

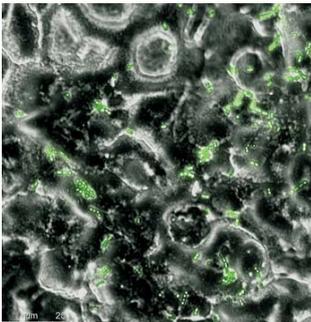


Participación de las Bacterias Lácticas en la Salud Humana y en la Calidad Alimentaria

<http://redbal.iata.csic.es>

7^a REUNION DE LA RED TEMATICA BAL

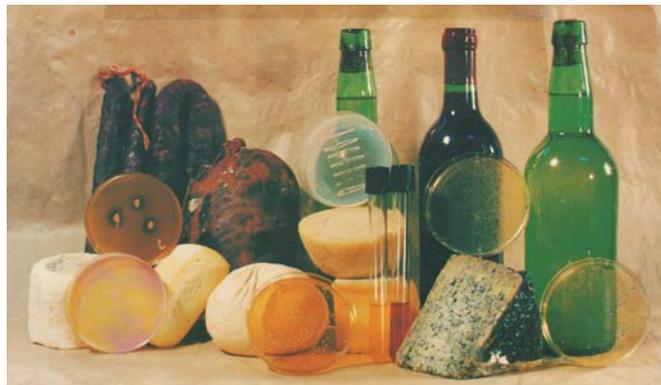
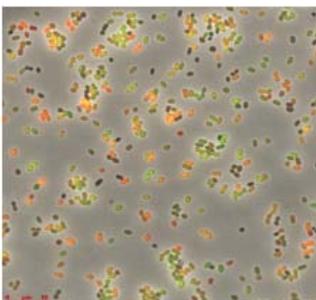
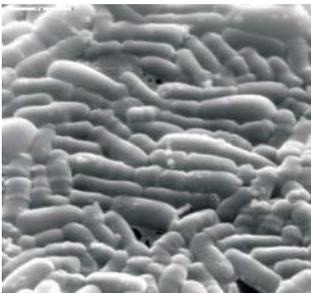
Madrid, 4 y 5 de Julio de 2013



Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid)

Calle Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

http://www.cib.csic.es/es/como_llegar.php



PROGRAMA DE LA REUNIÓN

Jueves 4 de Julio de 2013

10:00-11:00. Inscripción a la Reunión. Entrega de libro de resúmenes y vales para las comidas de los días 4 y 5 y para la cena del día 4.

11:00 Inicio de la 7ª Reunión de la RED BAL. Bienvenida, Manuel Zúñiga, Coordinador de la RED BAL y Mª Jesús Martínez, Directora del CIB.

Sesión 1. Microbiota

11:15 **Identificación y caracterización de enterococos aislados de heces de niños prematuros.**

L. Moles, M. Gómez, E. Jiménez, L. Fernández, G. Bustos, R. Cantón, R. del Campo, J. M. Rodríguez

11:30 **Influencia de la formula infantil suplementada con poliaminas en la composición neonatal de bacterias lácticas y bifidobacterias de ratones BALB/cOlaHsd.**

C. Gómez-Gallego, R. Frias, M. J. Bernal, M. J. Periago, S. Salminen, G. Pérez-Martínez, G. Ros, M. C. Collado

11:45 **Diferencias en la composición de la microbiota de leche materna entre mujeres sanas y celíacas.**

M. Olivares, S. Albrecht, G. de Palma, G. Castillejo, A. Neef, H. A. Schols, Y. Sanz

12:00 **Bacterias lácticas intestinales en un modelo animal murino alimentado con distintos tipos de dietas altas en grasa.**

M. Hidalgo, A. Cobo, I. Prieto, H. Abriouel, N. Benomar, R. Lucas, E. Ortega, A. Gálvez, M. Martínez Cañamero

12:15 **Estudio de la diversidad bacteriana en fermentaciones de aceitunas verdes de mesa mediante la técnica independiente de cultivo DGGE.**

H. Lucena Padró, B. Caballero Guerrero, E. Jiménez, J. M. Rodríguez, A. Maldonado Barragá, J. L. Ruiz Barba

12:30 **Utilización de la DGGE para identificar la microbiota resistente a antibióticos en queso y estudiar su evolución a lo largo del tiempo.**

A. B. Flórez, S. Delgado, L. Guadamuro, B. Mayo

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

12:45 **Caracterización taxonómica y biotecnológica de bacterias lácticas aisladas de “chicha”, una bebida fermentada a base de maíz originaria del noroeste de Argentina.**

V. Illescas, P. Elizaquível, M. Nácher, P. S. Cocconcelli, G. Vignolo, R. Aznar

13:00 Comida autoservicio en la cafetería del CIB

Sesión 2. Microbiota

14:00 **Bacterias lácticas presentes en leche de cabra malagueña.**

L. Robles, M. Ávila, S. Garde y A. Picon

14:15 **Supervivencia de bifidobacterias en queso durante la maduración y tras un proceso digestivo simulado.**

A. Peirotén, J. L. Arqués, M. Medina, E. Rodríguez

14:30 **Tipificación y análisis de la biodiversidad genética de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de diferentes estadios de la vinificación.**

L. E. Cruz-Pio, Y. Benavent-Gil, S. Ferrer, I. Pardo

14:45 **Supervivencia a la digestión *in vitro* de los microorganismos asociados a los biofilms de aceitunas de mesa.**

A. León Romero, J. M. Moreno Baquero, F. N. Arroyo López, A. López López, R. Jiménez Díaz

Sesión 3 Probióticos

15:00 **Respuesta de células inmunes aisladas de tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y de sangre periférica en presencia de cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* productoras de exopolisacáridos y de sus polímeros purificados.**

C. Hidalgo-Cantabrana, M. Nikolic, P. López, A. Suárez, A. Margolles, N. Golic, P. Ruas-Madiedo

15:15 **Uso de cultivos de células epiteliales para determinar el efecto de probióticos. ¿Qué es ruido y qué es señal?.**

