓ Inmunomodulación
- ✓ Crecimiento en leche / Congelación / Liofilización
- ✓ Desarrollo de quesos y yogures probióticos
- ✓ Valoración química y sensorial
- ✓ Escalado
- ✓ Modelos *in vitro*
- ✓ Estudios *in vivo*

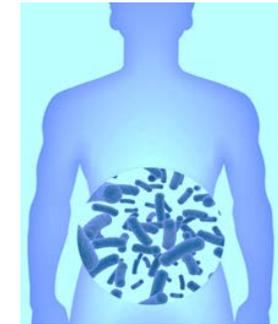
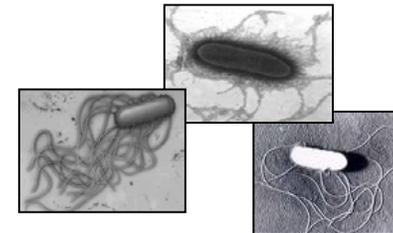
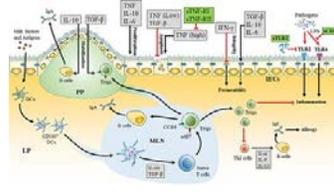
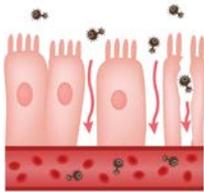
CARACTERIZACIÓN



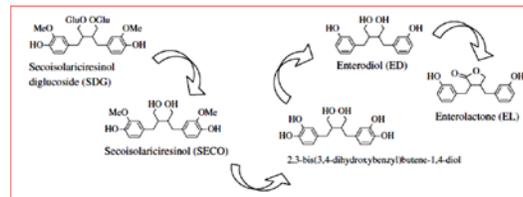
➤ Propiedades tecnológicas para desarrollar alimentos funcionales



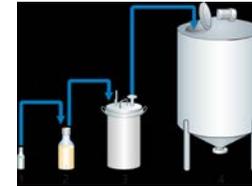
➤ Características y efecto probiótico



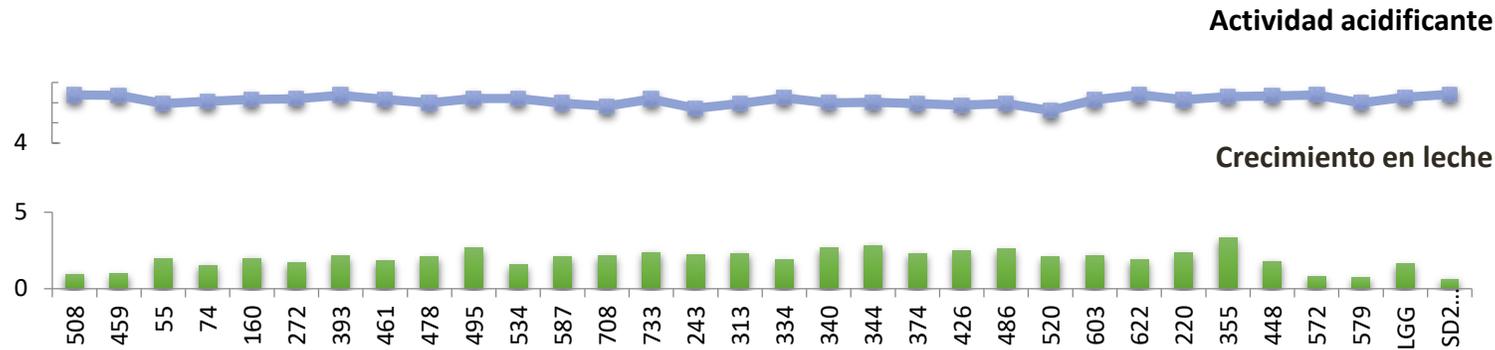
➤ Metabolismo de fitoestrógenos



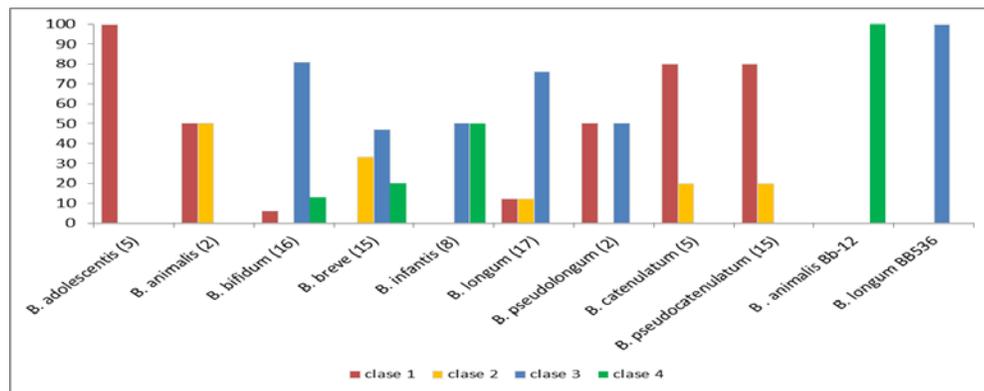
➤ Propiedades tecnológicas para desarrollar alimentos funcionales



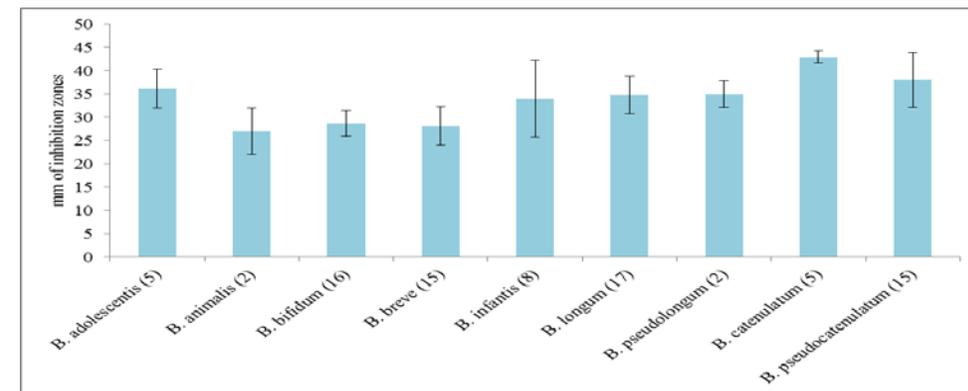
- Crecimiento en leche y actividad acidificante**



