



Encuentro Agrobiotech Innovation (San Cibrao das Viñas, Ourense)

ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Ana Rodríguez González y Pilar García Suárez

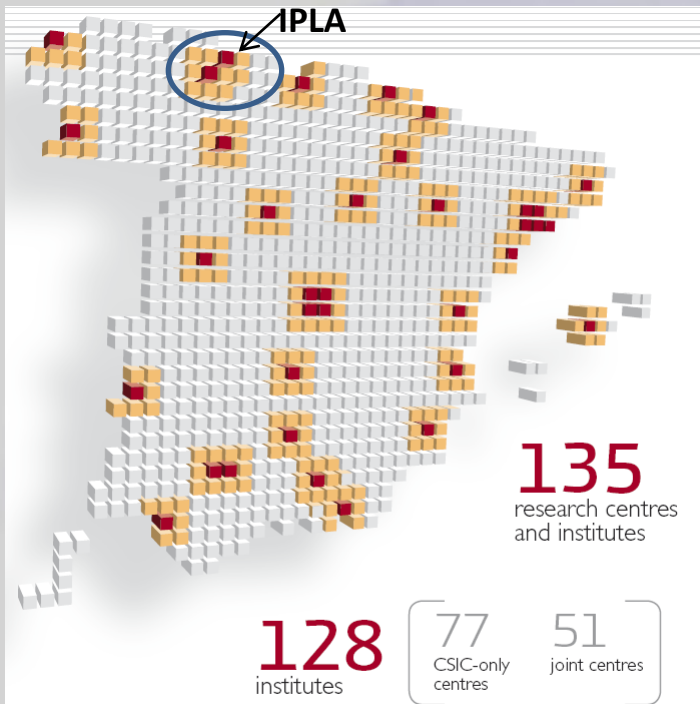
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)



26 y 27 de Noviembre de 2015

AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Mayor institución Pública dedicada a la **investigación** en España y la tercera en Europa.
Depende del **Ministerio de Economía y Competitividad**




- 1 Humanidades y Ciencias Sociales
Humanities and Social Sciences
- 2 Biología y Biomedicina
Biology and Biomedicine
- 3 Recursos Naturales
Natural Resources
- 4 Ciencias Agrarias
Agricultural Sciences

- 5 Ciencia y Tecnologías Físicas
Physical Science and Technology
- 6 Ciencia y Tecnología de Materiales
Materials Science and Technology
- 7 Ciencia y Tecnología de Alimentos
Food Science and Technology
- 8 Ciencia y Tecnologías Químicas
Chemical Science and Technologies

The CSIC is a multidisciplinary organisation, covering the whole range of fields of knowledge, from basic research through to the most advanced technological development. It is organised into eight Scientific Areas.

14.144
Personas trabajan
en el CSIC



4.382
Doctores
Científicos

3.116
Investigadores
en formación



IPLA-CSIC



Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos.

Microbiología molecular

Fermentos lácticos y bioconservación

Físico-química

Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos

Probióticos, prebióticos y exopolisacáridos

Cultivos lácteos funcionales

FERMENTOS LÁCTICOS Y BIOCONSERVACIÓN (DairySafe)



Grupo DairySafe

Pilar García (Científico titular)
Beatriz Martínez (Investigador científico)
Ana Rodríguez (Investigador científico) (Jefe de grupo)

CALIDAD Y SEGURIDAD DE
PRODUCTOS LÁCTEOS



Líneas de Investigación

➤ Diseño de cultivos iniciadores

➤ **Bacteriocinas**

➤ **Bacteriófagos y endolisinas**



BIOCONSERVACIÓN

➤ CALIDAD E INNOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

➤ BIOCONSERVACIÓN

Cultivos iniciadores/protectores
(Bacterias lácticas)



Bacteriocinas
(péptidos antimicrobianos)

Enzimas bioprotectoras
(lisozima, lactoperoxidasa)

Bacteriófagos
+
(enzimas líticos fágicos)

- Biología
- Aplicaciones

¿Qué son?
¿Cómo funcionan?
¿Cómo y dónde se aplican?

CALIDAD



INOCUIDAD

Nutritivo
y
energético



Nutritivo
y
energético

Sano, seguro
y
apetecible

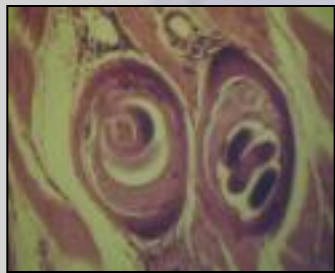


Nutritivo
y
energético

Sano, seguro
y
apetecible

Beneficioso
para
la salud

Macroparásitos



Dinoflagelados

Algas toxigénicas



Protozoos

Giardia
Entamoeba
Cryptosporidium

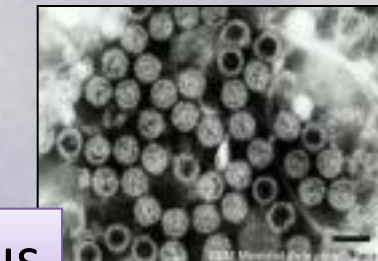
Aspergillus
Fusarium
Penicillium

Hongos

Bacterias

Salmonella
E. coli
Vibrio
Campylobacter
Clostridium
Bacillus
Listeria ...

Virus



Rotavirus
Virus de Norkwalk

Priones

Fuentes

- Materias primas
- Manipulación
- Almacenamiento



EFSA Journal 2015;13(1):3991

SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013¹

European Food Safety Authority^{2,3}

European Centre for Disease Prevention and Control^{2,3}

5.196 brotes alimentarios en 2013 (UE)

Francia
España 63,4%
Polonia

44.183 personas afectadas
5.946 hospitalizaciones
11 muertes

Relación directa (comprobada) entre consumo de un alimento y enfermedad en humanos en 839 brotes

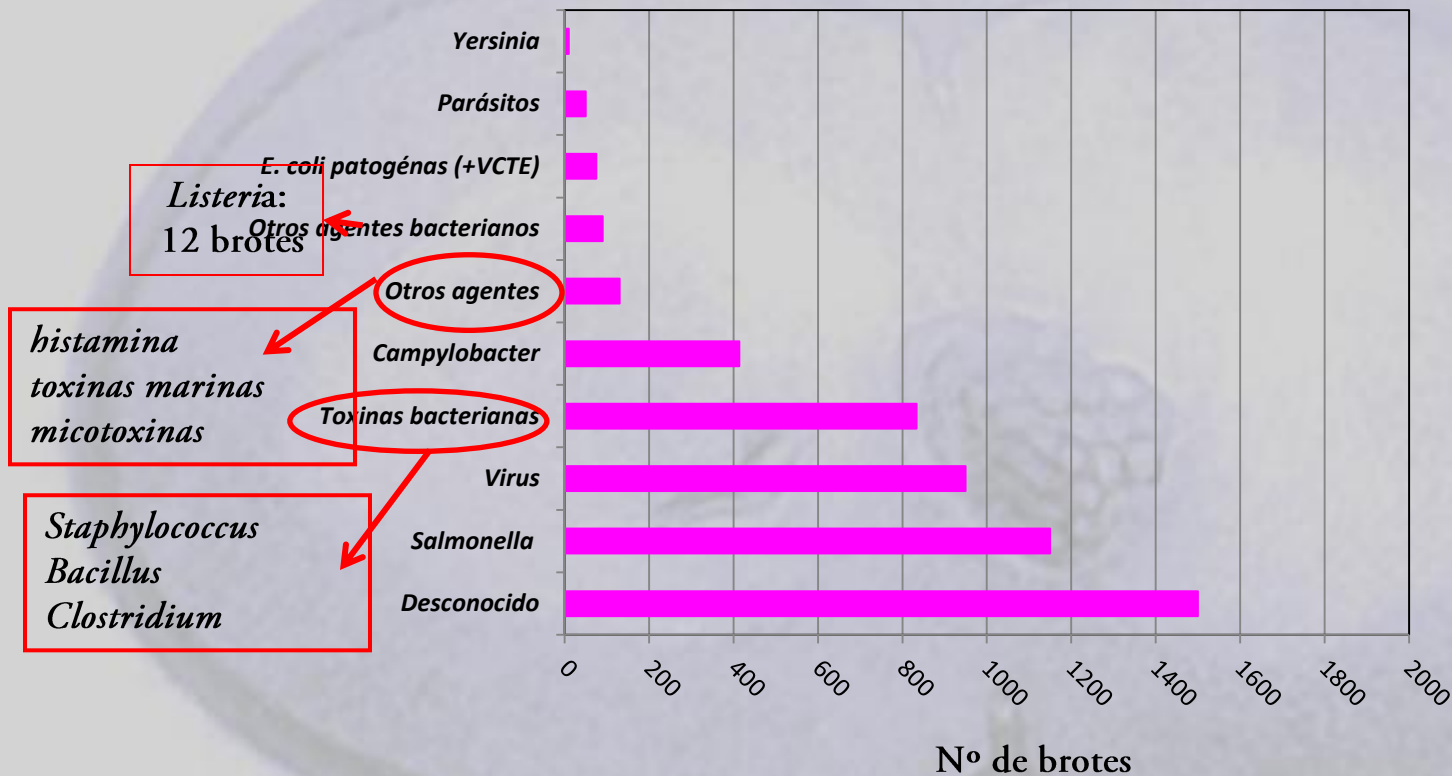


Alimentos implicados en brotes alimentarios



Seguridad Microbiológica en Alimentos

Agentes biológicos implicados en brotes alimentarios (identificado en el 71,1% de los casos)



Ahumado
Secado

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Fermentación

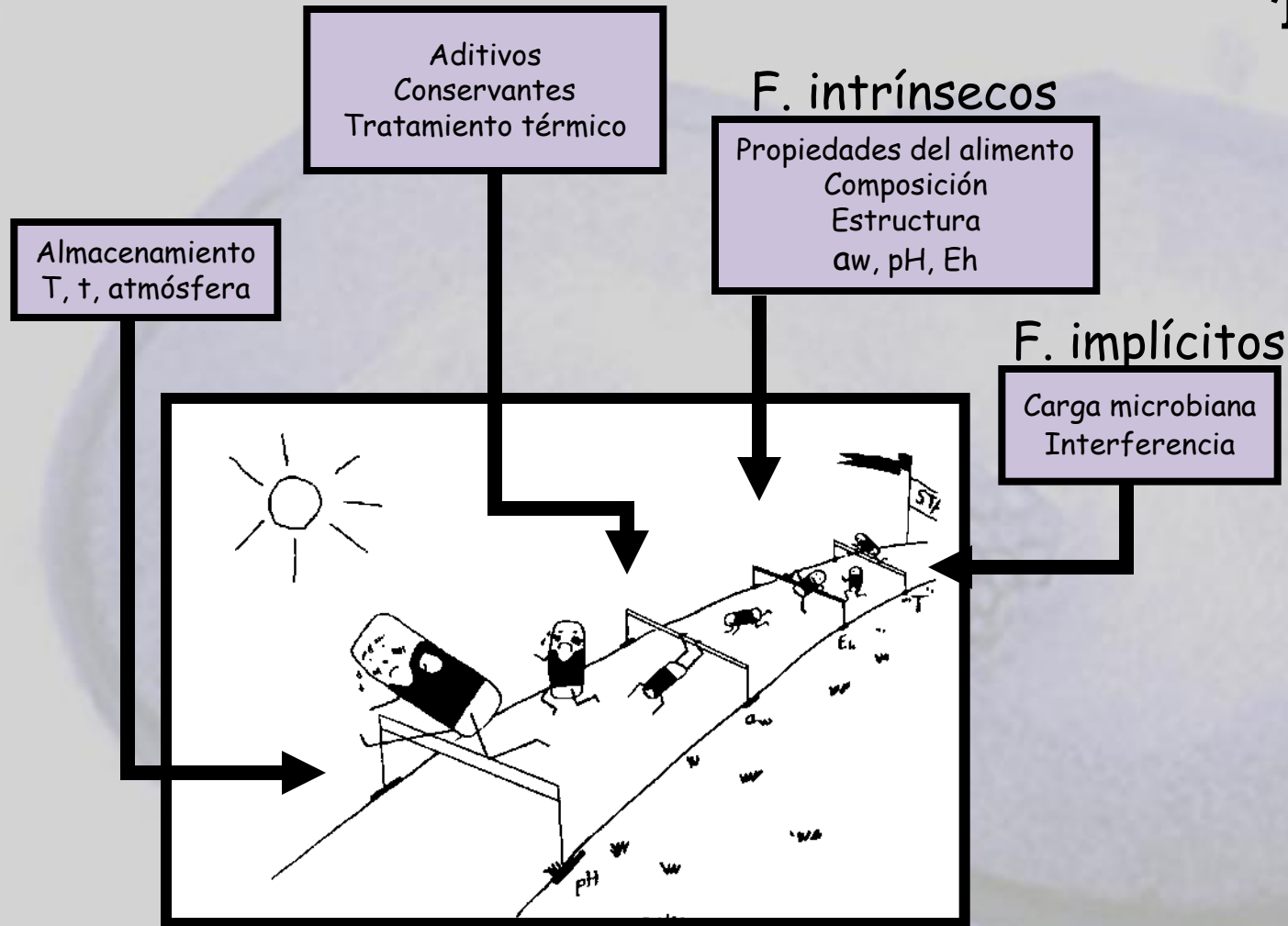
Tratamiento térmico
Congelación y refrigeración
Atmósferas modificadas
Bio → Conservantes
Irradiación