C. Bäuerl, G. Pérez Martínez

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

- 15:30 **Adhesión de cepas de bacterias del ácido láctico a la línea intestinal HT29. Competición, inhibición y desplazamiento del patógeno *Listeria monocytogenes*.**
R. Rubio, P. Ruas-Madiedo, T. Aymerich, M. Garriga
- 15:45 **Capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus plantarum* con fenotipo de agregación.**
T. García-Cayueta, A. M. Korany, I. Bustos, C. Peláez, T. Requena, M. C. Martínez-Cuesta
- 16:00 **Pausa, Café & Networking**
- 16:30 **Cinética de unión de la adhesina OppA de *Lactobacillus salivarius* a glicosaminoglicanos de la superficie epitelial: identificación de los motivos de unión mediante mutagénesis sitio específica.**
C. Martín, S. Escobedo, J. M. Coll, E. Suárez, G. Pérez, L. Quirós
- 16:45 **Estudio de intervención nutricional doble ciego, controlado por placebo y aleatorizado para la evaluación de los efectos del consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 sobre la función intestinal y la respuesta inmune en adultos sanos.**
N. Redondo, J. R. Mujico, L. E. Díaz, A. Hernández, A. Gheorghe, M. Bermejo, M. P. Díaz-Roper, M. Olivares, E. Nova, A. Marcos
- 17:00 ***Bifidobacterium longum* CECT 7347 regula el metabolismo del hierro en un modelo de enteropatía inducida por gliadinas.**
M. Olivares, J. M. Laparra, Y. Sanz
- 17:15 **Evaluación del potencial probiótico de bacterias lácticas de origen enológico.**
A. García-Ruíz, D. González de Llano, A. Esteban, T. García-Cayueta, T. Requena, B. Bartolomé, M. V. Moreno-Arribas

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

- 17:30 **Selección de prebióticos y probióticos para la tercera edad.**
L. Valdés, N. Salazar, S. González, S. Arboleya, A. Margolles, C. G. de los Reyes-Gavilán, P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde
- 17:45 **Análisis del carácter probiótico en lactobacilos productores de exopolisacáridos para su uso en la elaboración de alimentos funcionales.**
A. I. Puertas, I. Ibarburu, M. G. Llamas, I. Berregui, M. E. Muñoz, A. Prieto, M. T. Dueñas
- 18:00 **Estudios funcionales, de seguridad y de probiosis de una cepa productora de AS-48.**
A. Baños, J. García-López, R. Cebrián, C. Núñez, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda, E. Valdivia
- 18:15 Pausa, Networking
- 18:30 **Explorando la capacidad colonizadora de bacterias lácticas probióticas en el modelo *in vivo* pez cebra.**
I. Iturria, P. Russo, M. L. Mohedano, S. Rainieri, G. Spano, C. Graziano, P. López, M. A. Pardo
- Sesión 4. Seguridad alimentaria**
- 18:45 **Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Lactobacillus pentosus* con potencial probiótico: búsqueda de genes de resistencia.**
A. León-Romero, J. Bautista-Gallego, F.N. Arroyo-López, A. Garrido-Fernández, R. Jiménez-Díaz
- 19:00 **Actividad inhibitoria de *Lactobacillus reuteri* INIA P572, productor de reuterina, frente a *Clostridium* spp. relacionadas con la hinchazón tardía del queso.**
M. Ávila, N. Gómez, S. Garde

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

19:15 **Efecto combinado de reuterina, diacetilo y ácido láctico frente a microorganismos patógenos alimentarios.**

I. Martín-Cabrejas, S. Langa, R. Montiel, E. Rodríguez, J. L. Arqués, M. Medina

19:30 **Resistencia a antimicrobianos en enterococos procedentes de alimentos.**

L. Lavilla Lerma, M. A. Fernández Fuentes, A. Sánchez Valenzuela, M. J. Grande Burgos, R. Pérez Pulido, H. Abriouel, E. Ortega Morente, R. Lucas López, N. Benomar, M. Martínez Cañamero, A. Gálvez

21:00 **Cena en el restaurante del hotel VP JARDÍN METROPOLITANO.**

<http://www.vphoteles.com/es/hotel-madrid/jardin-metropolitano/>.

Ubicación: Avenida Reina Victoria 12

<http://www.vphoteles.com/content/pdf/vp-jardin-metropolitano.pdf>.

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

Viernes 5 de Julio de 2013

Sesión 5 Biotecnología

- 09:00 **Las bacterias del ácido láctico como vectores para la producción en el intestino delgado de enzimas capaces de degradar el gluten.**
P. Álvarez-Sieiro, B. Redruello, V. Ladero, M. C. Martín, M. Fernández, M. A. Álvarez
- 09:15 **Desarrollo de un queso fresco con *Lactobacillus salivarius* UCM37, una cepa aislada de leche materna con propiedades probióticas.**
N. Cárdenas, M. Cruz, R. Escudero, E. Jiménez, A. Peirotn, J. Calzada, M. Medina, J. M. Rodríguez, L. Fernández
- 09:30 **Identificación de una nueva actividad en un viejo enzima.**
S. Callejón, R. Sendra, I. Pardo, S. Ferrer
- 09:45 **Caracterización cuanti/cualitativa de la producción de ácido láctico (L (+) y D (-)) por 18 cepas lácticas y optimización de la producción de este compuesto por la cepa seleccionada como hiperproductora.**
R. Virto, B. Marín
- 10:00 **Perfil metabólico de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* bajo diferentes condiciones de cultivo.**
R. Fernández, L. Díez, M. González, M. Zarazaga, C. Torres, C. Tenorio, O. P. Kuipers, F. Ruiz-Larrea
- 10:15 **Identificación y caracterización de esterasas de *Lactobacillus plantarum* con interés en tecnología de alimentos.**
M. Esteban-Torres, G. Fernández-Lorente, I. Acebrón, Y. Álvarez, I. Reverón, L. Santamaría, N. Jiménez, F. López de Felipe, J. M. Mancheño, B. de las Rivas, R. Muñoz
- 10:30 **Estrategias de eliminación de fitatos mediante el empleo de fitasas en alimentos fermentados.**
I. García-Mantrana, M. J. Yebra, M. Haros, V. Monedero
- 10:45 **Pausa, Café & Networking**