- Tolerancia al oxígeno de las bifidobacterias**

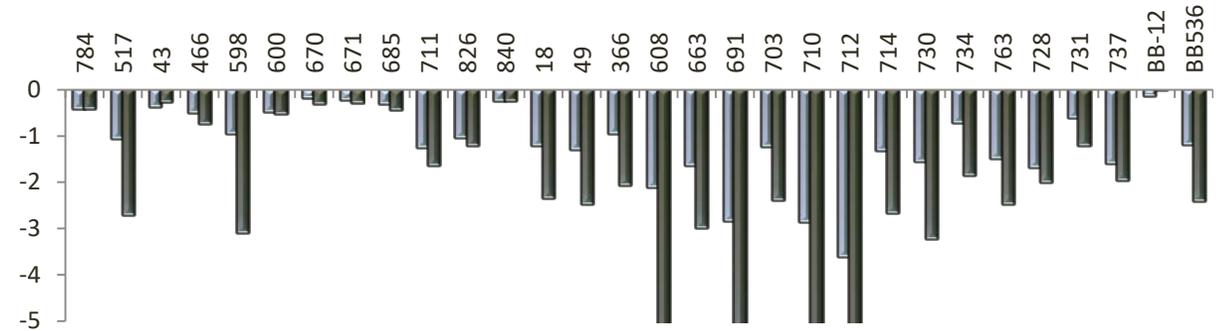
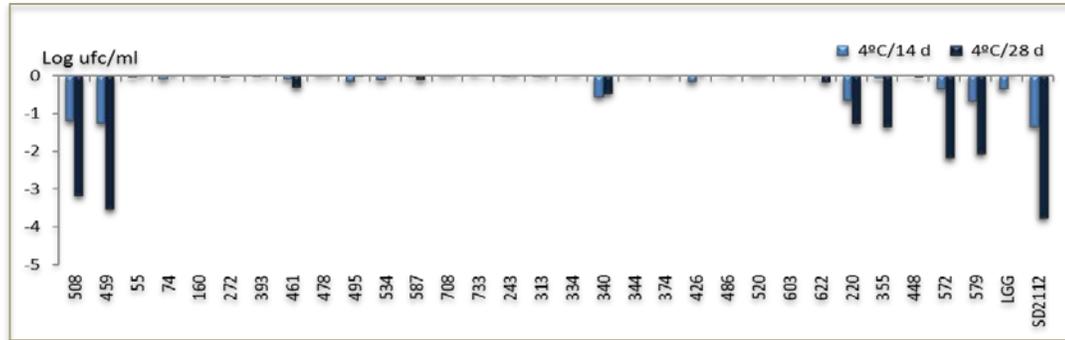


Grupos bacterianos según la tolerancia a microaerofilia

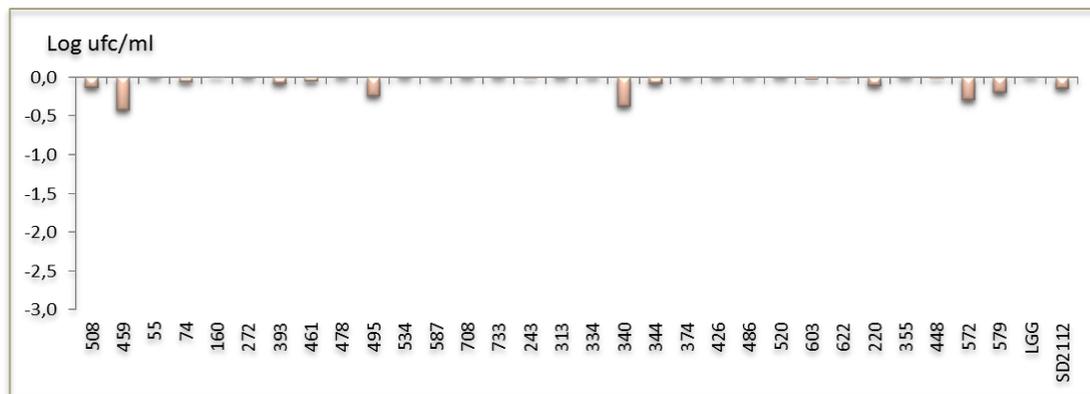


Resistencia al estrés oxidativo (3% de H₂O₂)

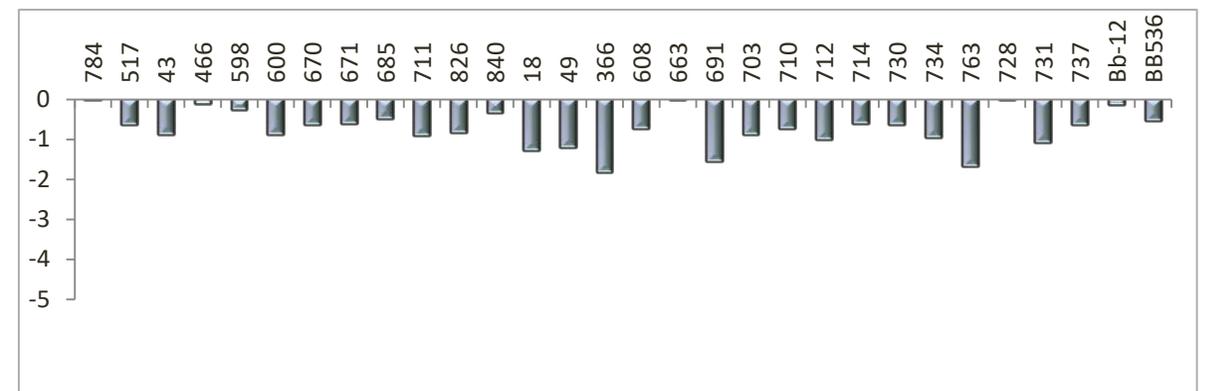
- Estabilidad de los cultivos en leche a 4°C