ESTRATEGIAS MÁS
RECIENTES

Altas presiones
Pulsos eléctricos
Ultrasonidos
Pulsos de luz
Campos magnéticos

TECNOLOGÍA DE BARRERAS



Efecto barrera (Leistener, 1995)



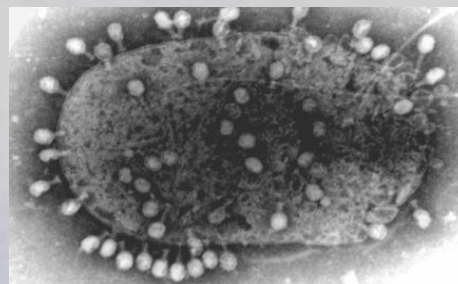
SINERGISMO



- Utilización de microorganismos o de compuestos antimicrobianos de origen animal, vegetal o microbiano para prolongar la **vida útil** de alimentos perecederos y mejorar su **salubridad**



↓
Especias



↓
Bacteriófagos



Estrategias sostenibles de biocontrol de productos lácteos basadas en antimicrobiano de origen biológico

► BIOCONSERVACIÓN

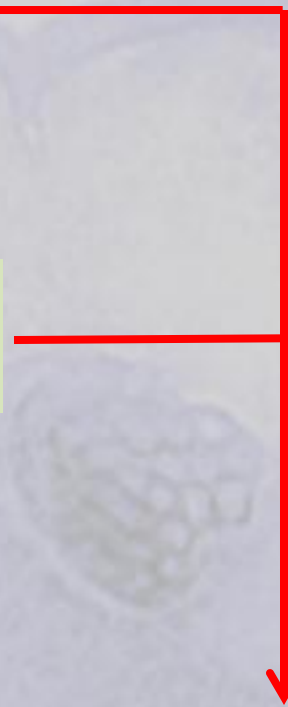


Cultivos iniciadores/protectores
(Bacterias lácticas)

Bacteriocinas
(péptidos antimicrobianos)

Enzimas bioprotectoras
(lisozima, lactoperoxidasa)

Bacteriófagos
+
(enzimas líticos fágicos)



Cultivos iniciadores/protectores (Bacterias Lácticas)

cultivos iniciadores-protectores (para quesería) que, además de fermentar la leche, reduzcan los niveles de microbiota indeseable y el riesgo de intoxicaciones alimentarias

Están constituidos mayoritariamente por bacterias lácticas, implicadas desde tiempo inmemorial en la fermentaciones naturales de las materias primas

- ✚ Fermentaciones naturales
- ✚ Seguras
- ✚ Potencial antimicrobiano



Ácidos orgánicos

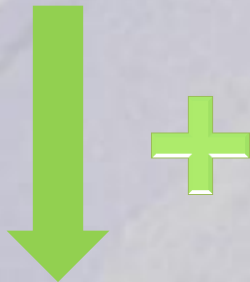
H_2O_2

Compuestos de
bajo peso molecular

BACTERIOCINAS



Ventajas

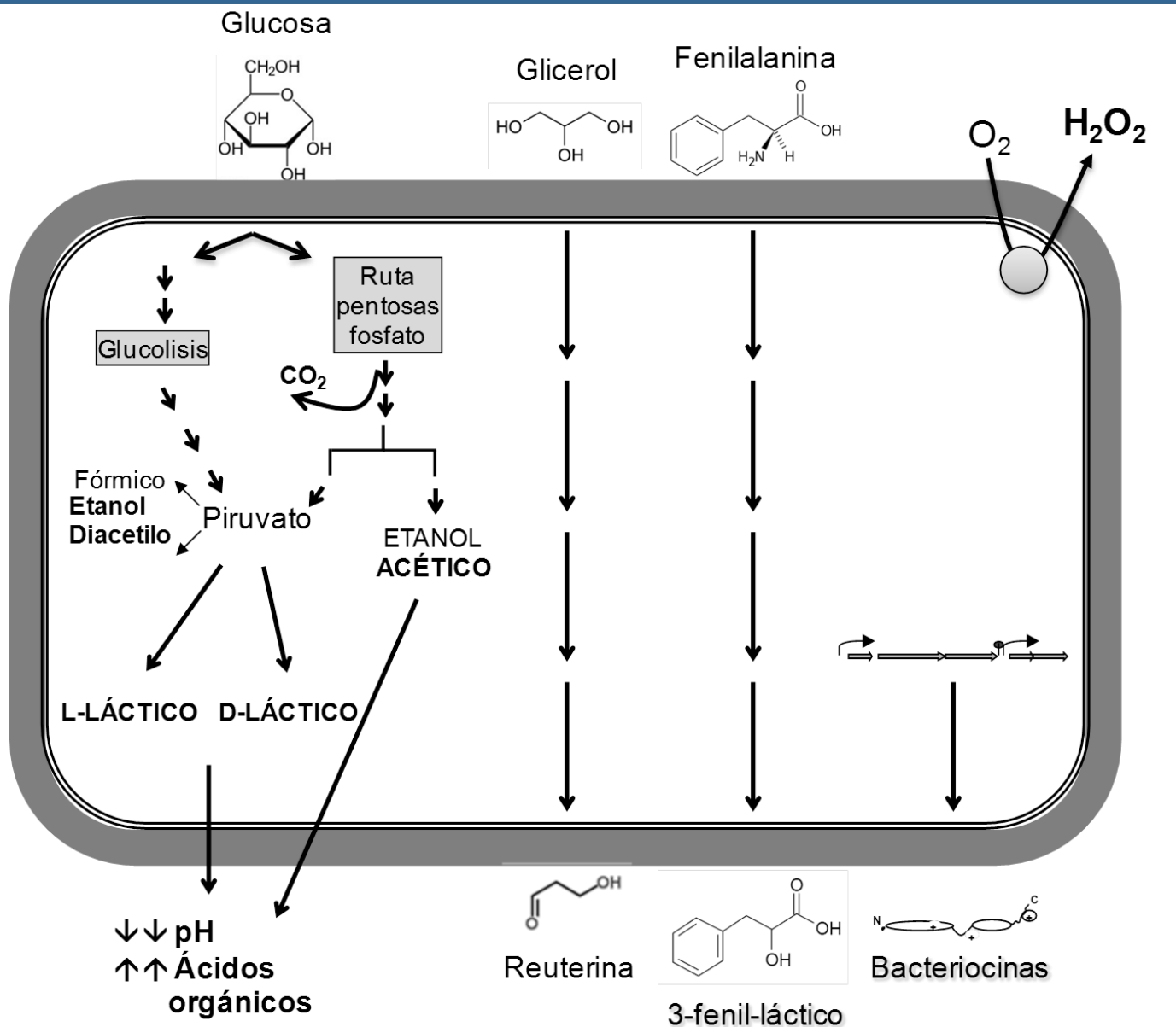


- Aceptación como saludables
- Características organolépticas
- Cadena alimentaria
- Tecnología verde

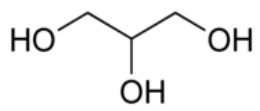
Inconvenientes



- Estudio caso por caso
- Disponibilidad
- Espectro de inhibición



Glicerol



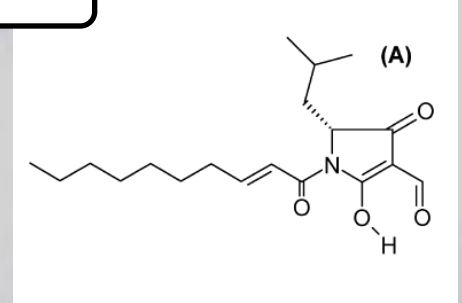
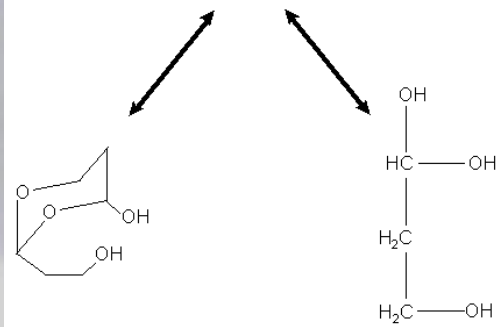
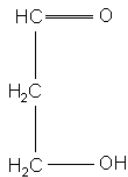
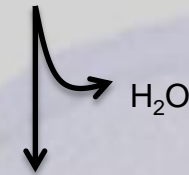
Lb. reuteri



REUTERINA

REUTERICICLINA

3-hidroxy-propionaldehído
3-HPA



N-acil- Ácido tetrámico
Muy hidrofóbico, carga –

- Activa frente a bacterias Gram positivas y negativas, hongos, levaduras y protozoos
- Inhibe (?) enzimas: ribonucleotido reductasa

- Activa frente Gram positivos (0.06 – 0.2 ug/ml)
- Ionóforo de protones → disipa ΔpH

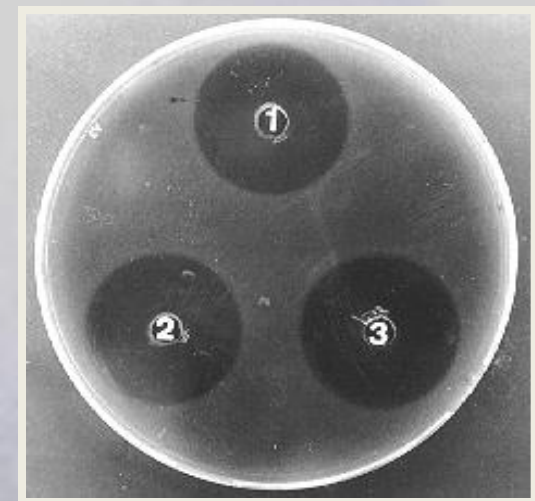
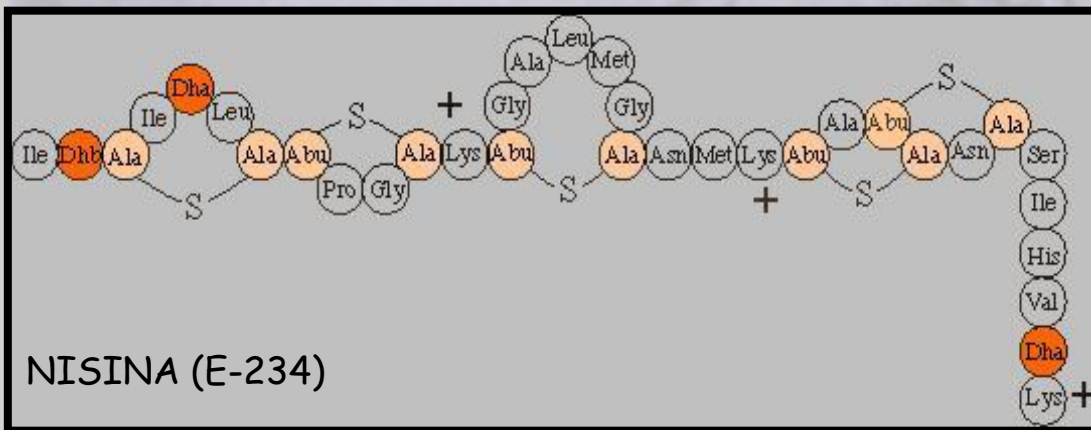
Axelsson *et al.* 1989

Gänzle 2004

Microb. Ecol. Health Dis. 2:131-136.