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

Sesión 6 Microbiología y Biología Molecular

- 11:15 **Análisis transcripcional de la expresión de la dextranasa DsrLS de *Lactobacillus sakei* MN1 y aplicación del dextrano sintetizado como potencial antivírico en acuicultura.**
M. Nácher-Vázquez, M. L. Mohedano, N. A. Ballesteros, N. Peña-Vidal, S. Rodríguez, S. I. Pérez, R. Aznar, P. López
- 11:30 **Respuesta transcriptómica de *Oenococcus oeni* a las condiciones estresantes del vino.**
M. Bordas, I. Araque, N. Rozès, C. Reguant, A. Bordons
- 11:45 **La ausencia de *ftsH* impide la liberación de viriones TP712 en *Lactococcus lactis*.**
C. Roces, A. B. Campelo, A. Rodríguez, P. García, U. Wegmann, M.-P. Chapot-Chartier, B. Martínez
- 12:00 **Regulación del metabolismo de galotatinos en *Lactobacillus plantarum*.**
N. Jiménez, I. Reverón, J. A. Curiel, M. Esteban-Torres, F. López de Felipe, B. de las Rivas, R. Muñoz
- 12:15 **Regulación genética de la biosíntesis de putrescina en *Lactococcus lactis*.**
V. Ladero, B. del Rio, D. M. Linares, M. C. Martín, M. Fernández, M. A. Álvarez
- 12:30 **Identificación y caracterización del operon *lnb* implicado en el metabolismo de lacto-N-biosa y galacto-N-biosa en *Lactobacillus casei*.**
G. N. Bidart, J. Rodríguez-Díaz, V. Monedero, M. J. Yebra
- 12:45 **Análisis de la carga eléctrica superficial de *Lactobacillus casei* mediante medidas de potencial ζ : Aplicación al estudio de la interacción de péptidos antimicrobianos.**
A. Revilla-Guarinos, O. L. Sánchez-Muñoz, J. Salgado, M. Zúñiga
- 13:00 Clausura de la 7ª Reunión de la RED BAL
- 13:30 Comida autoservicio en la cafetería del CIB

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Identificación y caracterización de enterococos aislados de heces de niños prematuros

Laura Moles,¹ Marta Gómez,¹ Esther Jiménez,¹ Leónides Fernández,¹ Gerardo Bustos,² Rafael Cantón,³ Rosa del Campo,³ Juan Miguel Rodríguez¹

¹Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM, Madrid; ²Servicio de Neonatología. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; ³Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal, Madrid,

RESUMEN

Objetivo:

Los recién nacidos prematuros están sometidos a múltiples factores que pueden alterar el proceso de colonización del intestino, incluyendo tratamiento antibiótico a la madre y/o al niño, mayor frecuencia de parto por cesárea, separación de la madre, maniobras invasivas y estancia prolongada en el ambiente hospitalario. El objetivo de este estudio es la identificación y caracterización de una colección de enterococos aislados de muestras de heces de niños prematuros.

Material y métodos:

Se estudió una población de 26 niños prematuros nacidos con menos de 32 semanas de gestación o de 1500g en la maternidad del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Las muestras se recogieron semanalmente en el primer mes de vida y, posteriormente, cada quince días hasta el alta hospitalaria. Los enterococos aislados de dichas muestras se identificaron mediante la secuenciación de la fracción 16S del rDNA y MALDI-TOF. Se determinó su susceptibilidad a diversos antibióticos de relevancia clínica, su diversidad genética (RAPD, PFGE y MLST) y la presencia de genes de virulencia, incluyendo los que codifican feromonas sexuales (*ccf*, *cpd*, *cad*, *cob*), adhesinas (*efaA_{fs}*), productos implicados en agregación (*agg₂*), biosíntesis de una metaloendopeptidasa extracelular (*gelE*), biosíntesis de citolisina (*cylA*) y procesos de evasión de la respuesta inmunitaria (*eps_{fs}*).

Resultados:

Entre los aproximadamente 4.000 aislados obtenidos a partir de las muestras de heces, aquéllos que pertenecían al género *Enterococcus* constituyeron uno de los grupos dominantes. Al nivel de especie destacaron *Enterococcus faecalis*, representando el 20% de los aislados obtenidos, y *Enterococcus faecium*, con un 3% de los aislados. Ambas especies inician la colonización en la primera semana de vida alcanzando concentraciones de 1×10^9 CFU/ml y 1×10^8 CFU/ml. Muchos de los aislados de *Enterococcus* eran portadores de factores de virulencia estudiados. Los resultados correspondientes al MLST demostraron la presencia de clones de alto riesgo (STs 81, 34, 64, 21 and 40 para *E. faecalis*; STs 18 y 132 para *E. faecium*), lo que parece indicar una adquisición hospitalaria.

PALABRAS CLAVE: Enterococos, prematuros, virulencia, resistencia a antibióticos

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Influencia de la fórmula infantil suplementada con poliaminas en la composición neonatal de bacterias lácticas y bifidobacterias de ratones BALB/cOlaHsd

C. Gómez-Gallego¹, R. Frias², M.J. Bernal³, M.J. Periago¹, S. Salminen⁵, G. Pérez-Martínez⁴, G. Ros¹, M.C. Collado⁴

¹ Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Veterinary Sciences, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30071, Espinardo (Murcia), Spain.; ² Central Animal Laboratory, University of Turku, 20014, Turku, Finland; ³ Global Technology Centre for Infant Nutrition, Hero Group, 30820, Alcantarilla (Murcia), Spain; ⁴ Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), 46980, Paterna, Valencia, Spain; ⁵ Functional Foods Forum, University of Turku, 20014, Turku, Finland