- Estabilidad de los cultivos a -80°C

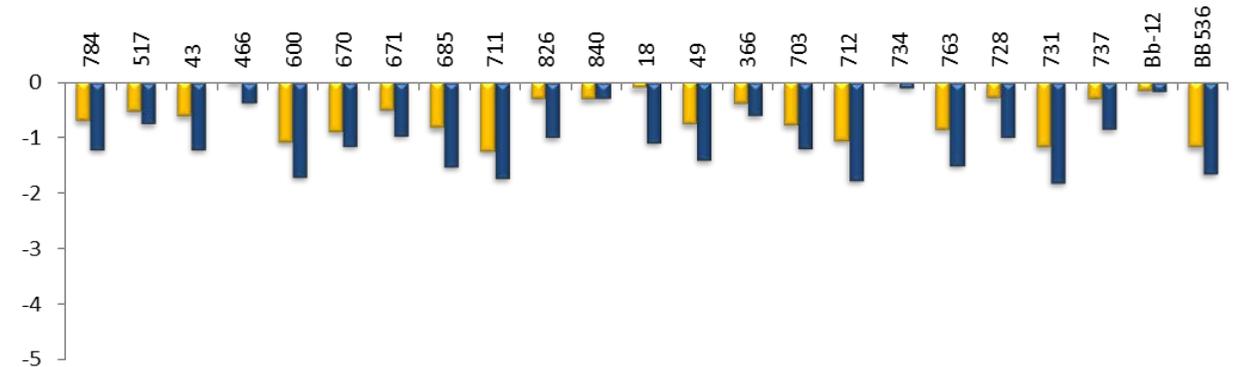
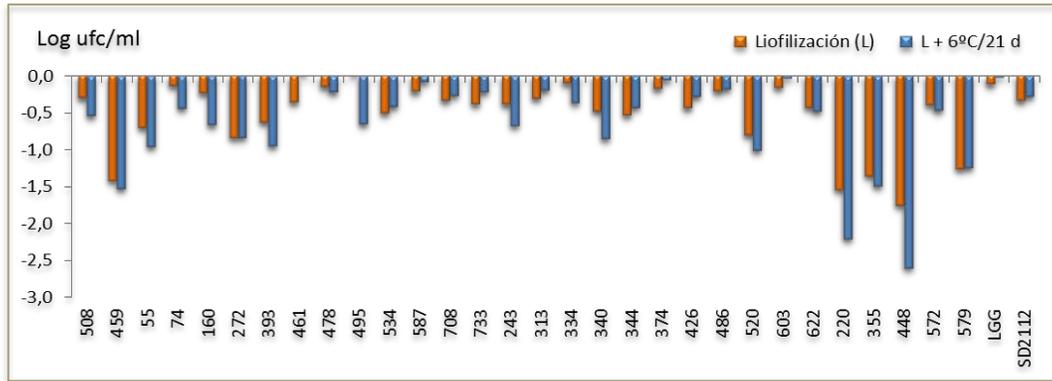


Lactobacillus spp.

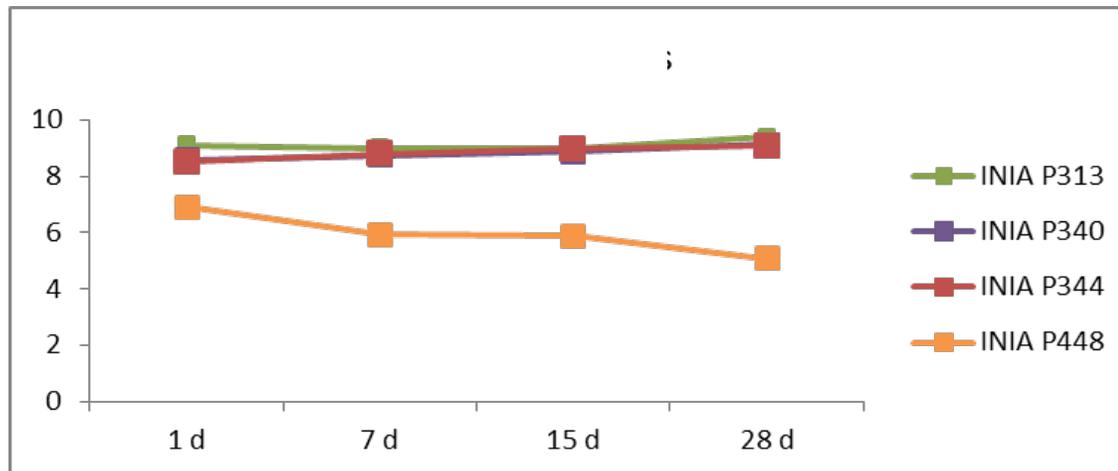


Bifidobacterium spp.

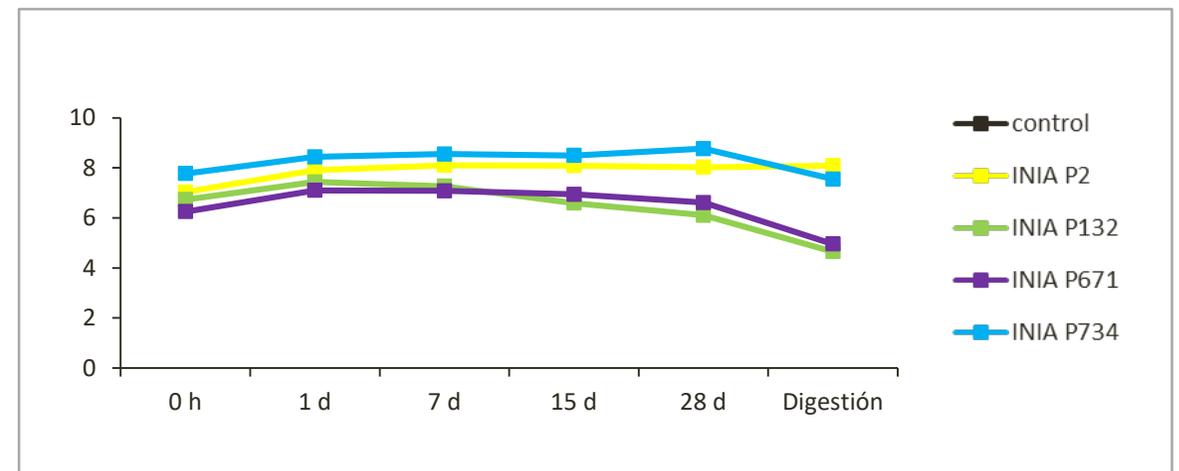
Estabilidad a la liofilización y almacenamiento