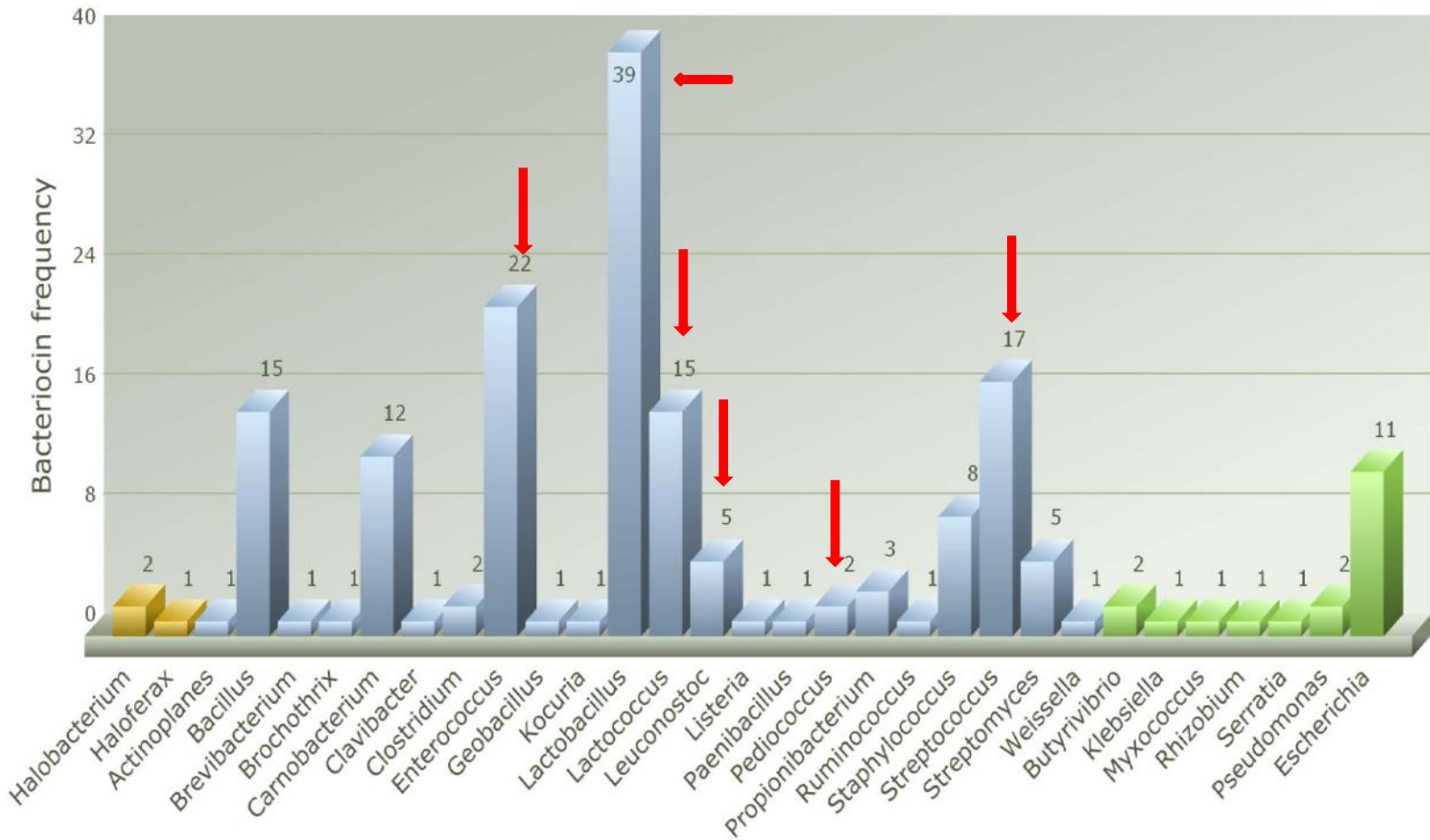
Appl Microbiol Biotechnol 64: 326–332

- ➔ Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal
 - ❖ Péptidos catiónicos (20-60 aa), alto pI, anfipáticos, termorresistentes
- ➔ Tecnológicamente aptas
- ➔ Amplio espectro de inhibición
- ➔ Historia de consumo seguro: BAL



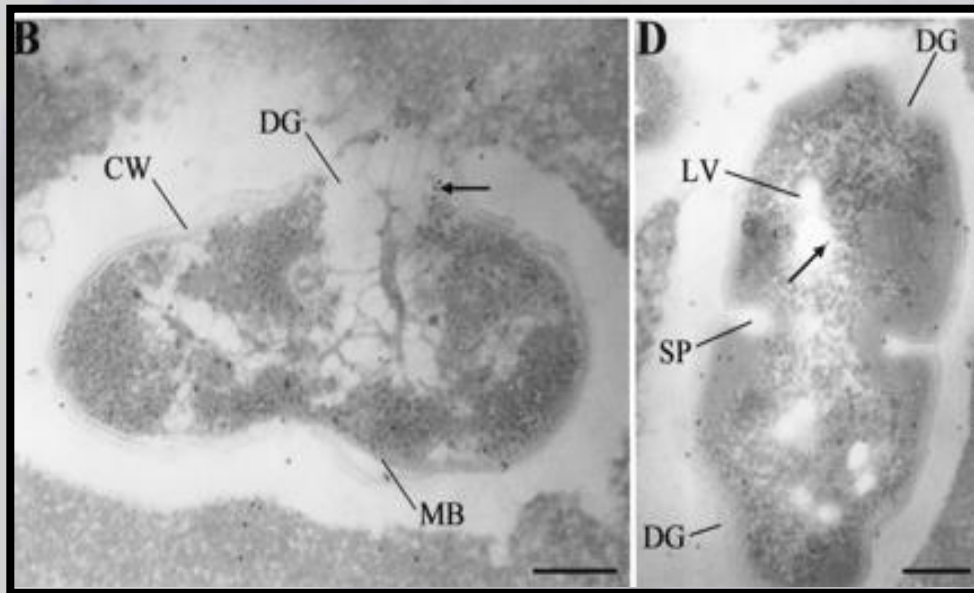
Test de difusión en agar

Figure 1: Distribution of bacteriocins among the producer genera in the BACTIBASE database
[Archea (Yellow), Gram-positive (Blue) and Gram-negative (green)]

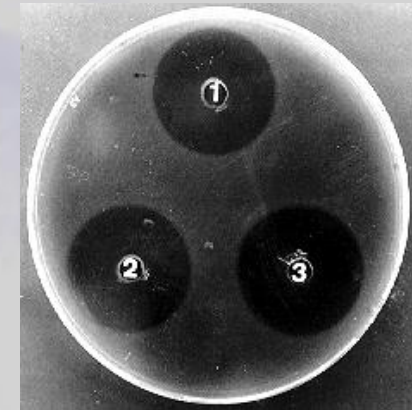


Acción bactericida frente a **Gram positivos**
(*Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, ...)

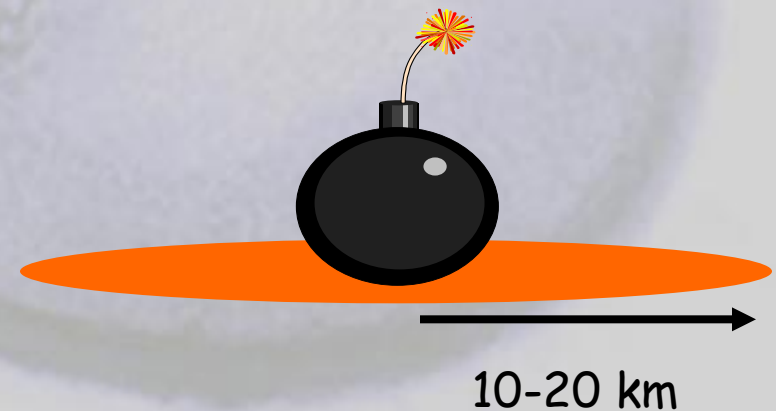
Espectro amplio: nisina, AS-48, pediocina
Espectro restringido: Lcn972, lactococina A



(Benech *et al.*, 2002)

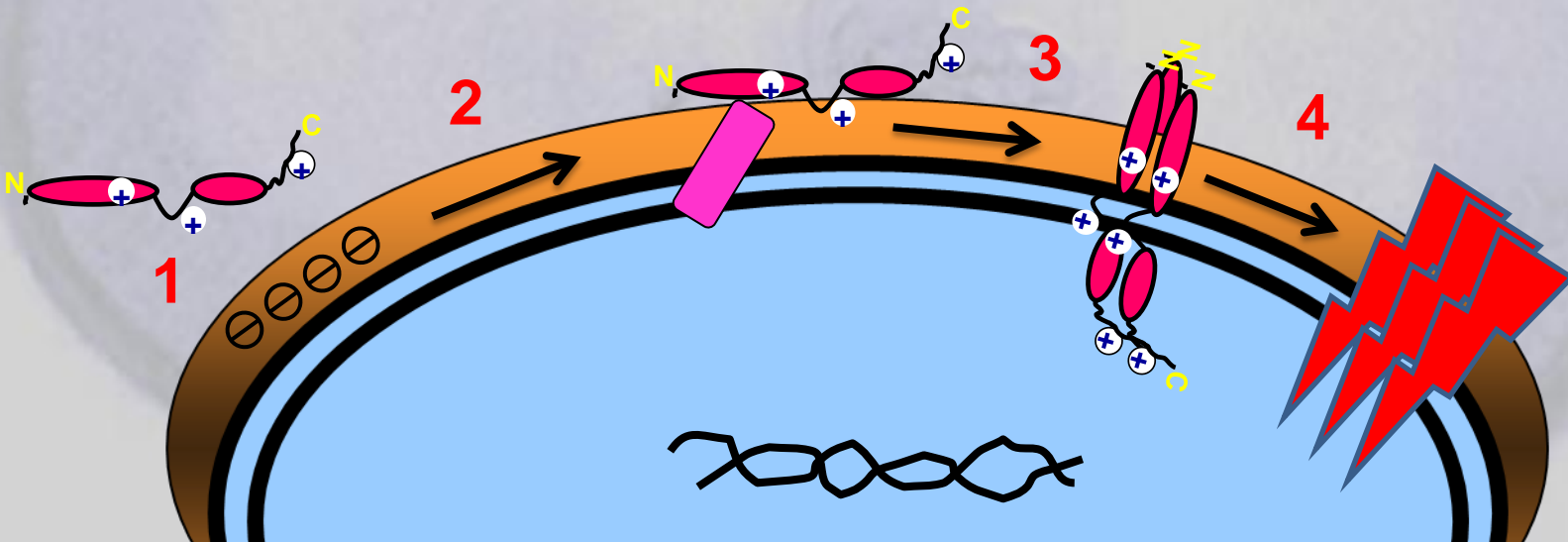


Test de difusión en agar



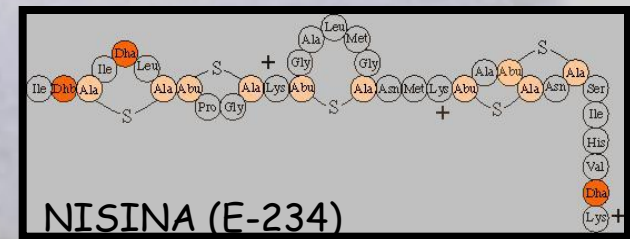
→ Péptidos catiónicos e hidrofóbicos: hélice- α anfipática

1. Interacciones electrostáticas
2. Estructura receptora o de gancho
3. Formación de poros
4. Pérdida de la integridad celular

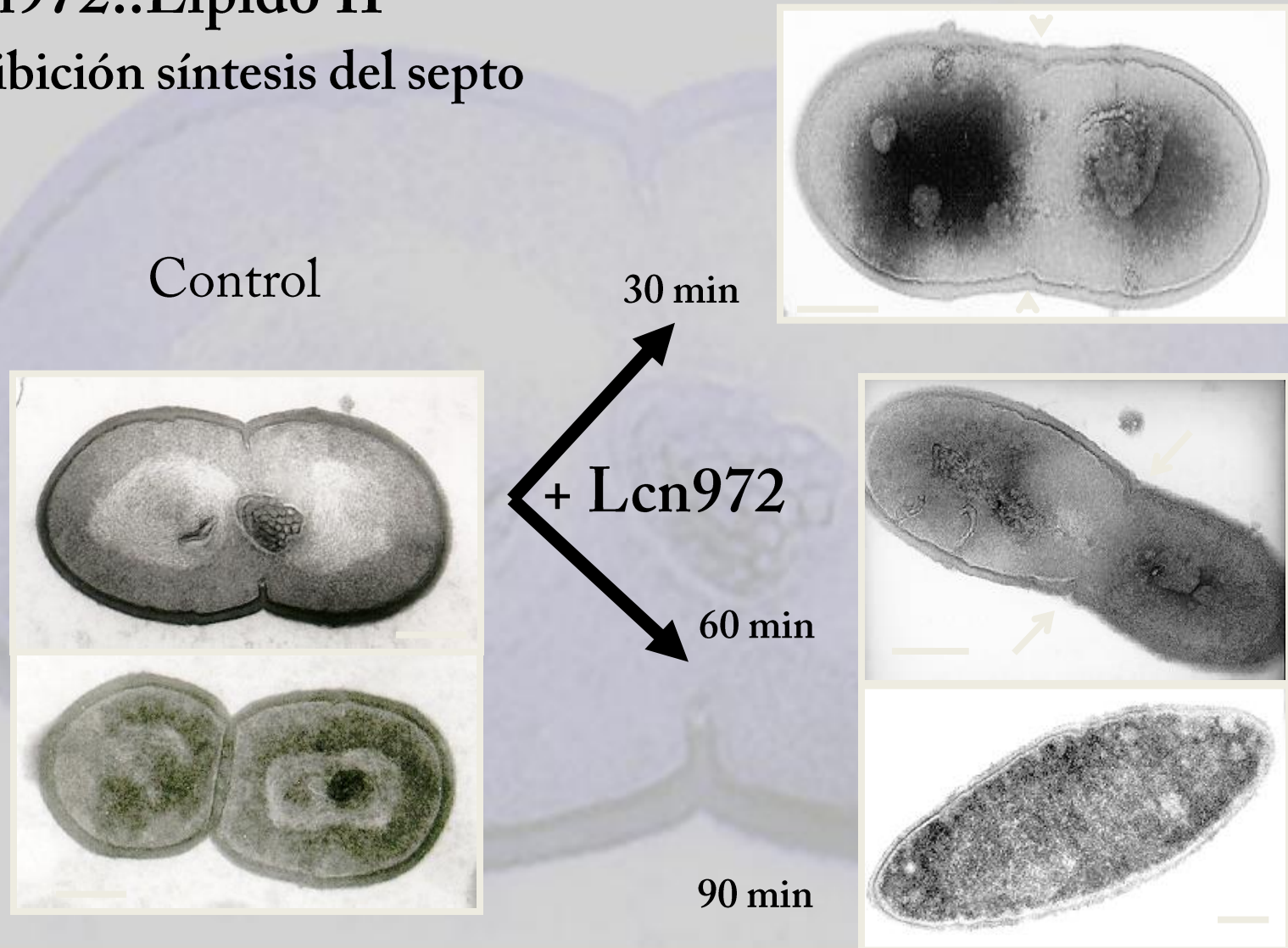


- *Nisina* y otros lantibióticos combinan dos modos de acción en una misma molécula:
 - Inhibición de la síntesis de pared celular
 - Formación de poros
- Factores celulares que determinan el grado de sensibilidad

- Composición de la membrana
- Interacción con proteínas, otros polímeros...