RESUMEN

Los beneficios demostrados de la lactancia materna han hecho de su promoción una prioridad pediátrica. La leche materna contiene una gran variedad de compuestos esenciales en la alimentación del recién nacido, no sólo por su papel nutricional sino también por su carácter funcional. Entre ellos, se han descrito ciertas poliaminas que son esenciales para la función intestinal y la inmunidad en los recién nacidos. Es bien conocida la influencia de la lactancia materna en el establecimiento de la microbiota del neonato. Sin embargo, hay situaciones en las que la lactancia materna no es posible y por ello las fórmulas infantiles suponen una alternativa más adecuada. El efecto no suficientemente conocido de las poliaminas presentes en la leche materna sobre la microbiota junto con el hecho que las fórmulas infantiles contienen una concentración de poliaminas 10 veces más baja que en la leche materna, supone un reto para el desarrollo de nuevas fórmulas infantiles más similares a la leche materna y que consiga el mismo efecto nutricional. Por todo ello el objetivo de este estudio ha sido valorar la influencia de las poliaminas presentes en la leche materna sobre el desarrollo del sistema inmune, y la colonización microbiana. Para ello se han utilizado ratones BALB/c destetados precozmente como modelo animal, que han sido alimentados con fórmulas infantiles enriquecidas con diferente concentración de poliaminas frente a aquellos con lactancia materna. El modelo experimental constó de 36 crías de ratones BALB/c (14-días de edad) sometidos a una intervención dietética de 4 días de duración y se dividieron en 4 grupos de 6 animales: 1) lactancia materna, 2) fórmula infantil, y 3) fórmula infantil con poliaminas (mezcla de putrescina, espermidina y espermina) siguiendo las proporciones encontradas en la leche materna. El patrón de colonización microbiana del tracto gastrointestinal (desde cavidad oral a intestino grueso) fue analizada mediante PCR. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de colonización microbiana entre los individuos alimentados con leche materna y frente a los alimentados con fórmula infantil. Es de destacar la gran influencia de la suplementación con poliaminas sobre la microbiota a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, afectando a los niveles de bacterias totales, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* asemejando dichos niveles con los aquellos obtenidos en el grupo alimentado con leche materna. También se encontraron diferencias en los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Estos resultados sugieren un papel importante de las poliaminas en la colonización microbiana y la necesidad de una mayor investigación con el objetivo de elaborar nuevas fórmulas infantiles que contribuyan al desarrollo saludable del tracto gastrointestinal de los niños.

PALABRAS CLAVE: poliaminas; microbiota; leche materna

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Diferencias en la composición de la microbiota de leche materna entre mujeres sanas y celiacas

Olivares M¹, Albrecht S², De Palma G¹, Castillejo G³, Neef A¹, Schols HA², Sanz Y¹

¹Ecología Microbiana, Nutrición y Salud. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Avda. Agustín Escardino, 7. Valencia. ²Laboratory of Food Chemistry. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. ³Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La leche materna contiene bifidobacterias y otras bacterias lácticas y oligosacáridos con efecto prebiótico, que favorecen el predominio de estos grupos bacterianos en el intestino del lactante y podrían contribuir al efecto protector atribuido a la lactancia materna frente al desarrollo de patologías mediadas por el sistema inmunológico. Diversos estudios prospectivos y retrospectivos indican que la lactancia materna protege frente al desarrollo de la enfermedad celíaca (EC), aunque los resultados no son totalmente concluyentes y no se conocen con exactitud los posibles mecanismos de acción. Las bacterias lácticas y compuestos inmunomoduladores que contiene la leche materna y su transferencia al recién nacido podrían influir en el patrón de colonización intestinal del lactante y en la modulación del desarrollo de tolerancia oral al gluten.

OBJETIVO: Establecer las posibles diferencias en la composición de la microbiota de leche materna de mujeres sanas y celiacas y su posible relación con la composición en oligosacáridos y marcadores inmunológicos. La finalidad última del estudio es avanzar en el conocimiento de los factores perinatales que podrían influir en el riesgo de desarrollar la EC.

METODOLOGÍA: Se analizaron 12 muestras de leche materna de cada grupo (madres sanas y celiacas) obtenidas un mes después del parto, en las que se determinó la microbiota mediante PCR a tiempo real, incluyendo bacterias totales, *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y los grupos *Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccooides* y *C. leptum*. También se cuantificaron seis citoquinas (IL-10, IL-12p70, IL-13, INF- γ , TNF- α y TGF- β 1) mediante citometría de flujo y la forma secretada de la IgA (SIgA) por ELISA y se caracterizaron los oligosacáridos mediante electroforesis capilar (CE-FIL).

RESULTADOS: Las muestras de leche de las madres con EC mostraron un descenso significativo en el número de *Bifidobacterium* spp. en comparación con las de madres sanas. En ambos grupos de madres, las bacterias más abundantes fueron bacterias lácticas de los grupos *Lactobacillus* y *Streptococcus* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y del grupo *C. coccooides*, sin encontrarse diferencias entre ambos. Las muestras de leche materna de las madres con EC presentaron un menor contenido en todos los parámetros inmunológicos analizados, detectándose reducciones estadísticamente significativas en IL-12p70, TGF- β 1 e SIgA. En el caso de las madres con el perfil no secretor Le(a+b-), las muestras de leche de madres celiacas mostraron un aumento significativo en el contenido de los oligosacáridos LNT y LNFPII en comparación con las de madres sanas. No se detectaron diferencias en la composición en oligosacáridos entre las muestras de leche de madres celiacas y sanas con el perfil secretor Le(a-b+).

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos demuestran la existencia de diferencias en la composición de la microbiota, así como en otros parámetros relacionados con la regulación del ecosistema intestinal y la función inmune, entre la leche de madres sanas y celiacas, que podrían explicar la controversia relacionada con los efectos protectores de la lactancia materna en el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Leche materna, enfermedad celíaca, microbiota

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Bacterias lácticas intestinales en un modelo animal murino alimentado con distintos tipos de dietas altas en grasa

Marina Hidalgo¹, Antonio Cobo¹, Isabel Prieto², Hikmate Abriouel¹, Nabil Benomar¹, Rosario Lucas¹, Elena Ortega¹, Antonio Gálvez¹, Magdalena Martínez Cañamero¹

¹ Área de Microbiología, ² Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

RESUMEN

En los últimos años ha habido una cantidad ingente de información acerca de la influencia de la dieta sobre la microbiota intestinal tanto en humanos como en modelos animales, principalmente murinos. Dentro de este campo, existe un interés especial en el efecto de las dietas altas en grasa debido a su efecto nocivo sobre la población de países desarrollados, fundamentalmente por su relación con el llamado síndrome metabólico (obesidad, hipertensión y resistencia a la insulina), aunque en la gran mayoría de estos estudios no se ha diferenciado entre diferentes tipos de grasas.