Elaboración de quesos con cepas probióticas como adjuntos

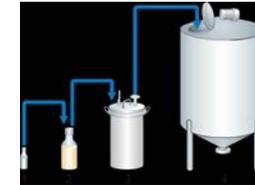


Lactobacillus spp.

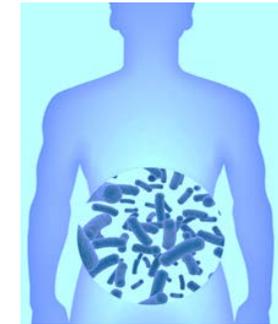
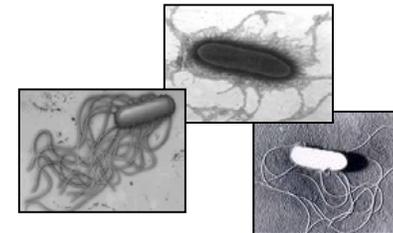
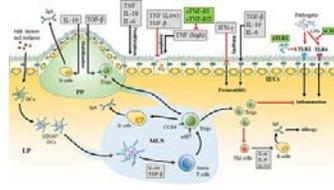
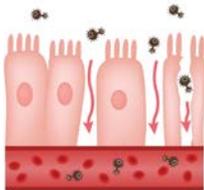


Bifidobacterium spp.

➤ Propiedades tecnológicas para desarrollar alimentos funcionales



➤ Características y efecto probiótico

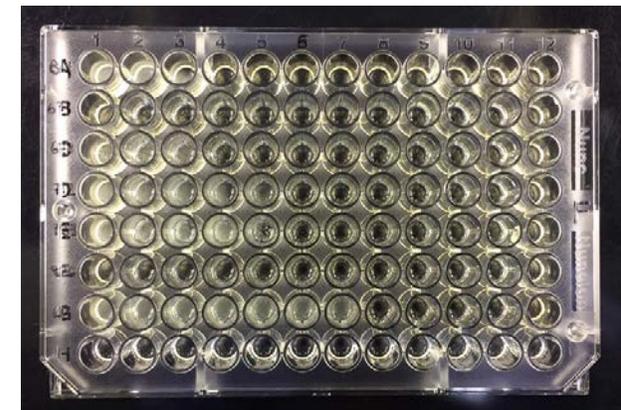


- **Método ISO 10932 - Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) recomendada por la EFSA (2012)**

Strains	Species	Ampicillin	Vancomycin	Gentamycin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol
INIA P272	<i>Lb. paracasei</i>	S	n.r.	S	R	S	S	S	S	R
INIA P344	<i>Lb. rhamnosus</i>	S	n.r.	S	R	S	S	S	S	R
INIA P572	<i>Lb. reuteri</i>	R	n.r.	S	S	S	S	S	R	R
INIA P540	<i>Lb. rhamnosus</i>	S	n.r.	S	S	S	S	S	S	R
INIA P508	<i>Lb. mucosae</i>	S	n.r.	S	S	R	S	S	R	S
INIA P183	<i>Lb. salivarius</i>	S	n.r.	S	R	S	S	S	S	R
INIA P448	<i>Lb. salivarius</i>	S	n.r.	S	R	S	S	S	S	R
INIA P461	<i>Lb. paracasei</i>	S	n.r.	S	R	S	S	S	S	R
INIA P734	<i>B. breve</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	S	S
INIA P784	<i>B. adolescentis</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	R	S
INIA P737	<i>B. infantis</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	R	S
INIA P712	<i>B. breve</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	S	S
INIA P678	<i>B. longum</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	S	S
INIA P671	<i>B. bifidum</i>	S	S	S	n.r.	R	S	S	S	S
INIA P753	<i>B. pseudocatenulatum</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	S	S
INIA P826	<i>B. bifidum</i>	S	S	S	n.r.	R	S	S	S	S
INIA P843	<i>B. longum</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	S	S
INIA P2	<i>B. pseudolongum</i>	S	S	S	n.r.	S	S	R	S	S
INIA P132	<i>B. longum</i>	S	S	S	n.r.	R	S	S	S	S
INIA P731	<i>B. infantis</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	R	S
INIA P900	<i>B. animalis</i>	S	S	S	n.r.	S	S	S	R	S
INIA 415	<i>L. lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TAB 50	<i>L. lactis</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	S
INIA P553	<i>E. faecium</i>	S	S	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
TAB 7	<i>E. faecium</i>	S	S	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Table 1. Microbiological cut-off values (mg/L)

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative*	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative*	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative†	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4

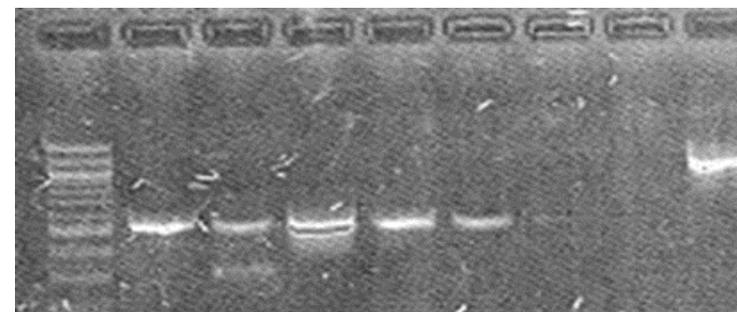


PRODUCCIÓN DE AC. GRASOS CONJUGADOS

- Producción ac. linoleico conjugado (CLA) o ac. linolénico conjugado (CLNA)