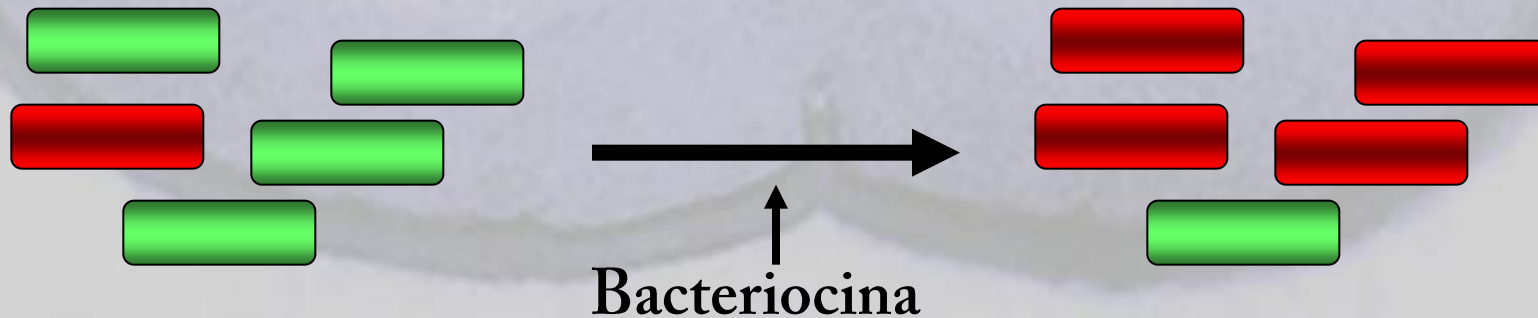
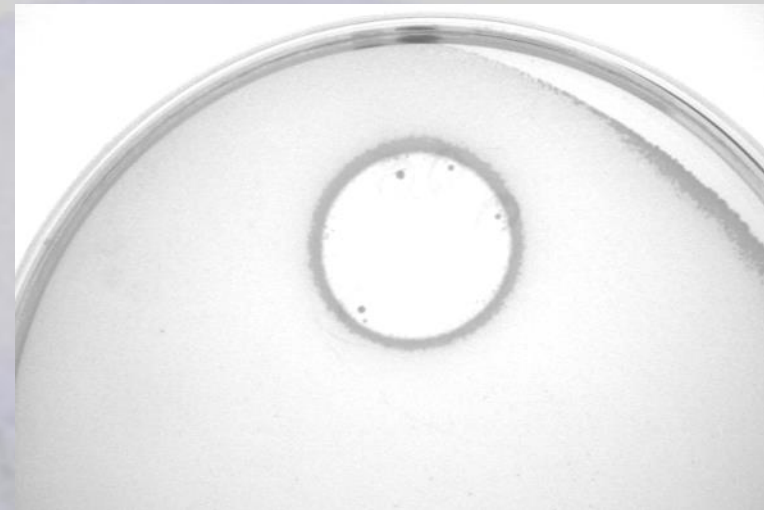
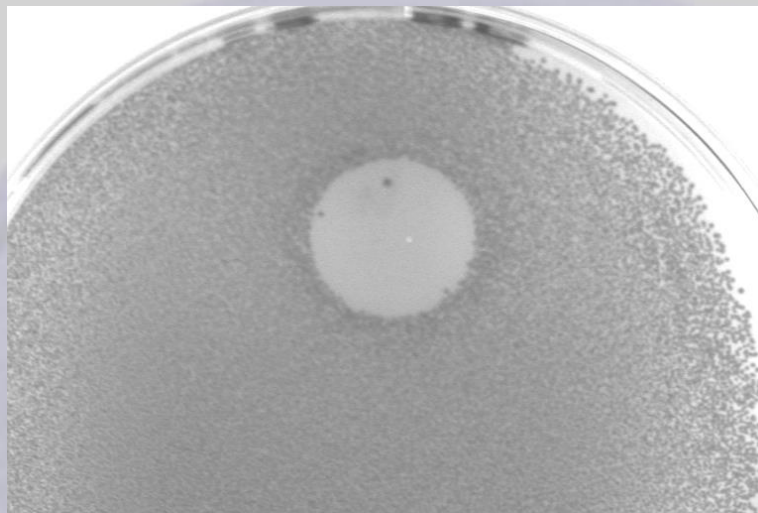
- Lcn972::Lípido II
- Inhibición síntesis del septo



- **Formación de poros**
- **Receptores o moléculas “gancho”**
 - **Lípido II: inhibición de la síntesis de pared celular (Lantibióticos y Lcn972)**
 - **Man-PTS: clase II**
 - **Otros posibles receptores**
- **Otras actividades antimicrobianas**
 - **Activación autolisinas**

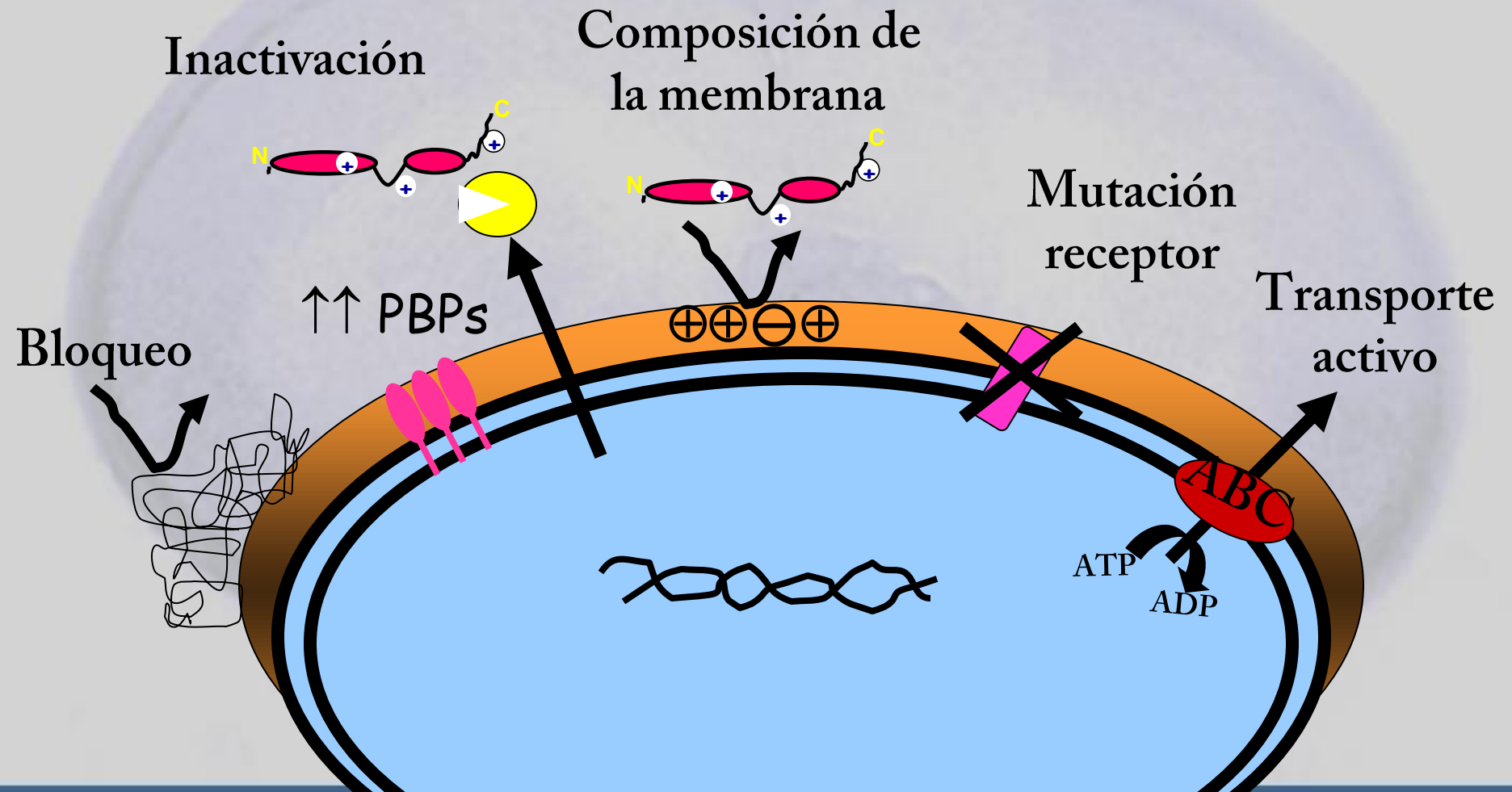


CEPAS RESISTENTES

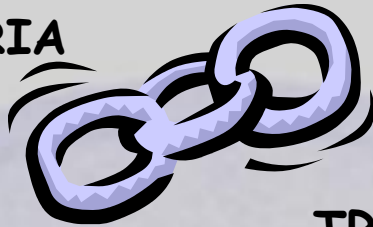




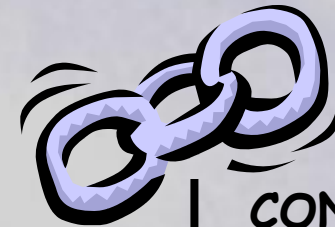
Mecanismos de resistencia



PRODUCCIÓN PRIMARIA

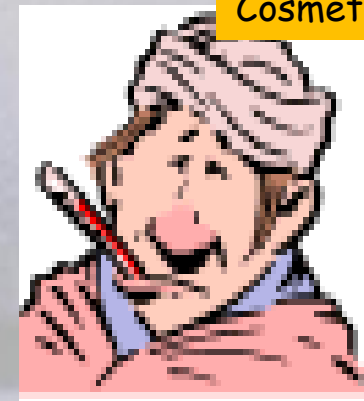


INDUSTRIA TRANSFORMADORA



CONSUMIDOR

Moléculas modelo
Anti-infectivos
Cosmética



Ensilados
Agentes terapéuticos
Probióticos bacteriocinogénicos

Control patógenos/alterantes
Procesos tecnológicos
Tecnología de barreras
Marcadores de grado alimentario