Entre todas las dietas histórico-geográficas, la dieta mediterránea destaca como beneficiosa para la salud, ya que se ha relacionado con menores niveles de colesterol y presión arterial. Una de las características más distintivas de la dieta mediterránea es la utilización del aceite de oliva como grasa principal, frente al uso de la mantequilla en otro tipo de dietas. De igual manera, el aceite de oliva ha sido objeto de intenso estudio a nivel fisiológico, tanto en modelos animales como en estudios epidemiológicos, y está ampliamente aceptada la correlación inversa de su consumo habitual con diferentes parámetros característicos del síndrome metabólico y de riesgo cardíaco.

Puesto que ya sabemos que dietas altas en grasa tienen efectos sobre la composición de la microbiota intestinal, sería muy interesante saber si distintos tipos de grasa ejercen efectos diferenciados sobre la microbiota y cuáles son las consecuencias fisiológicas. Por ello, hemos abordado una línea de trabajo sobre la influencia del aceite de oliva, en comparación con otras grasas, sobre la población bacteriana del intestino. Para ello, hemos alimentado ratones con tres dietas altas en grasas (aceite de oliva virgen, refinado y mantequilla) así como con una dieta control. Ya comunicamos en reuniones previas que las poblaciones simbiotas habían sido estudiadas en heces a lo largo de todo el proceso mediante amplificación de la región V3 de los genes del ARNr 16S y electroforesis en gel de gradiente desnaturante, DGGE. Posteriormente hemos profundizado el estudio mediante secuenciación masiva. En la presente comunicación analizamos los resultados obtenidos en las diferentes dietas usando esta metodología, centrándonos principalmente en la biodiversidad de las bacterias del ácido láctico.

Agradecimientos: *Este estudio ha sido financiado por el Plan Propio de la Universidad de Jaén (PP2009/13/03) y por la CEIC de la Junta de Andalucía (PI Excelencia_2010 AGR 6340).*

PALABRAS CLAVE: microbiota intestinal, aceite de oliva, ecología microbiana

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Estudio de la diversidad bacteriana en fermentaciones de aceitunas verdes de mesa mediante la técnica independiente de cultivo DGGE.

Helena Lucena Padrós¹, Belén Caballero Guerrero¹, Esther Jiménez², Juan Miguel Rodríguez², Antonio Maldonado Barragán¹ y José Luis Ruiz Barba¹.

¹Instituto de la Grasa (CSIC); Avda.- Padre García Tejero, 4; Apto. 1078; 41012, Sevilla. ²Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos; Facultad de Veterinaria; Universidad Complutense de Madrid; Avda. Puerta de Hierro, s/n.; 28040, Madrid.

RESUMEN

Para complementar un estudio anterior sobre la biodiversidad microbiana inherente a las fermentaciones de aceitunas verdes de mesa, hemos utilizado la técnica independiente de cultivo DGGE. Así, hemos seguido la evolución de la microbiota a lo largo de la fermentación en 43 fermentadores de 10 Tm en cinco "patios" distintos pertenecientes a dos empresas diferentes, que habían sido previamente estudiadas por técnicas dependientes de cultivo. El ADN total extraído de las muestras de salmuera fue utilizado como molde en amplificaciones por PCR utilizando parejas de cebadores específicos de la región V6-V8 del gen 16S rDNA, tanto universales como específicos para el grupo *Lactobacillus*. Como control y referencia en las electroforesis, se construyeron diferentes marcadores hechos a partir de amplificaciones de cultivos puros de especies aisladas de estas mismas fermentaciones y que habían sido previamente identificadas molecularmente, combinándolas de manera que se obtuvieran escaleras de peso molecular adecuadas. Los resultados del análisis de las muestras amplificadas para el grupo *Lactobacillus* se correlacionan bien con los obtenidos por técnicas de cultivo, permitiéndonos seguir con mayor precisión la evolución de las distintas poblaciones bacterianas en el tiempo. Sin embargo, la utilización de cebadores universales no ofreció resultados concluyentes. Finalmente, mediante DGGE hemos detectado bandas de amplificación que, una vez rescatadas de los geles y obtenida su secuencia, correspondían a especies no detectadas mediante las técnicas de cultivo empleadas. Estas nuevas especies, principalmente bacterias alcalófilas y halófilas, pueden jugar un papel esencial durante la primera fase de la fermentación como acondicionadoras del medio para el establecimiento de cepas de bacterias lácticas, principalmente de la especie *Lactobacillus pentosus*, que son las responsables últimas de este proceso de acuerdo con nuestros resultados.

PALABRAS CLAVE: biodiversidad, fermentación, aceitunas de mesa, PCR-DGGE

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Utilización de la DGGE para identificar la microbiota resistente a antibióticos en queso y estudiar su evolución a lo largo del tiempo

Ana Belén Flórez, Susana Delgado, Lucía Guadamuro y Baltasar Mayo

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias

RESUMEN

Introducción

El incremento de microorganismos patógenos y oportunistas resistentes a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a escala mundial, ya que complica y encarece el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Levy and Marshall, 2004). La presión selectiva ejercida por la utilización masiva de antibióticos en la práctica clínica y veterinaria, y su empleo abusivo como agentes profilácticos y promotores del crecimiento en ganadería, acuicultura y agricultura ha favorecido la aparición y transferencia de las resistencias (Chadwick and Goode, 1997). De forma frecuente, los genes de resistencia se disponen en elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) con gran capacidad infectiva entre células saltando las barreras de especie y género.