Bifidobacterium	Producción de CLA	Lactobacillus	Producción de CLA
INIA P2	-	INIA P55	++
INIA P120	-	INIA P74	-
INIA P132	-	INIA P143	+
INIA P678	-	INIA P160	-
INIA P685	-	INIA P183	-
INIA P712	++	INIA P235	-
INIA P718	-	INIA P243	-
INIA P730	-	INIA P272	-
INIA P731	-	INIA P344	-
INIA P734	+++	INIA P374	+
INIA P737	+	INIA P448	+
INIA P797	-	INIA P461	+
INIA P819	-	INIA P508	++
INIA P836	-	INIA P535	+
INIA P879	-	INIA P540	++
INIA P882	+++	INIA P572	-
INIA P885	-	INIA P574	+
INIA P916	-	INIA P582	++
INIA P965	-	INIA P603	-
INIA P996	++	INIA P651	+
		INIA P655	+
		INIA P733	+

Detección de linoleato isomerasa



Análisis cuantitativo

Cepa	Producción de CLA (µg /mL en sobrenadante)
<i>Bifidobacterium breve</i> LMG13194 (Control +)	34,20
<i>Bifidobacterium breve</i> INIA P734	25,32
<i>Lactobacillus sakei</i> LMG 13558 (Control +)	2,59
<i>Lactobacillus mucosae</i> INIA P508	8,82

EFECTO INMUNOMODULADOR-PROTECTOR

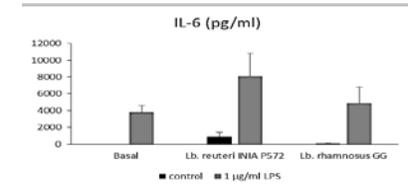
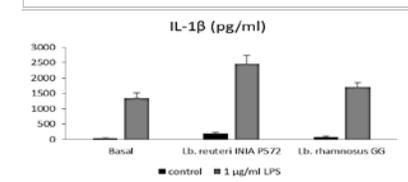
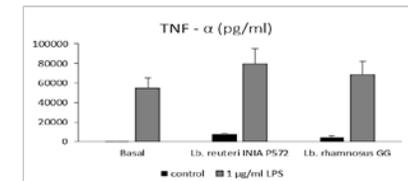
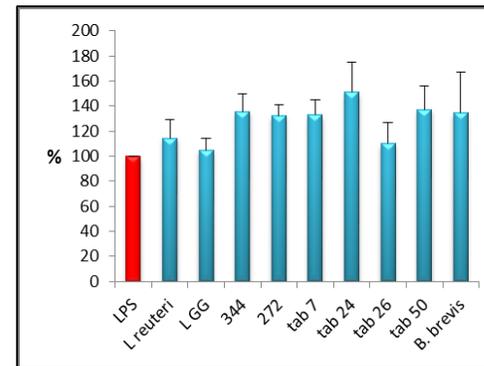
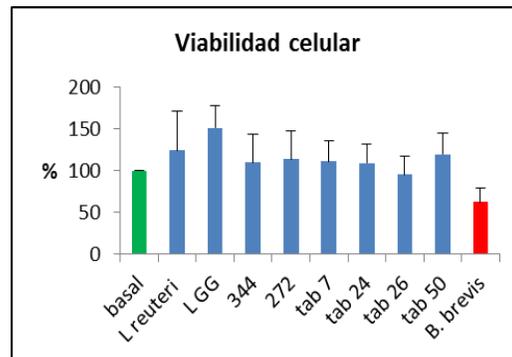
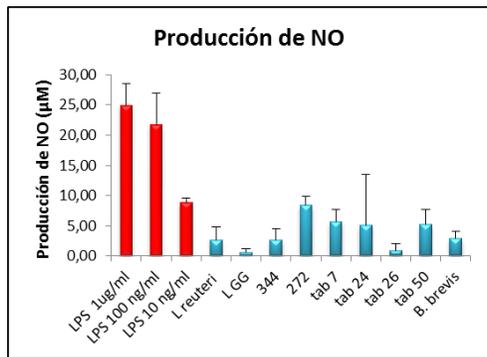
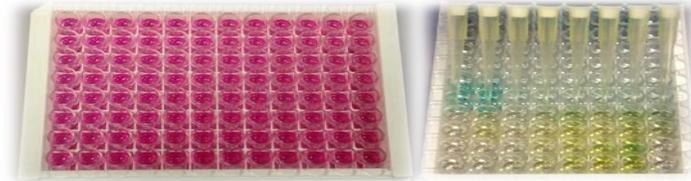
- **Ensayos *in vitro* con cultivos celulares**

Línea celular (2×10^5 ufc/ml): macrófagos **RAW 264.7**
Estimulación con LPS: 1 μ g/ml, 100 y 10 ng/ml

Producción de **óxido nítrico (NO)**: reacción de Griess

Viabilidad celular: ensayo MTT

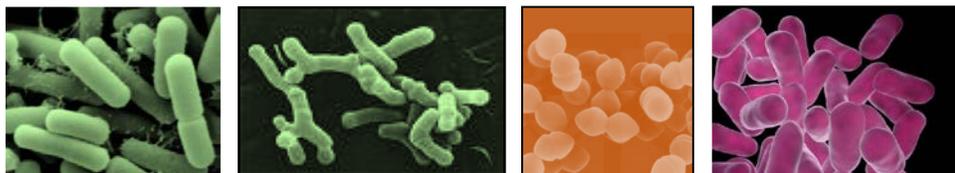
Producción de **citoquinas**: ELISA (TNF- α , IL-1 β , IL-6)