Nisina, Lct3147, pediocina PA-1, AS-48



Producción *in situ*

CULTIVOS INICIADORES/PROTECTORES

Producto de fermentación

Microgard®

INGREDIENTE ALIMENTARIO

ALTA™2431

Bacteriocina purificada

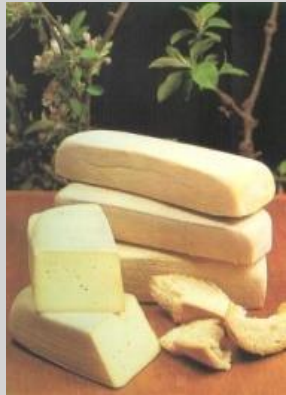
Nisaplín

ADITIVO ALIMENTARIO

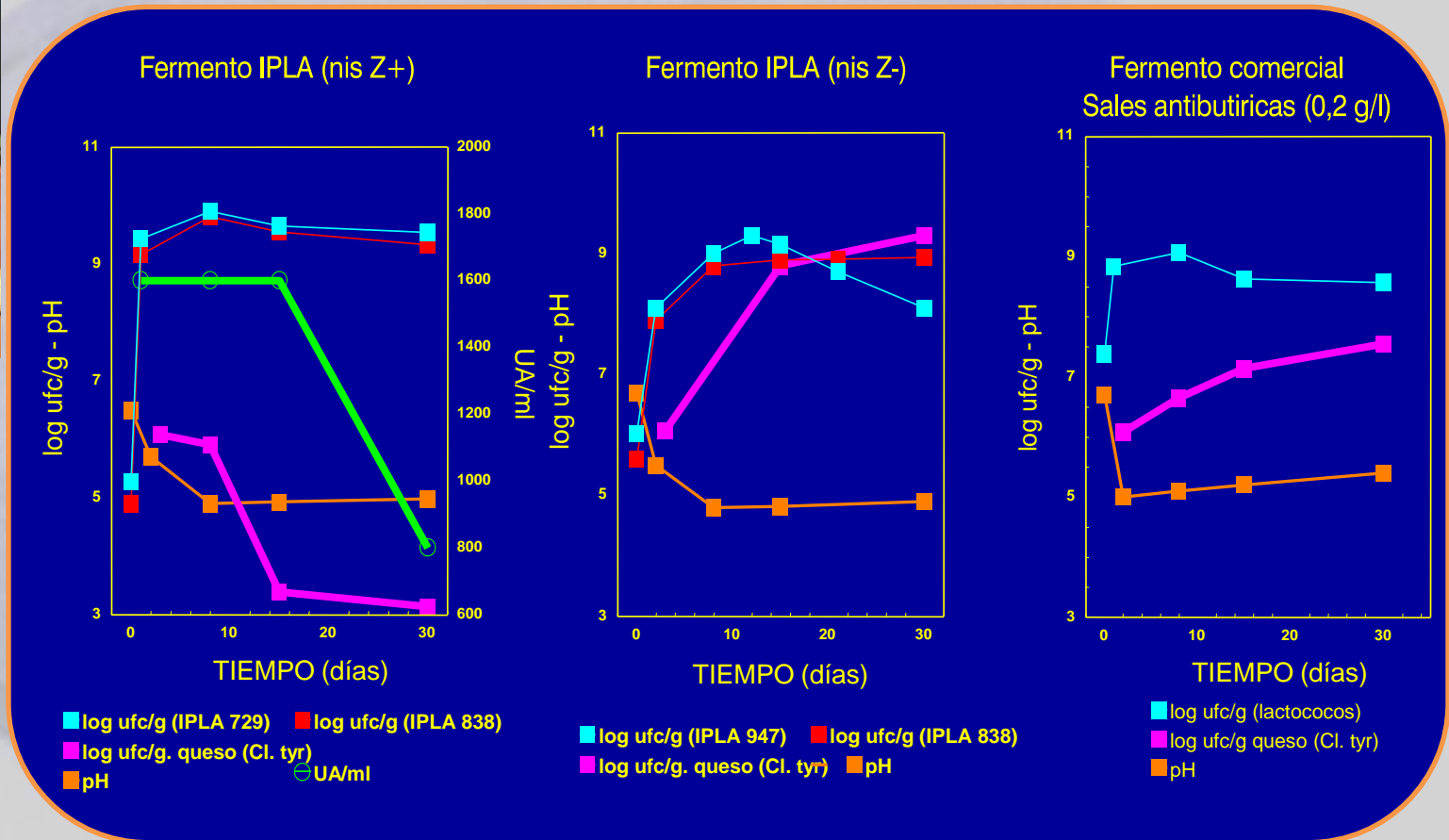
Chrisín

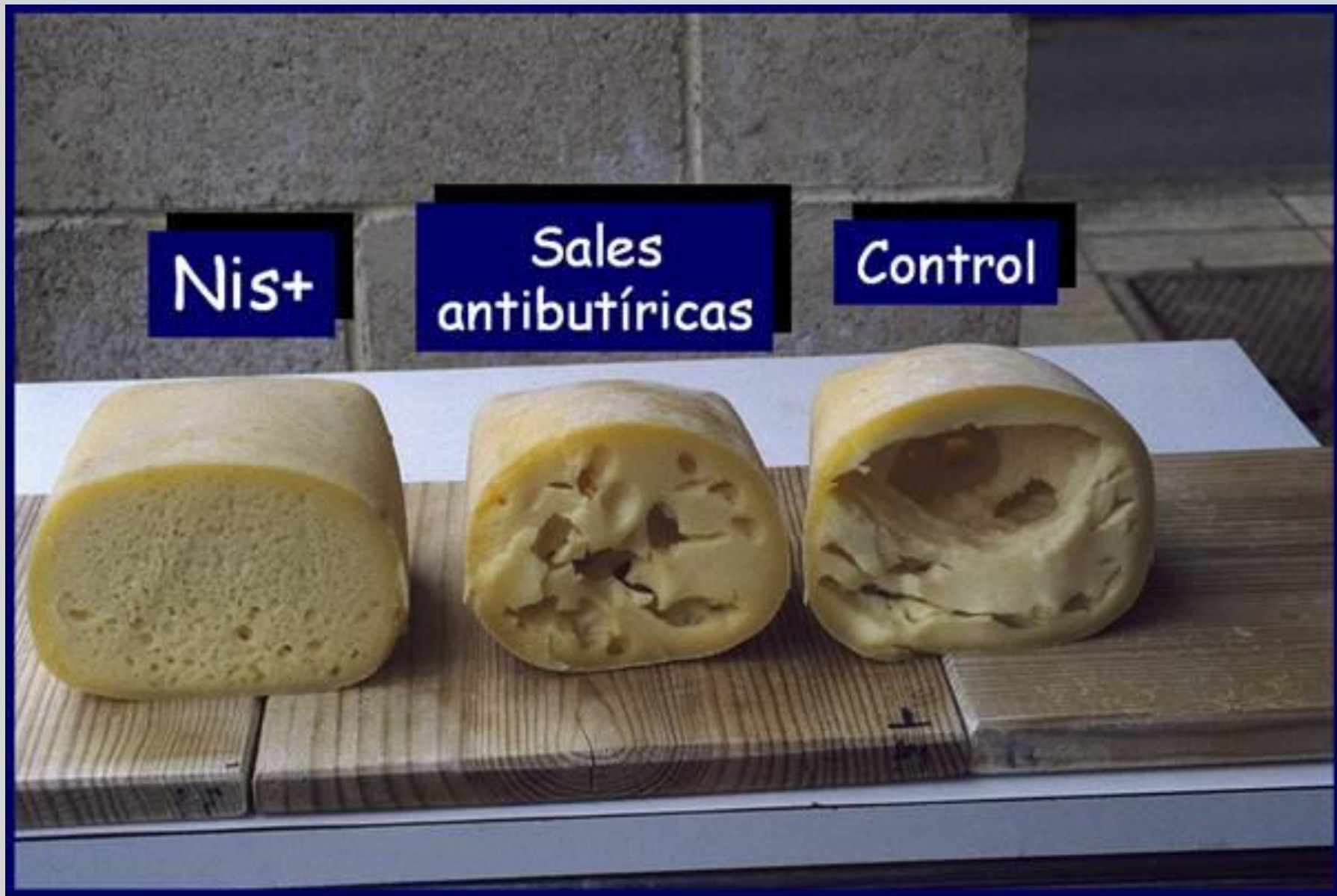
Producción de nisina *in situ*: *L. lactis* IPLA729
 Queso de pasta lavada

Clostridium tyrobutyricum



Vidiago





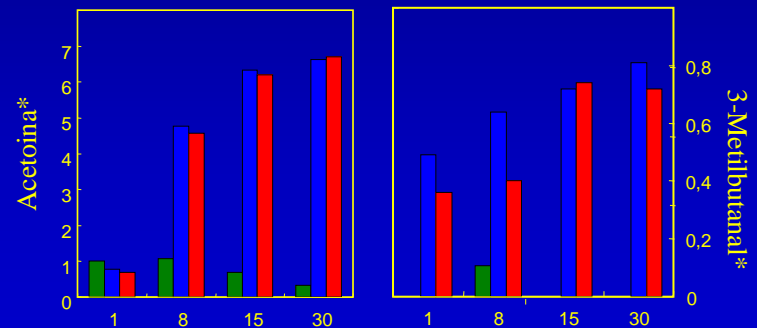
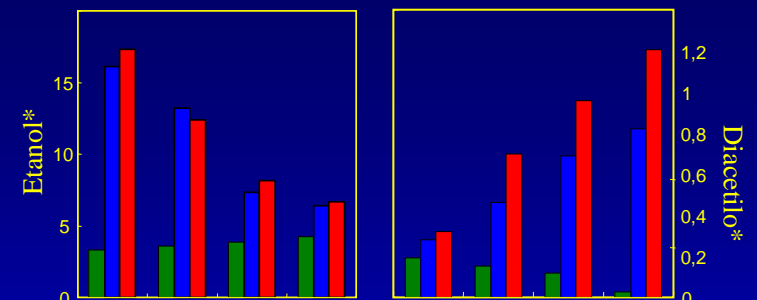
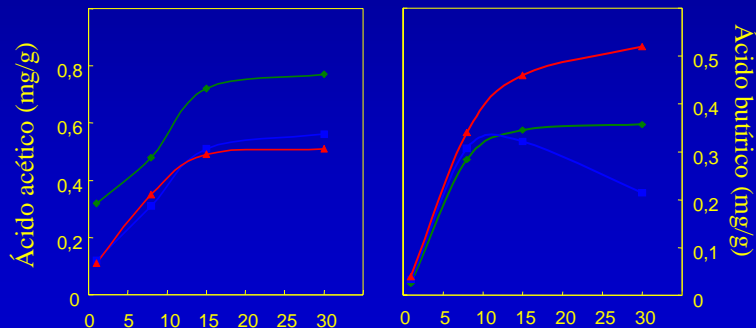
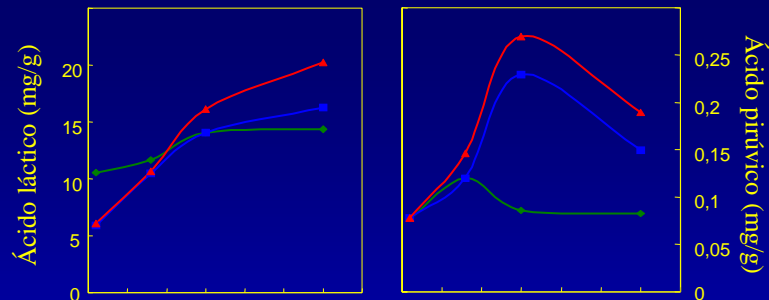
CEPAS AUTÓCTONAS

Ácidos orgánicos y compuestos volátiles

➔ **Características sensoriales propias**



■ Fermento comercial; ■ Fermento IPLA-001; ■ Fermento IPLA-001-nisZ⁺



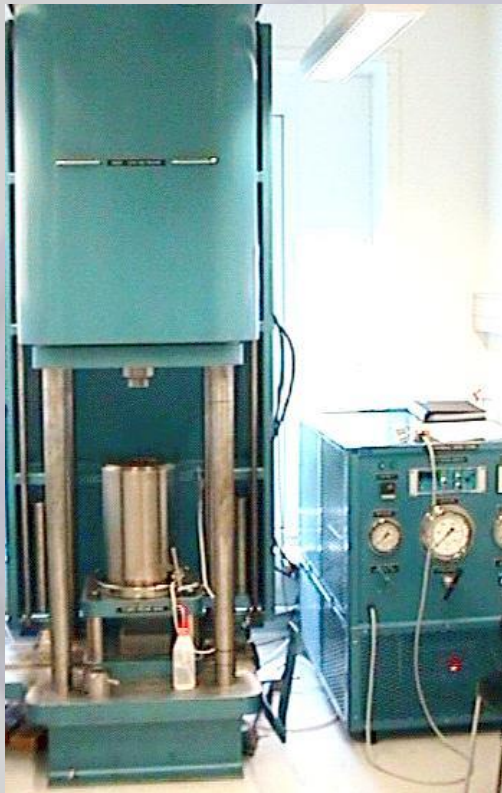
Tiempo de maduración (días)

Tiempo de maduración (días)

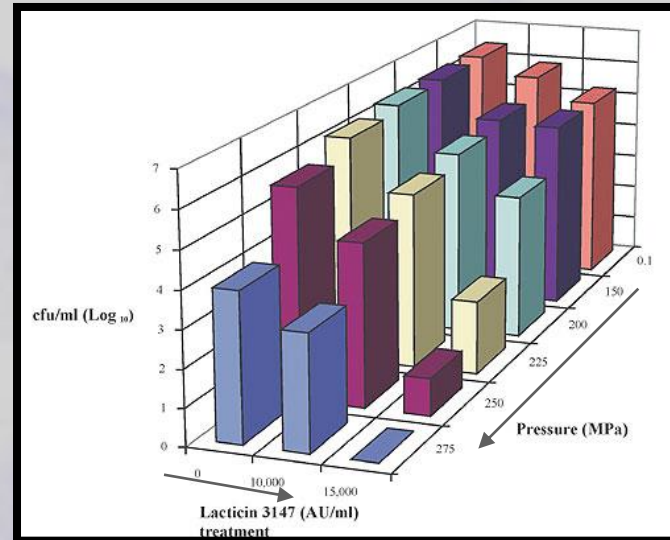


Adición de nisina a los alimentos

ALIMENTO	NISINA ($\mu\text{g/ml}$)	DIANA
Quesos procesados	2.5-15	<i>Bacillus, Clostridium</i>
Leche y derivados	0.25-1.25	<i>Bacillus, Clostridium</i>
Huevo líquido	1.25-5	<i>Bacillus</i>
Sopas pasteurizadas	2.5-6.25	<i>Bacillus</i>
Zumo de frutas	0.75-1.5	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
Carnes procesadas	5-10	Bacterias lácticas, <i>Brocothrix</i>
Enlatados	2.5-5	<i>Geobacillus, Thermoanaerobacterium</i>
Cerveza Menor pasteurización Post-fermentación	0.25-1.25	Bacterias lácticas



EQUIPO DE ALTAS PRESIONES



(Morgan *et al.* 2000)