La resistencia a antibióticos en los microorganismos comensales y beneficiosos presentes en los alimentos y en el tracto gastrointestinal no constituye en sí misma una preocupación. Sin embargo, estas poblaciones podrían servir de reservorios de determinantes de resistencia transferibles a los patógenos. De hecho, varios autores creen que la cadena alimentaria es uno de las principales vías de transmisión, sea durante la elaboración de los alimentos o tras el consumo durante el tránsito intestinal (Teuber et al., 1999; Salyers et al., 2004).

En el pasado, la identificación de las poblaciones microbianas resistentes a antibióticos se ha realizado cultivando los microorganismos resistentes y analizándolos de forma individual. En la actualidad se ensayan diversos métodos moleculares independientes de cultivo para la detección y cuantificación de las poblaciones resistentes. Una de las técnicas más populares es la DGGE. Esta técnica permite identificar de manera sencilla las poblaciones mayoritarias y se utiliza corrientemente para la caracterización de fermentaciones alimentarias (Giraffa y Neviani, 2001).

Objetivos

El queso Cabrales es el más reconocido de los quesos asturianos y al igual que otros quesos elaborados con leche cruda presenta una gran complejidad microbiana en el que numerosas poblaciones interactúan y evolucionan a lo largo de la elaboración y maduración (Núñez, 1978; Marcos y col., 1985; Flórez y col., 2004). Por esta razón, consideramos que es un buen modelo para el estudio de la resistencia a antibióticos en productos lácteos.

En este trabajo se exploran las posibilidades de la técnica DGGE para estudiar la composición de las poblaciones resistentes a tetraciclina en el queso de Cabrales y su evolución a lo largo de su elaboración y maduración.

Materiales y Métodos

Análisis microbiológico. En primer lugar se llevó a cabo un estudio microbiológico convencional en muestras de queso de 3, 5, 15, 30 y 60 días de maduración utilizando medios selectivos y diferenciales, suplementados o no con tetraciclina para el recuento de microorganismos resistentes y sensibles de distintos grupos microbianos.

DGGE. Se ha utilizado la técnica independiente de cultivo DGGE para el estudio de la diversidad de los principales grupos microbianos resistentes a tetraciclina.

Resultados y Discusión

El análisis microbiológico de las distintas muestras de queso Cabrales mostró niveles de resistencia a tetraciclina a lo largo de todo el periodo de maduración. En general, a lo largo del periodo de maduración del queso de Cabrales los recuentos microbiológicos en los medios no suplementados con tetraciclina fueron 1 o 2 unidades logarítmicas superiores a aquellos recuentos obtenidos en los medios que contenían tetraciclina, estos datos sugieren que aproximadamente el 1-10% de los microorganismos cultivables son resistentes a tetraciclina. El nivel de resistencia cuantificado en los distintos grupos microbianos fue de: 10^8 - 10^6 ufc/gr de queso en los recuentos de bacterias mesófilas aerobias (PCA); 10^8 - 10^5 ufc/gr de queso en los recuentos de bacterias lácticas (MRS); 10^6 - 10^2 ufc/gr de queso en los recuentos

de enterobacterias (VRBGA) y 10^5 - 10^2 ufc/gr de queso en los recuentos de estafilococos (BP). Las bacterias lácticas muestran niveles de resistencia a tetraciclina estables a lo largo del proceso de maduración con diferencias en los recuentos de 1-2 unidades logarítmicas. Sin embargo, las poblaciones totales y resistentes de enterobacterias y estafilococos muestran descensos en los recuentos de hasta 3-5 unidades logarítmicas.

Para determinar la dinámica poblacional a lo largo de la maduración del queso de Cabrales tanto en las poblaciones totales como en aquellas poblaciones fenotípicamente resistentes a tetraciclina se empleó la DGGE utilizando como secuencias diana los genes que codifican el ARNr 16S. Los perfiles de DGGE obtenidos de las placas de recuentos con y sin antibiótico fueron muy diferentes. Las poblaciones totales procedentes de las placas de PCA fueron mayoritariamente *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus plantarum*. Por contra, entre las poblaciones resistentes a tetraciclina en este mismo medio no aparece *Lb. plantarum* y sí *Staphylococcus* spp. y especies de *Enterobacteriaceae*. Las poblaciones mayoritarias detectadas en MRS fueron *Lc. lactis*, predominante en las primeras etapas de maduración, y *Lb. plantarum* mayoritario hasta el final de la maduración. El perfil de DGGE obtenido para las bacterias lácticas cultivables resistentes a tetraciclina fue completamente diferente. Una vez más no se encuentran lactobacilos resistentes y sí bandas que se corresponden con *Lc. lactis* y *Enterococcus faecalis*. En cuanto a las poblaciones detectadas por DGGE en las muestras cultivables totales de los medios VRBGA y BP destacan diversas enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Raoultella* spp., *Hafnia* spp., etc.) y *Staphylococcus* spp. Por el contrario, las poblaciones fenotípicamente resistentes a tetraciclina en estas mismas muestras se corresponden con *Escherichia coli* y *E. faecalis*.

Podemos concluir que en general las poblaciones bacterianas mayoritarias del queso de Cabrales parecen estar libres de resistencias a tetraciclina. Durante la fermentación y el inicio de la maduración, enterobacterias y *Staphylococcus* spp. constituyen las poblaciones resistentes mayoritarias. A éstas se unen las de los enterococos y *Lc. lactis* durante la maduración.

La pasteurización de la leche y la utilización de fermentos libres de resistencias parecen medidas adecuadas para la bajar la carga de resistencias a antibióticos en el queso de Cabrales y en otros quesos tradicionales.

Bibliografía

- Chadwick, D.J., y Goode, J. 1997. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium 207. Inc. New York: John Wiley & Sons.
- Giraffa, G., y E. Neviani. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. Int. J. Food Microbiol. 67:19-34.
- Levy, S.B., y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance world-wide: causes, challenges and responses. Nat. Med. 10: 122-129.
- Salyers, A.A., Gupta, A., y Wang, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol. 12: 412-416.
- Teuber, M., Meile, L., y Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek 76: 115-137.