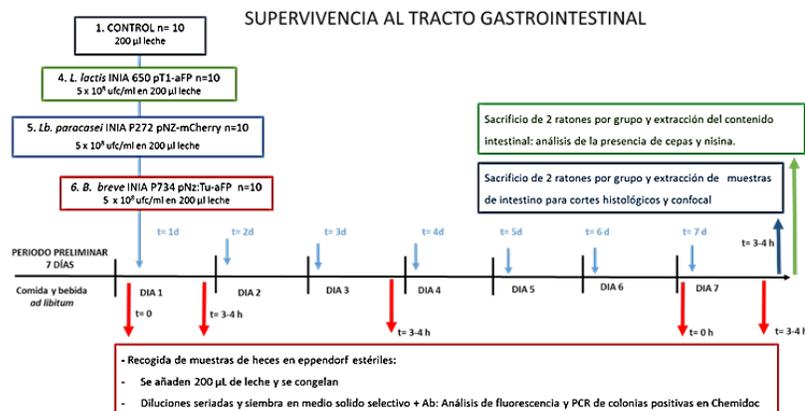
EFECTO INMUNOMODULADOR-PROTECTOR

Ensayos *in vivo*

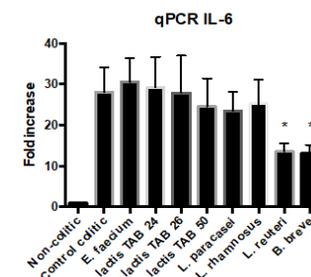
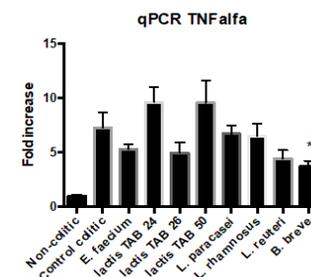
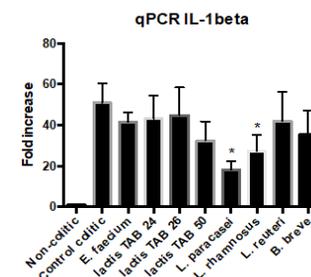
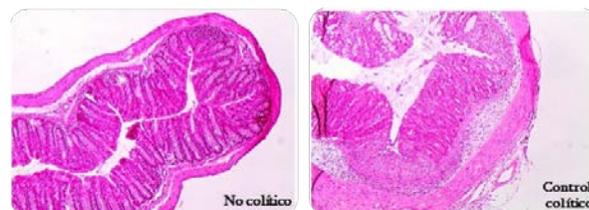
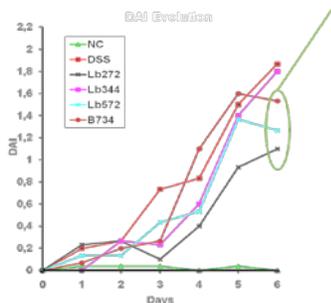
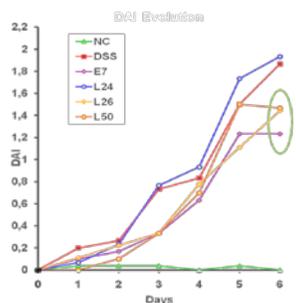
Supervivencia al paso por el TGI → CD-1



Proteínas fluorescentes



Modelo de colitis inducida por DSS (Dextran Sulfate Sodium) → C57BL/6: Valoración del proceso inflamatorio



DAI:
índice de la enfermedad

Histología

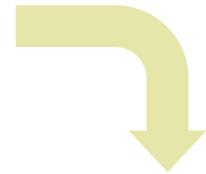
Marcadores proinflamatorios:
- Inmunomodulación
- Permeabilidad intestinal

EFECTO INMUNOMODULADOR-PROTECTOR

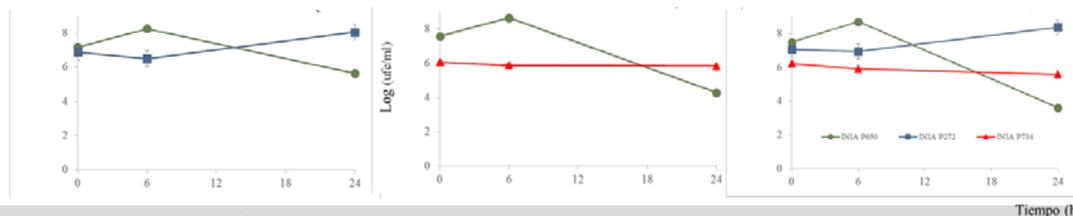
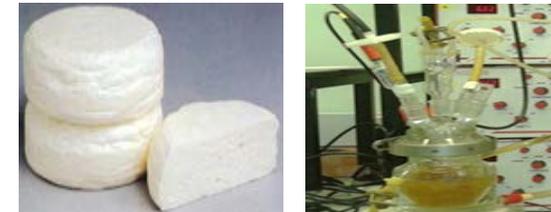
Inmunomodulación

Permeabilidad intestinal

	DAI	IL-1 β	IL-6	TNF α	MMP-9	iNOS	ICAM-1	MCP-1	MUC-2	ZO-1	occl
<i>Ec. faecium</i> 607	+										
<i>Lc. lactis</i> 624										+	
<i>Lc. lactis</i> 626	+					+					
<i>Lc. lactis</i> 650	+								+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> P272	++	+			+	+	+	+			
<i>Lb. rhamnosus</i> P344	+/-	+				+	+				
<i>Lb. reuteri</i> P572	+		+			+	+	+			
<i>B. breve</i> P734	+		+	+	+	+	+	+			