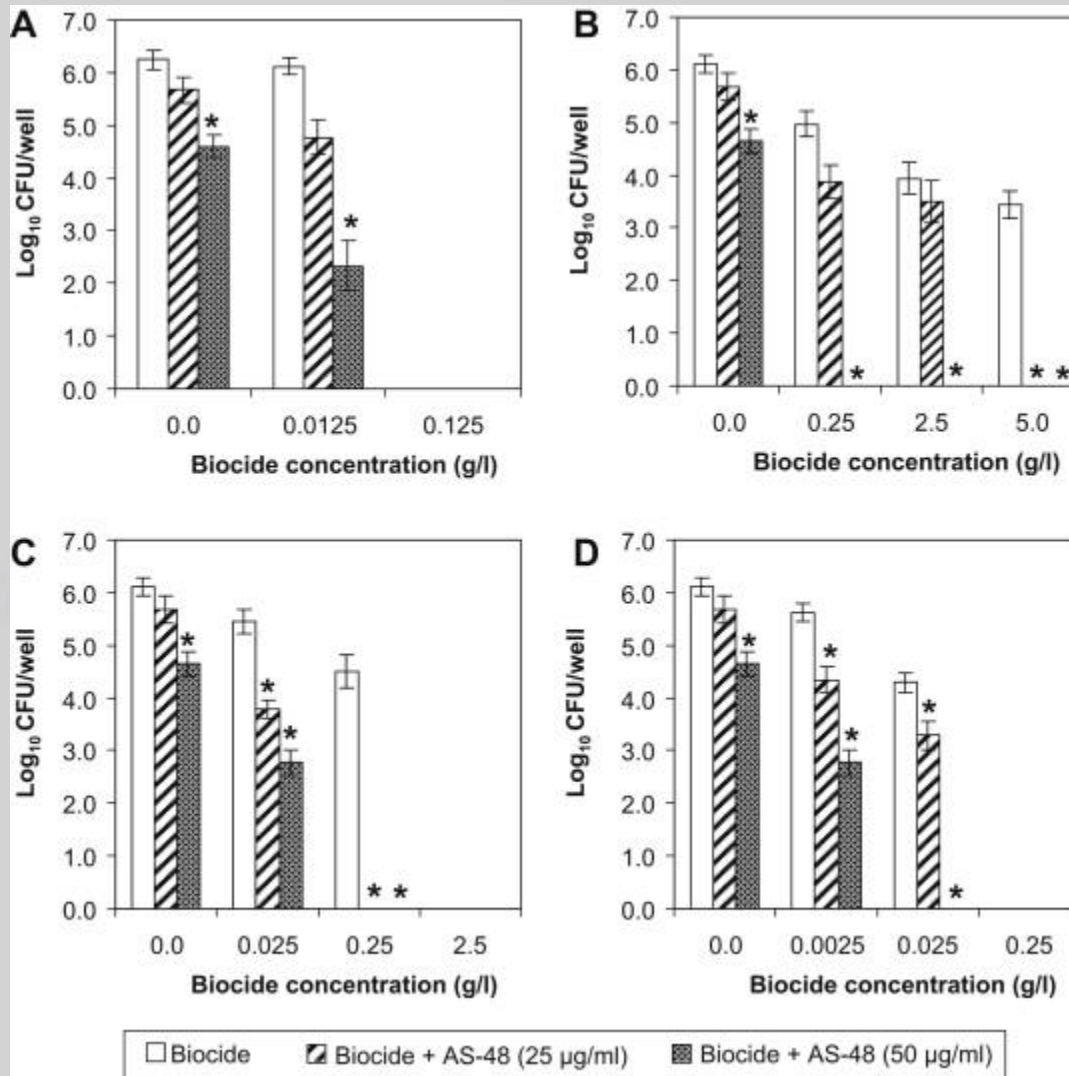
Envasado activo



(Scanell *et al.*, 2000)

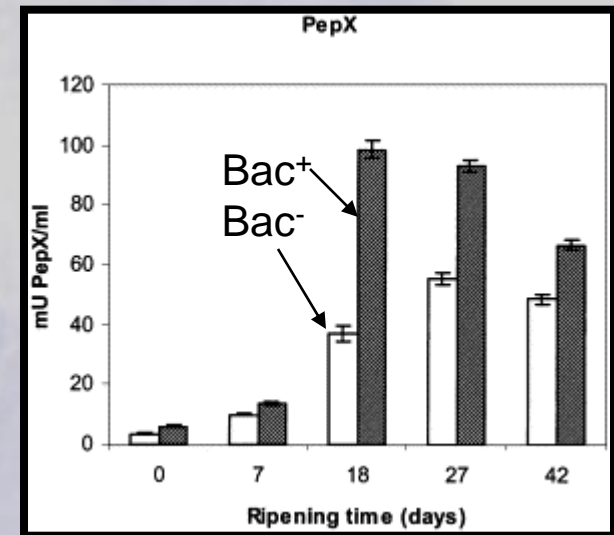
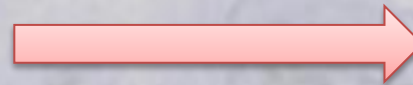
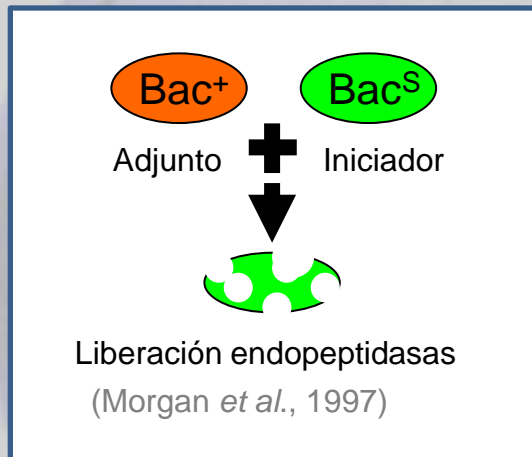
AS-48 + biocidas

L. monocytogenes biofilms



- A. Cloruro de benzalconio
- B. Cetrimida
- C. Hexadecylpyridinium chloride
- D. Didecildimethylammonium bromide

Maduración acelerada



(Martínez-Cuesta *et al.*, 2001)

+ Espectro de inhibición

- No hongos ni levaduras
- No Gram -

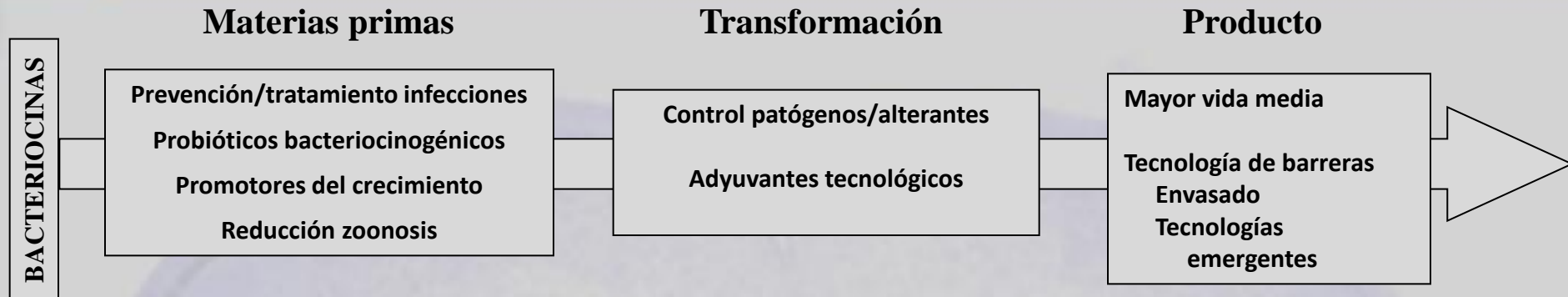
+ Inestabilidad en los alimentos

- Inactivación
- Distribución irregular



Agentes quelantes
Varias bacteriocinas
Otras barreras

Ingeniería de proteínas
Producción *in situ*



Investigación básica

Cultivos iniciadores autóctonos

Tecnología de barreras

Campos de aplicación
(Ensilados)

Probióticos

Microbiota intestinal

BIOCONTROL MEDIANTE BACTERIÓFAGOS/PROTEÍNAS FÁGICAS



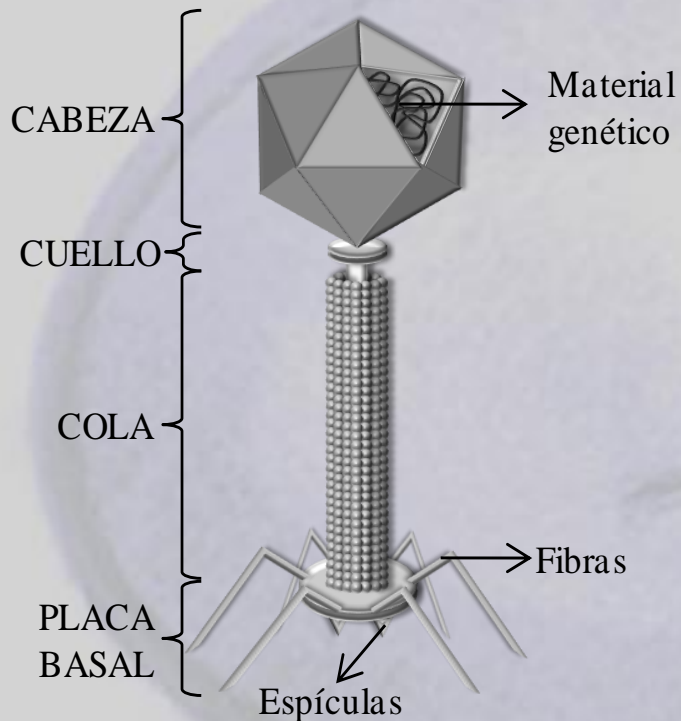
BIOCONSERVACIÓN

La bioconservación es la utilización de microorganismos, incluidos bacteriófagos, sus productos metabólicos o ambos para conservar los alimentos (Montville & Chikindas, 2007).

DESINFECTANTES BIOLÓGICOS

La desinfección aprovecha la capacidad de los bacteriófagos y de algunas proteínas fágicas para eliminar los biofilms.

➤ Los Bacteriófagos



- Virus que infectan exclusivamente a bacterias.
- Inducen la lisis de la bacteria a final de su ciclo de desarrollo
- Especificidad
- Inocuidad
- Abundancia: $10E31$ partículas totales