PALABRAS CLAVE: Resistencia a antibióticos, tetraciclina, técnicas independientes de cultivo, DGGE, productos lácteos, queso.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Caracterización taxonómica y biotecnológica de bacterias lácticas aisladas de “chicha”, una bebida fermentada a base de maíz originaria del noroeste de Argentina.

Vanessa Illescas¹, Patricia Elizaquível¹, Montserrat Nácher⁴, Pier S. Cocconcelli², Graciela Vignolo³ y Rosa Aznar^{1,4*}

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Av. Dr. Moliner, 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

²Istituto di Microbiologia-Centro Ricerche Biotechnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza-Cremona, Italy.

³Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145, 4000, Tucumán, Argentina. ⁴Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

RESUMEN

Los productos fermentados a base de cereales son todavía la fuente principal de alimentación de las poblaciones rurales de zonas como los Andes. La *chicha* es una bebida tradicional elaborada a partir de harina de maíz criollo cuyo proceso incluye dos pasos de fermentación dominados por poblaciones de bacterias lácticas. Caracterizar las poblaciones naturales de productos tradicionales fermentados de los Andes, a la búsqueda de nuevas cepas con potencial biotecnológico es uno de los objetivos del proyecto "Microbiota of Andean Food: tradition for healthy products" (MICROANDES, PIRSES-GA-2009-247650).

En el presente estudio se ha partido de una producción casera de *chicha* elaborada en la población de Maimará (Quebrada de Humahuaca, Jujuy, Argentina) de la que se tomaron 10 muestras, representando las distintas etapas del proceso de elaboración. Tras el análisis microbiológico, se recuperaron 146 cepas de BAL. La identificación se realizó por técnicas moleculares (ISR, RAPD, PCR específica y secuenciación del 16S) revelando la distribución de los aislados en cuatro géneros *Leuconostoc* (39 %), *Lactobacillus* (23 %), *Weissella* (20 %) y *Enterococcus* (18 %) y como especies dominantes *Enterococcus casseliflavus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis* y *Weissella viridescens*.

Como características biotecnológicas relevantes se han ensayado, en el total de los aislados, la actividad amilolítica en MRS con almidón al 0,5%, la degradación de fitatos (Anastasio, M. et al 2010, J. Food Sci. 75, 28-35), la producción de folatos (Laino, J.E. et al. 2012. Canadian J. Microbiol. 58, 581-588), la producción de dextranos en MRS con sacarosa y la capacidad para crecer en presencia de etanol (6, 8, 10, 12 %). Así mismo, como premisa para su posible utilización en el diseño de alimentos funcionales, se ha determinado la resistencia a 7 antibióticos (amplicilina, gentamicina, kanamicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol) siguiendo la norma ISO 10932/IDF223 (Anonymous, 2010) de 27 cepas, seleccionadas en base a sus perfiles RAPD como representantes de los cuatro géneros, 9 *Lactobacillus*, 7 *Leuconostoc*, 6 *Enterococcus* y 5 *Weissella*.

En cuanto a las características biotecnológicas, ninguna de las cepas presenta capacidad amilolítica; mientras que degradan fitatos alrededor del 50 % de las cepas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* pero no las *Weissella*. Producen folatos todas las *Weissella*, la mayoría de *Lactobacillus* (94%) y *Leuconostoc* (66%) pero no los *Enterococcus*. Producen dextranos todos los *Leuconostoc* y el 10 % de los *Lactobacillus*. El 67,8 % de los *Lactobacillus* y el 14 % de los *Leuconostoc* crecen en presencia de etanol a la concentración más alta ensayada (12%), mientras que las *Weissella* y *Enterococcus* no crecen a concentración de etanol superior al 8%.

De los 9 *Lactobacillus* ninguno presenta resistencia a los antibióticos ensayados; sólo uno de los 7 *Leuconostoc* es resistente a eritromicina; de los *Enterococcus*, 3 son resistentes a eritromicina y 3 a clindamicina. Las 5 *Weissella* son resistentes a vancomicina y, además, a kanamicina, clindamicina y/o tetraciclina.

Considerando los resultados globales, el 10% de los *Lactobacillus* y el 20% de los *Leuconostoc* presentan características de interés biotecnológico y no son resistentes a antibióticos, por lo que son candidatos para explorar y explotar su potencial en el desarrollo de alimentos funcionales.

PALABRAS CLAVE: Diversidad de BAL, potencial biotecnológico, resistencia antibióticos, alimentos funcionales

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Bacterias lácticas presentes en leche de cabra malagueña

L. Robles, M. Ávila, S. Garde y A. Picón

INIA-Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid

RESUMEN

Andalucía cuenta con una importante tradición quesera, que resulta casi desconocida fuera de esta región. La microbiota presente en los quesos de cabra andaluces apenas ha sido estudiada. Tras establecer contacto, a través de la Asociación de Criadores de Cabra Malagueña, con varias empresas lácteas situadas en la provincia de Málaga, comprobamos que estas empresas elaboraban sus productos con leche pasteurizada y fermentos comerciales. Nos propusimos obtener una colección de bacterias lácticas aisladas de leche o quesos de cabra andaluces que pueda servir de base, en un futuro, para desarrollar cultivos iniciadores específicos para estas variedades que permitan mantener sus características sensoriales.

En primavera y otoño (periodos de máxima y mínima producción de leche de cabra) se visitaron cinco empresas lácteas situadas en la provincia de Málaga y se tomaron muestras de leche cruda de cabra. Se realizaron recuentos de los siguientes grupos microbianos: microorganismos aerobios totales (en PCA suplementado con leche), bacterias lácticas mesófilas (en M17 y MRS acidificado), lactobacilos (en Rogosa), leuconostoc (en MSE), enterococos (en SB), enterobacterias (en VRBG), micrococáceas (en en MSA), estafilococos (en BP), y hongos y levaduras (en YGC). Los resultados obtenidos reflejan unos niveles elevados de bacterias lácticas: niveles próximos a 6 log u.f.c. / ml leche de bacterias lácticas mesófilas y entre 3-4 log u.f.c. / ml de lactobacilos, leuconostoc y enterococos.