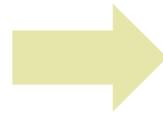
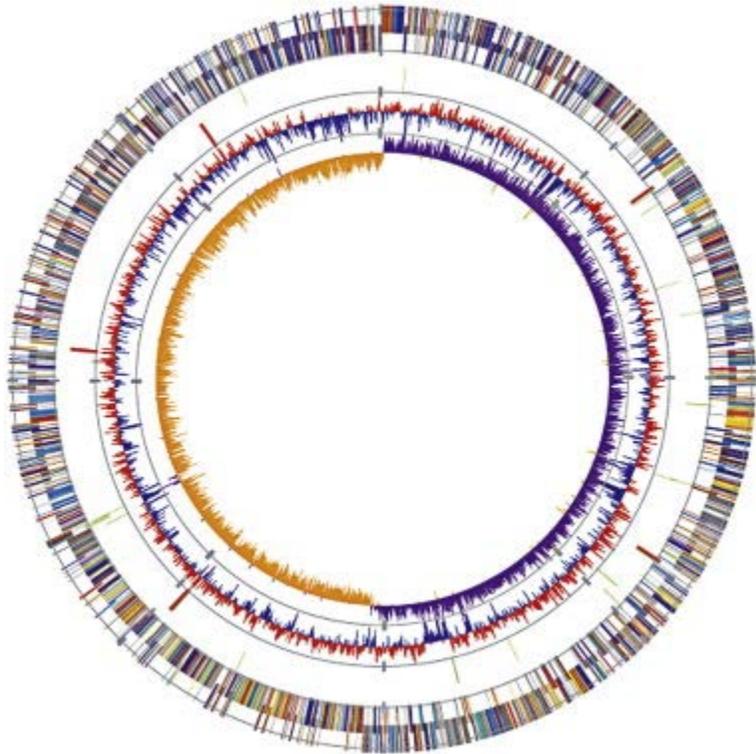


PRODUCTOS
MULTICEPA



- **Illumina MiSeq Sequencing System**

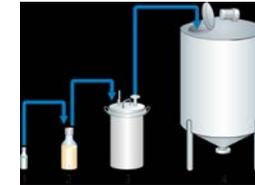
Predicción de determinantes de resistencia a antibióticos, factores de virulencia o determinantes genéticos asociados con la interacción con el hospedador.



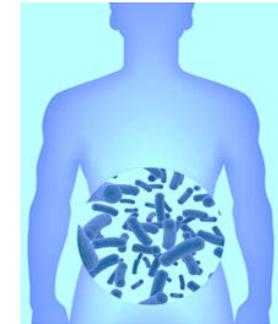
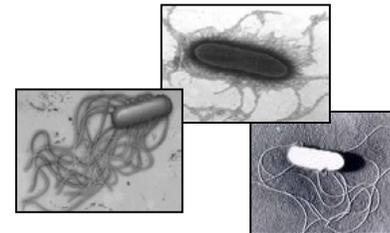
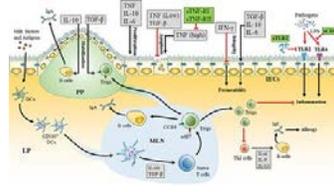
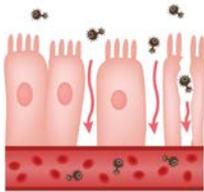
EVALUACIÓN DE LA
SEGURIDAD ALIMENTARIA Y
ANÁLISIS FUNCIONAL



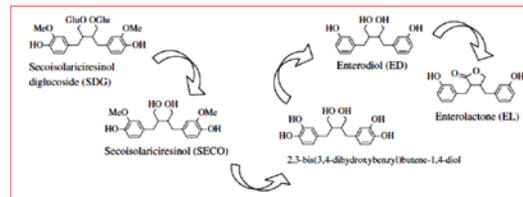
➤ Propiedades tecnológicas para desarrollar alimentos funcionales