Capacidad antimicrobiana de bacteriófagos

1

Reconocimiento

2

Adsorción

Penetración

4

Replicación

Lisis

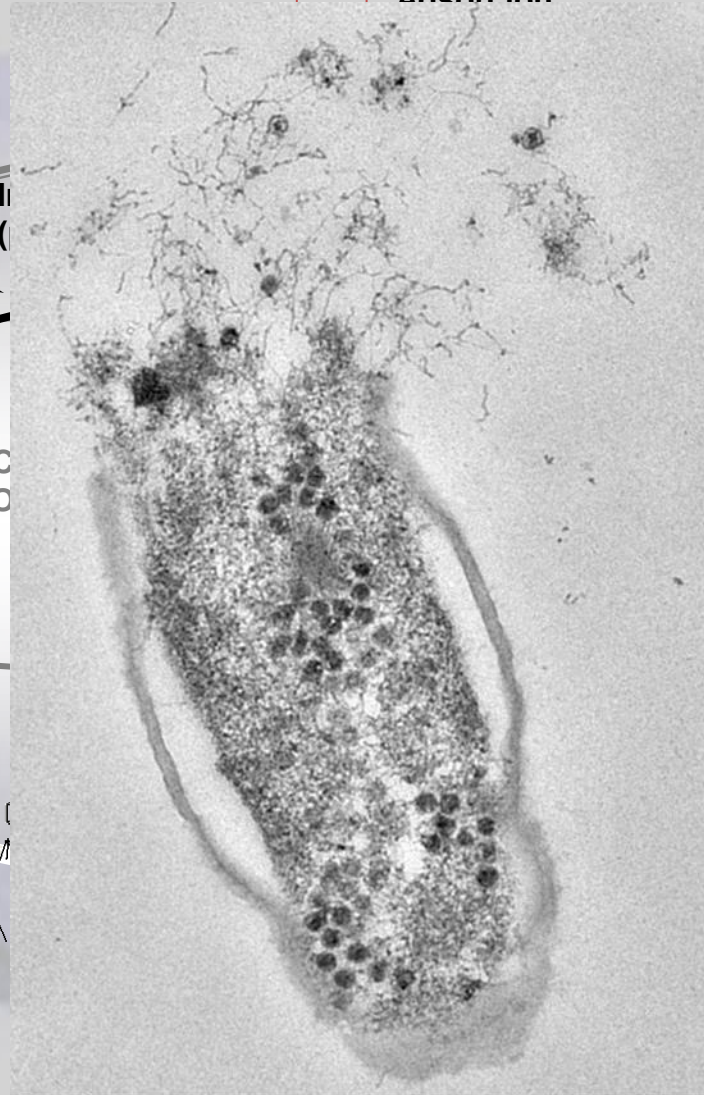
7

Lisis

Bacteriófago

Señales ambientales

LISIS



100 nm



Terapia fágica y biocontrol

Antibióticos

Cepas resistentes

1917

1920-1930

1940

Actualidad

Terapia fágica
FAGICA

BIOCONTROL

ropa del Este

Humanos

intralytix
SAFETY BY NATURE™

AgriPhage™

PHAGETYPH
BACTERIOPHAGUM SALMONELLAE TYPHI

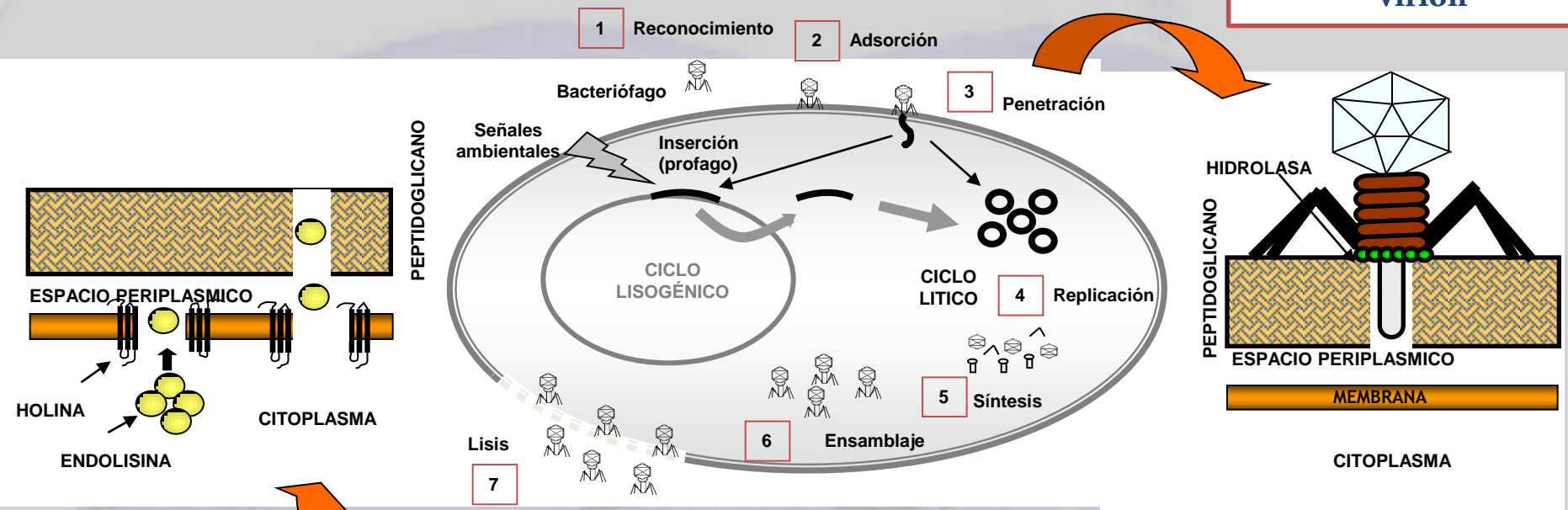
PHAC
TABLETTAE BACTERIOPHAGUM DYS



Capacidad antimicrobiana de proteínas fágicas

Endolisinas

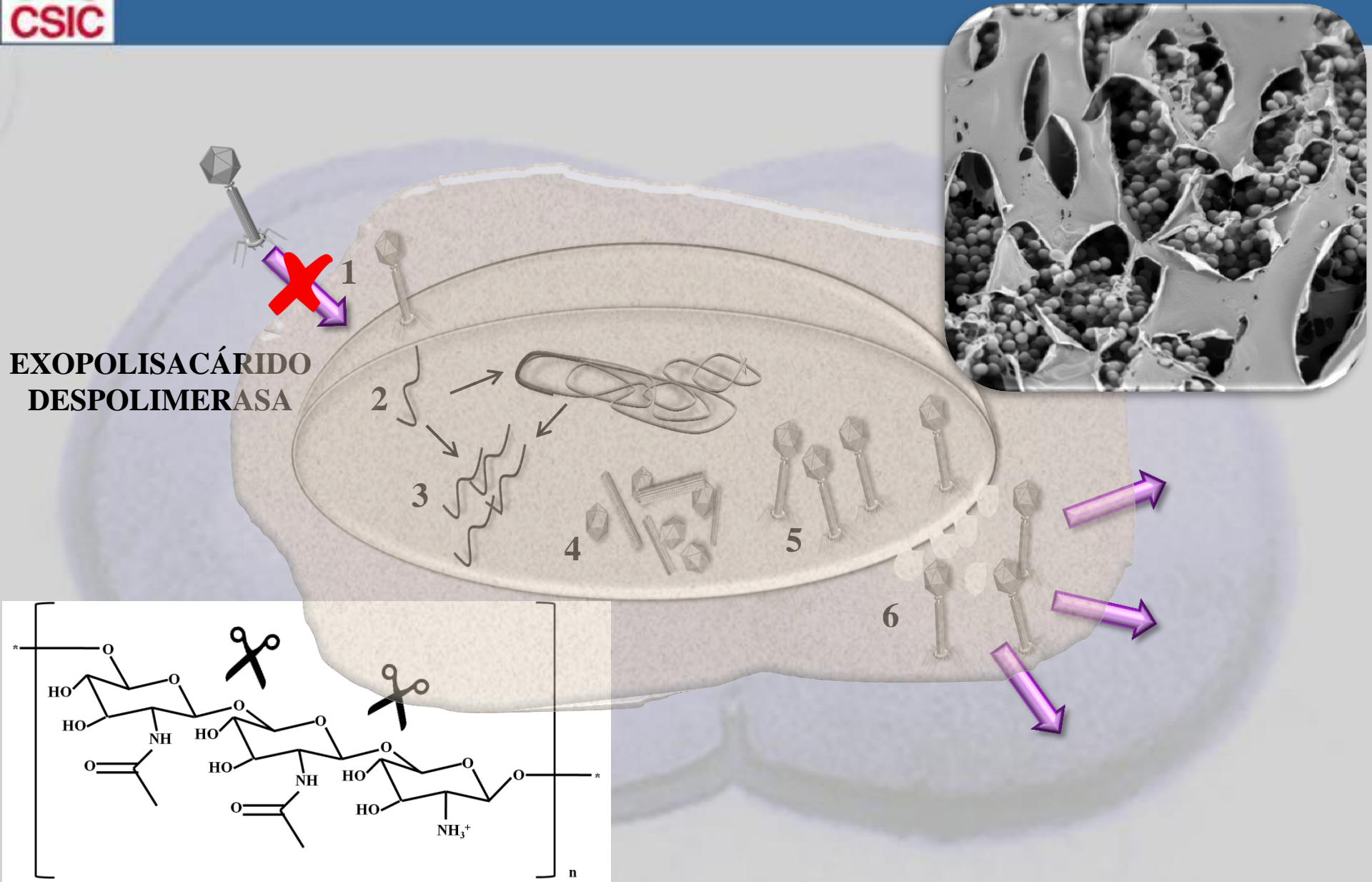
Peptidoglicano hidrolasas asociadas a virión

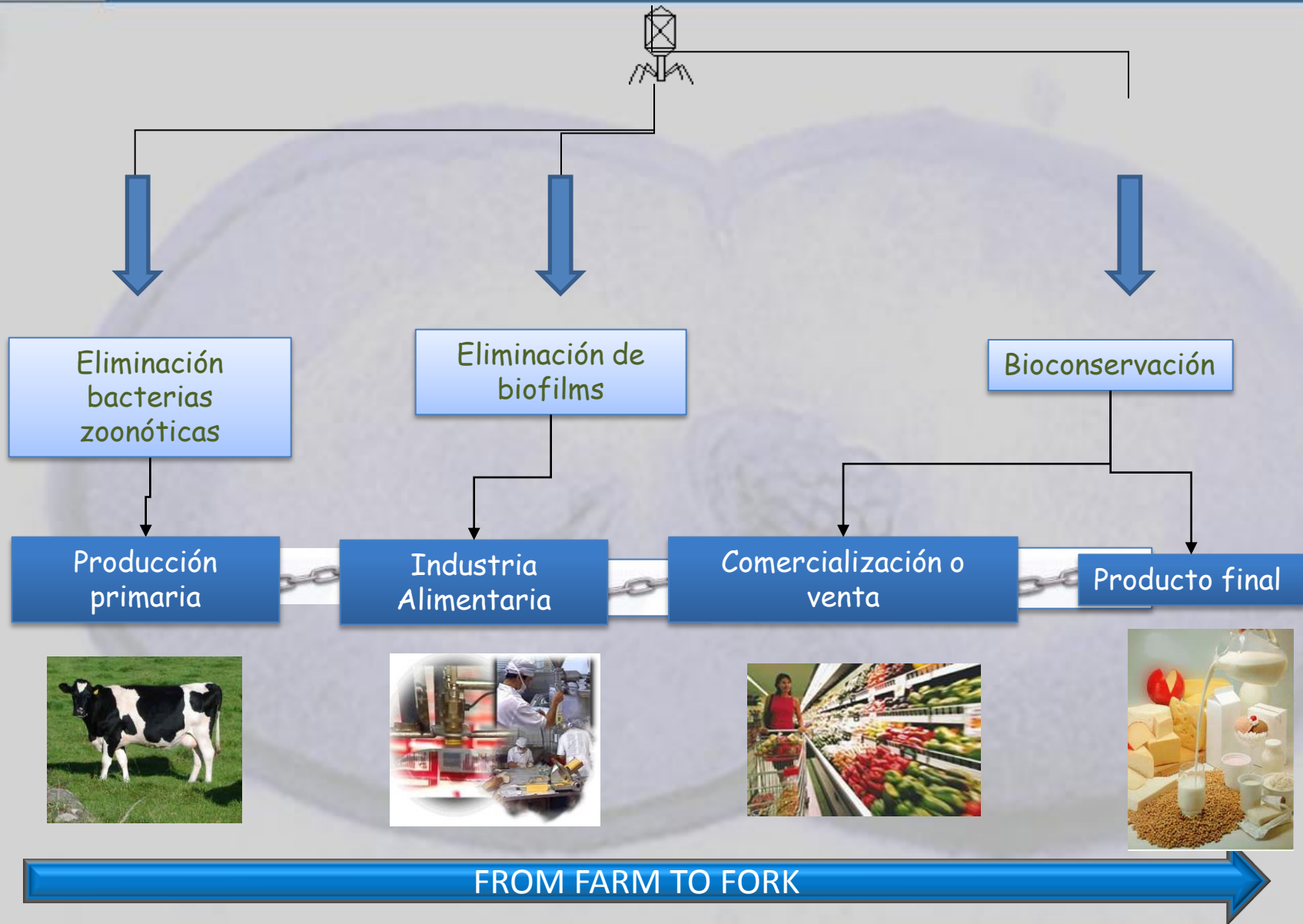


Medio - - +

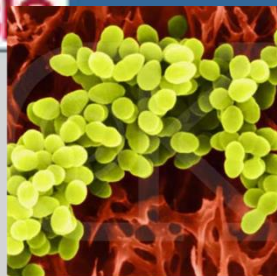


Proteínas fágicas degradadoras de exopolisacáridos





Bioconservación de Productos Lácteos: Bacteriófagos

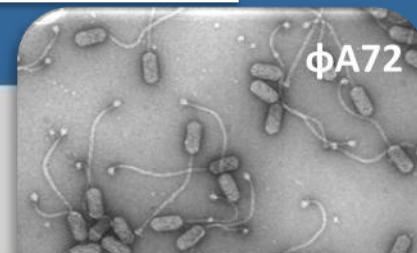


Staphylococcus aureus

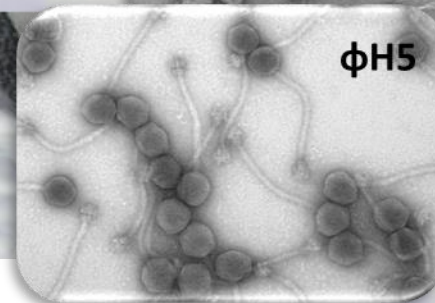
Queso semi curado

Queso Control

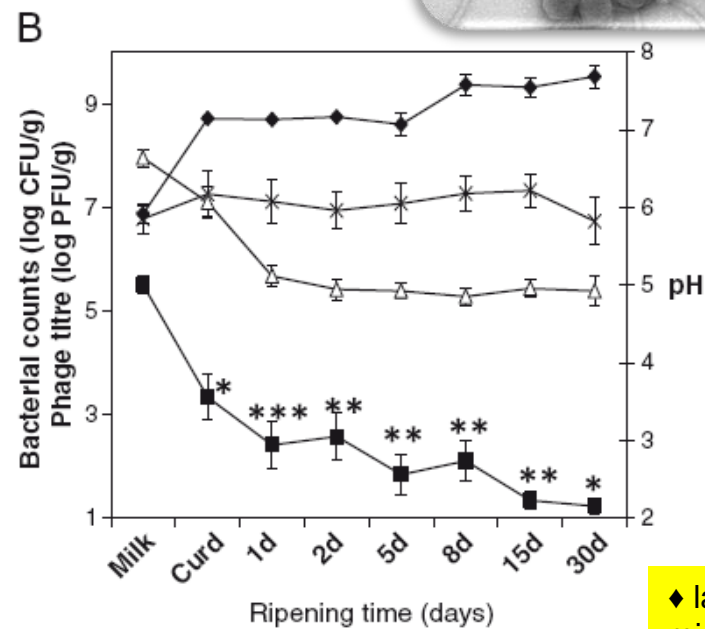
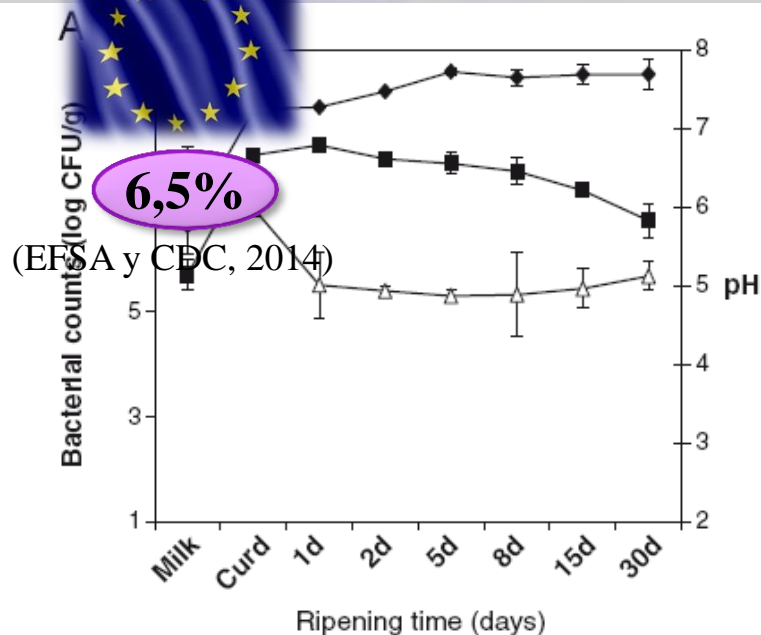
Queso (+ fagos)



ϕ A72



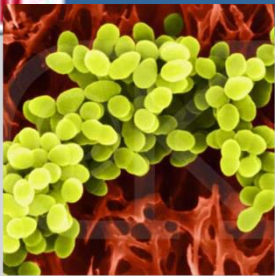
ϕ H5



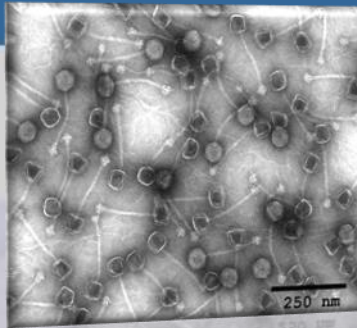
- ◆ lactic acid microbiota
- *S. aureus* Sa9
- △ pH
- × phages

Bioconservación de Productos Lácteos: Proteínas Líticas

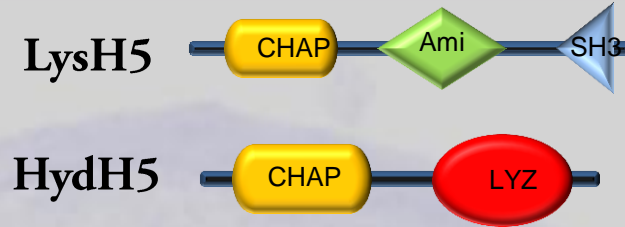
CSIC



Staphylococcus aureus



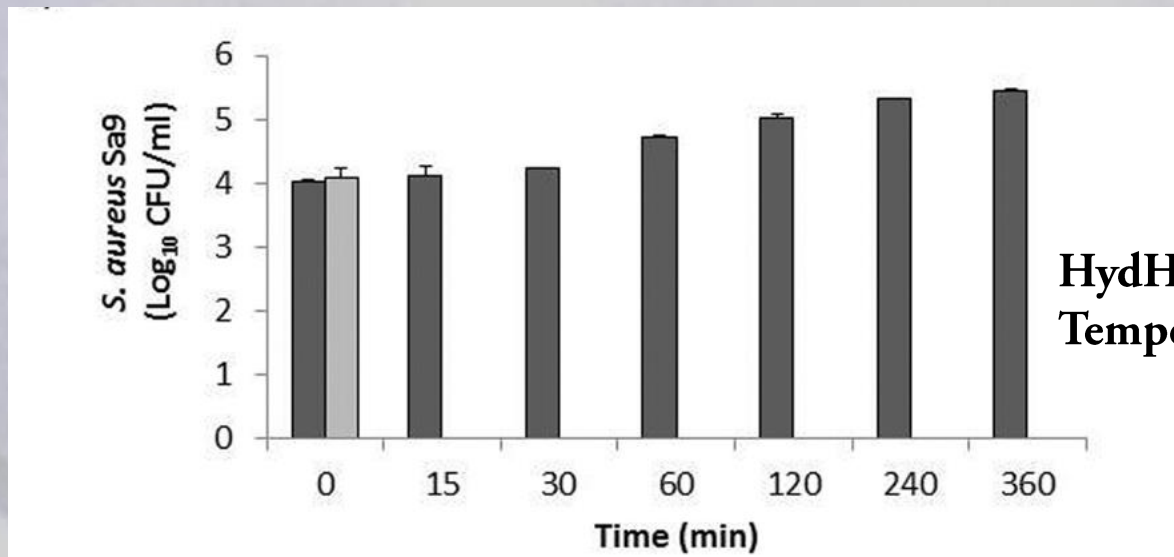
ϕ H5



Rodríguez et al., 2011

Obeso et al., 2008

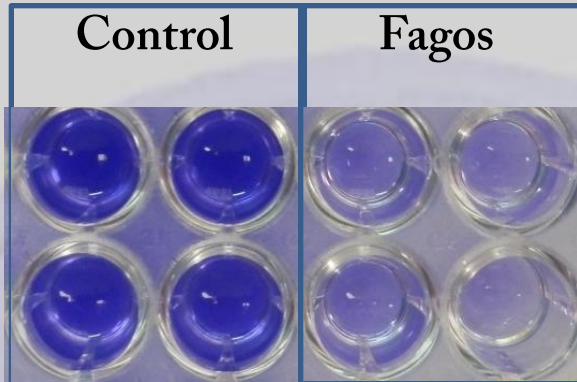
Eliminación de la contaminación en leche



Rodríguez-Rubio et al., 2013

Desinfección de superficies: Bacteriófagos

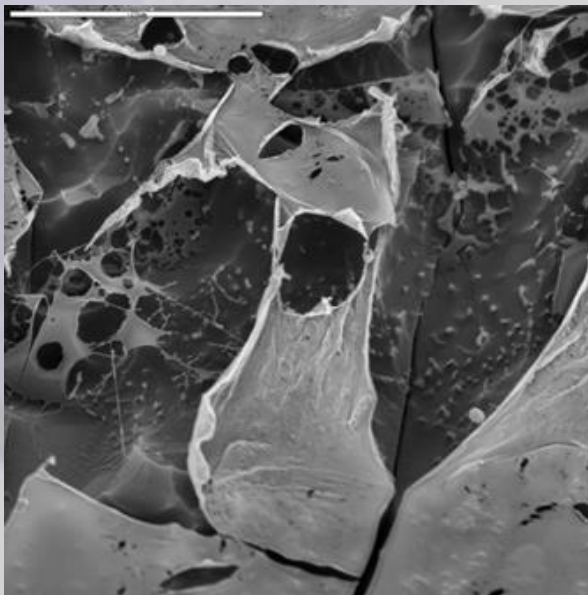
Biofilm 24 h en poliestireno
Tratamiento 4h 37°C



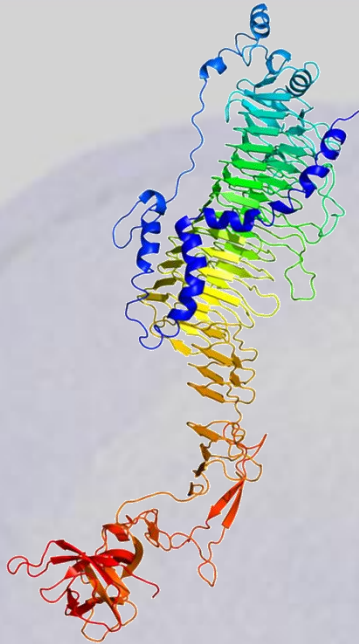
vB_SauM_phiIPLA-RODI



vB_SepM_phiIPLA-C1C



Desinfección de superficies: Proteínas fágicas



Exopolisacárido despolimerasa

Dpo7

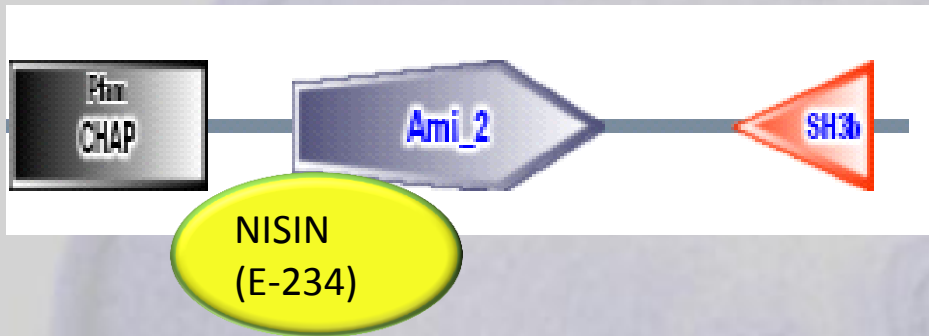
98,5 kDa


Desinfectantes

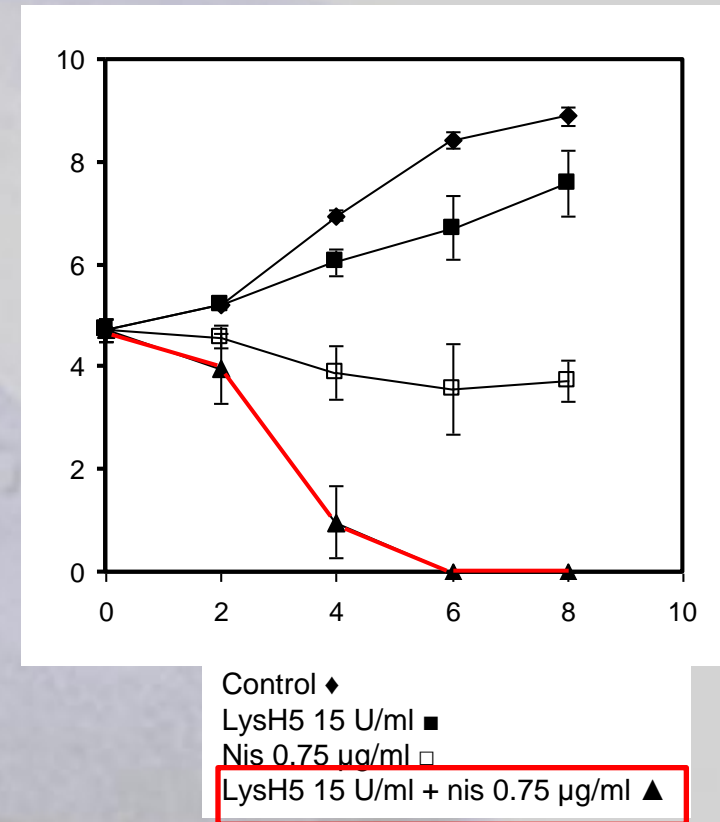


Gutiérrez et al., on line)

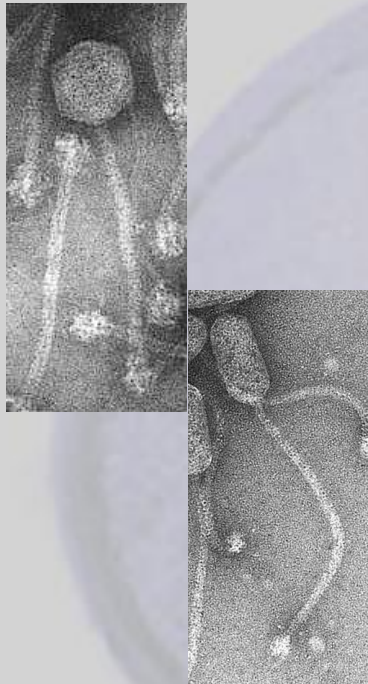
➤ Bacteriocina-Endolisina



 Dosis efectiva \longrightarrow Costes



➤ Bacteriocina-Bacteriófagos



<i>S. aureus</i>	MIC ¹ Nisin (µg/ml)	EOP ²		Adsorption (%)	
		Φ35	Φ88	Φ35	Φ88
Sa9WT	0.78	1	1	99.9±0.1	99.7±0.5
Sa9R	>100	0.002±0.0001	0.5±0.03	56±0.5	96±0.3
Sa9RR	0.78	1.1±0.3	1±0.2	85.3±0.2	99.9±0.3
Sa9 BIM B2	0.78	0	0	97.6±0.3	13.9±3.0
Sa9 BIM B6	0.78	0	0	ND ³	<3
Sa9 BIM B13	0.78	0	0	57.8±7.1	7.5±2.9

¹MIC: minimum inhibitory concentration.

²EOP: Efficiency of plaquing.

ND: not determined

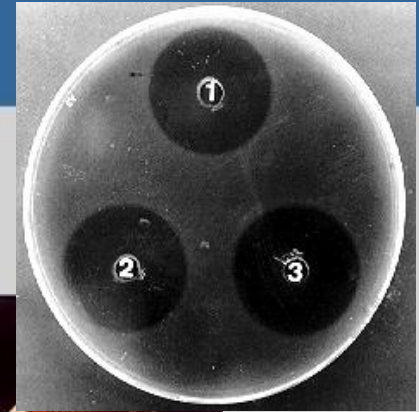


¡¡RESISTENCIA
CRUZADA!!

- **Tienen una alta capacidad antimicrobiana**
- **Son efectivos en matrices alimentarias**
- **Son altamente específicos: solo actúan sobre una especie bacteriana**
- **Pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos sistemas de bioconservación**
- **Los bacteriófagos son una fuente de nuevas proteínas activas frente a biofilms**



MUCHAS GRACIAS





Grupo DairySafe