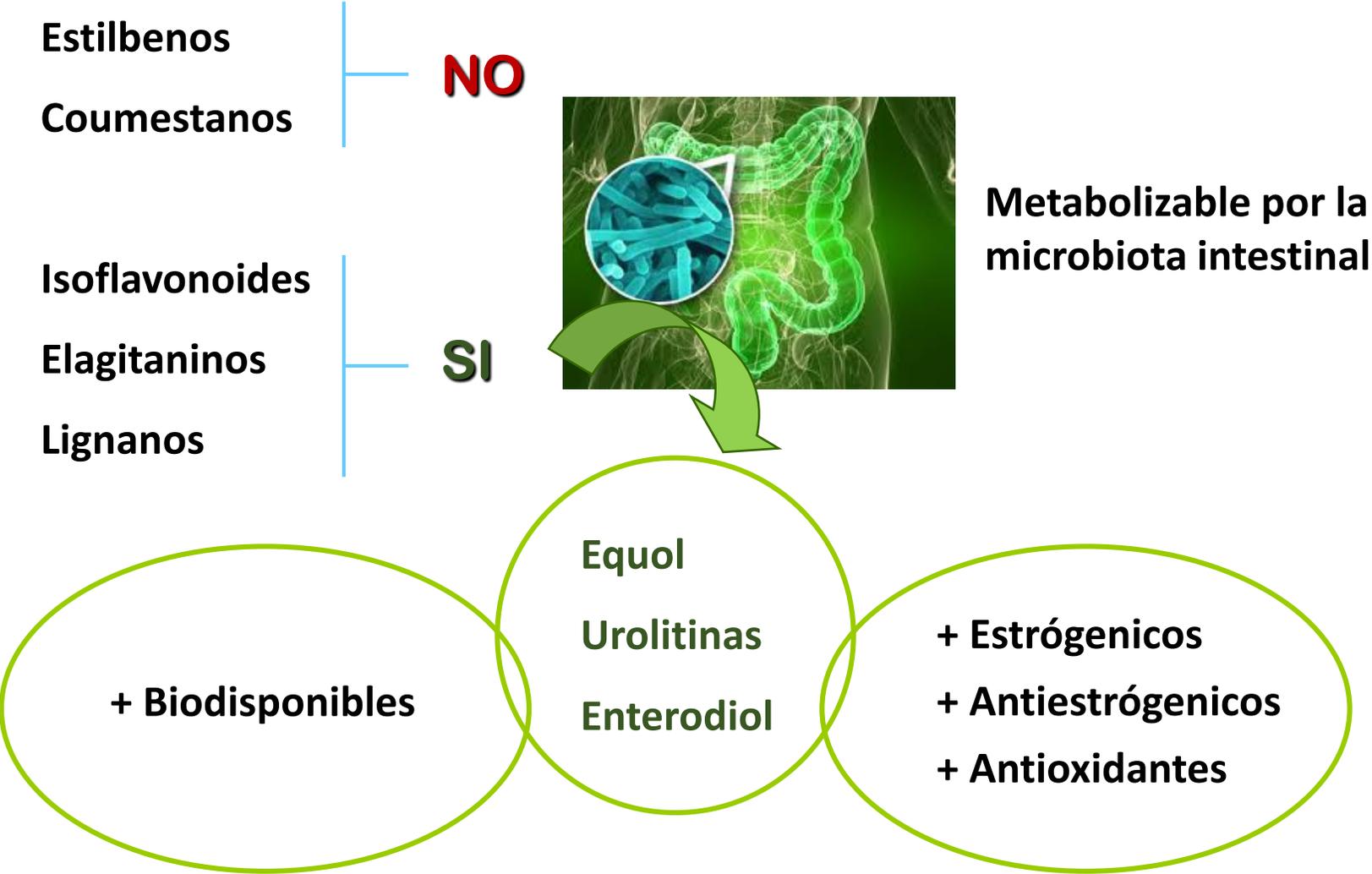
➤ Características y efecto probiótico



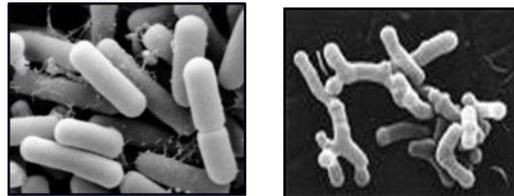
➤ Metabolismo de fitoestrógenos



METABOLISMO DE FITOESTRÓGENOS



- ✓ **Cepas con buenas propiedades tecnológicas capaces de metabolizar fitoestrógenos en alimentos**



- ✓ **Cepas probióticas capaces de metabolizar fitoestrógenos en intestino**

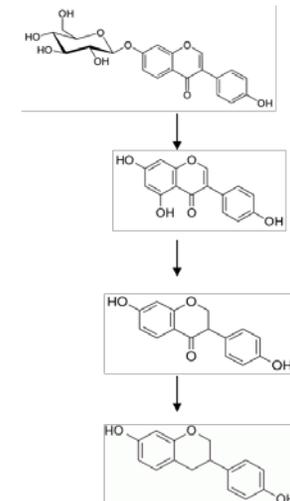


Equol
Urolitinas
Enterodiol

METABOLISMO DE FITOESTRÓGENOS

- Metabolismo de isoflavonas en bebidas de soja.

Cepas	Isoflavonas bioactivas
<i>Lb. salivarius</i> INA P183	Daidzein, genistein, glicitein
<i>Lb. rhamnosus</i> INIA P226	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>Lb. rhamnosus</i> INIA P508	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>Lb. paracasei</i> INIA P461	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>Lb. mucosae</i> INIA P508	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>Lb. rhamnosus</i> INIA P535	Daidzein, genistein, glicitein , O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA
<i>Lb. rhamnosus</i> INIA P540	Daidzein, genistein, glicitein , O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA
<i>Lb. reuteri</i> INIA P572	Daidzein, genistein, glicitein , 6-hidroxi-O-DMA
<i>Lb. plantarum</i> ES1144	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>B. breve</i> INIA P367	Daidzein, genistein, glicitein , 6-hidroxi-O-DMA
<i>B. bifidum</i> INIA P466	Daidzein, genistein, glicitein , O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA
<i>B. longum</i> INIA P678	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>B. catenulatum</i> INIA P732	Daidzein, genistein, glicitein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA
<i>B. adolescentis</i> INIA P784	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>B. pseudocatenulatum</i> INIA P815	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>B. animalis</i> INIA P900	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol
<i>B. pseudocatenulatum</i> INIA P946	Daidzein, genistein, glicitein , Dihidrodaidzein, O-DMA, 6-hidroxi-O-DMA, 4-hidroxi-equol

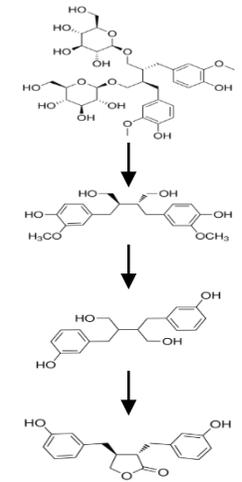


METABOLISMO DE FITOESTRÓGENOS

- **Metabolismo de lignanos y flavonoides desde semillas de lino en medio de cultivo o extractos de lignanos en leche.**



Cepas	Lignanos-Flavonoides de interés
<i>B. bifidum</i> INIA P466	SECO, enterodiol, Kampferol y naringenin
<i>B. catenulatum</i> INIA P732	SECO, enterodiol, enterolactona, Quercetin, Quercetagenin, Kampferol y naringenin
<i>B. pseudolongum</i> INIA P2	SECO, enterodiol Kampferol y naringenin
<i>B. pseudocatenulatum</i> INIA P946	SECO, enterodiol, enterolactona, Herbactetin, Quercetin, Quercetagenin, Kampferol y naringenin
<i>B. adolescentis</i> INIA P784	SECO, enterodiol Kampferol y naringenin
<i>Lb. salivarius</i> INIA P183	SECO, enterodiol, enterolactona Kampferol y naringenin
<i>Lb. salivarius</i> INIA P448	SECO, enterodiol, enterolactona Kampferol y naringenin
<i>Lb. mucosae</i> INIA P58	SECO, enterodiol, enterolactona Herbactetin, Quercetin, Quercetagenin, Kampferol y naringenin
<i>Lb. rhmanosus</i> INIA P540	SECO, enterodiol, enterolactona Kampferol y naringenin
<i>Lb. plantarum</i> ESI144	SECO, enterodiol, enterolactona Herbactetin, Quercetin, Quercetagenin, Kampferol y naringenin



- **Metabolismo de ac. elágico en medio de cultivo**

Cepas	
<i>B. pseudocatenulatum</i> INIA P815	Urolitinas A y B