Con la leche recogida en las diferentes industrias lácteas se elaboraron 5 quesos experimentales que se dejaron madurar durante un periodo de 30 días en condiciones controladas de temperatura y humedad, para estudiar qué cepas son capaces de mantenerse durante la maduración. A partir de las placas de M17, MRS, Rogosa, MSE y SB de los quesos experimentales de 1 día, se aislaron y purificaron unas 200 cepas, y otras 200 cepas a partir de las placas de los quesos experimentales de 30 días. Los aislados purificados han sido examinados al microscopio, y se ha determinado si son Gram-positivos o negativos. Se ha extraído su ADN, se ha amplificado un fragmento de unos 350 pares de bases del gen *16S rDNA*, y se ha sometido a digestión con las enzimas de restricción Cfo I, Rsa I y Mbo II. Los productos de estas 3 digestiones nos han permitido hacer una primera clasificación de los aislados en 3 grupos: *Lactococcus*, *Leuconostoc* o *Enterococcus* y *Lactobacillus*. El patrón de digestión con BamH I nos ha permitido diferenciar entre *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Los fragmentos que no se digerían con ninguna de las enzimas de restricción utilizadas (posibles *Lactobacillus*), fueron digeridos con Mse I, Bfa I y Alu I y fueron clasificados en grupos con patrones de digestión idénticos. Se ha enviado a secuenciar un fragmento de unos 800 pares de bases de este mismo gen de cada uno de estos grupos de patrones de digestión.

En los quesos de 1 día de primavera se han identificado 50 aislados del género *Lactococcus*, 37 del género *Lactobacillus*, 42 del género *Leuconostoc*, 37 del género *Enterococcus*, 5 del género *Carnobacterium* y 2 del género *Streptococcus*. En los quesos de 30 días de primavera se han identificado 8 aislados del género *Lactococcus*, 72 del género *Lactobacillus*, 57 del género *Leuconostoc* y 35 del género *Enterococcus*.

En los quesos de 1 día de otoño se han identificado 56 aislados del género *Lactococcus*, 37 del género *Lactobacillus*, 48 del género *Leuconostoc*, 28 del género *Enterococcus*, y 2 del género *Streptococcus*. En los quesos de 30 días de otoño se han identificado 22 aislados del género *Lactococcus*, 64 del género *Lactobacillus*, 54 del género *Leuconostoc* y 36 del género *Enterococcus*.

Se están estudiando las principales propiedades tecnológicas de estos aislados: actividad acidificante, actividad proteolítica, producción de sustancias antimicrobianas y perfil de aroma.

PALABRAS CLAVE: Leche de cabra, bacterias lácticas, identificación, propiedades tecnológicas

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Supervivencia de bifidobacterias en queso durante la maduración y tras un proceso digestivo simulado

Peirotén, A., Arqués, J.L., Medina, M., Rodríguez, E.

Dpto. Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. La Coruña Km 7, Madrid 28040

RESUMEN

Las bifidobacterias forman parte de la microbiota intestinal humana. Existe un gran interés en el desarrollo de productos probióticos que contengan estas bacterias por sus propiedades beneficiosas. La supervivencia de las bifidobacterias en los procesos tecnológicos es a menudo reducida y compromete los posibles efectos probióticos de las cepas en el intestino humano. El queso es un producto lácteo que se presenta como alternativa a otros productos fermentados por sus mejores condiciones para favorecer la supervivencia de las bifidobacterias debido a su pH, contenido en lípidos y nivel de oxígeno.

En este trabajo se realizaron 2 fabricaciones de queso a partir de leche pasteurizada de vaca con el fermento comercial mesófilo MA016 al 1%. Se emplearon como cultivos adjuntos añadidos al 1% las cepas *B. pseudolongum* INIA P2, *B. longum* INIA P132, *B. bifidum* INIA P671 y *B. breve* INIA P734. Los quesos se maduraron a 12°C durante 28 d.

Después de 28 d a 12°C, *B. pseudolongum* INIA P2 presentó el 100% de supervivencia, los niveles de *B. longum* INIA P132 descendieron 1.4 unidades logarítmicas y sus colonias conservaron además su fenotipo filante. En los quesos elaborados con *B. bifidum* INIA P671 y *B. breve* INIA P734 se observaron reducciones inferiores a 0.3 unidades logarítmicas. El fermento, en el queso de un día, alcanzó un recuento medio de 9.56 log ufc/g sin diferencias entre los distintos quesos y los niveles se mantuvieron estables hasta el final de la maduración.

Finalizada la maduración, los quesos elaborados con las bifidobacterias se sometieron a un proceso de digestión simulada y se evaluó la supervivencia de las cepas a dicho proceso mediante recuento en medio selectivo. Tras la digestión del queso de 28 d, se observó el 100% de supervivencia de *B. pseudolongum* INIA P2, el 23% de *B. breve* INIA P734 y aproximadamente el 1% para las cepas *B. bifidum* INIA P671 y *B. longum* INIA P132.

Como conclusión, las cepas *B. pseudolongum* INIA P2 y *B. breve* INIA P734 presentaron una viabilidad alta en el queso y tras el proceso digestivo simulado, por lo que tendrían aptitudes tecnológicas de interés para su empleo en la elaboración de quesos probióticos.

PALABRAS CLAVE: Bifidobacterias, queso, digestión

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Tipificación y análisis de la biodiversidad genética de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de diferentes estadios de la vinificación

L. E. Cruz-Pio^a, Y. Benavent-Gil^a, S. Ferrer^a, I. Pardo^a

^aENOLAB, Departamento de Microbiología y Ecología, ERI BIOTECMED, MCL IViSoCa, Universidad de Valencia, c/Dr. Moliner, 50 E-46100. Burjassot- Valencia, España. Isabel.Pardo@uv.es

RESUMEN

La FML consiste en la conversión de ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono. Esta transformación disminuye la acidez, aumenta el pH y mejora las características organolépticas del vino. De todas las especies de bacterias lácticas asociadas a la vinificación, la especie que mejor tolera las condiciones estresantes del vino es *O. oeni* y por ello, se han usado diferentes cepas de esta especie para la fabricación de cultivos malolácticos comerciales. La diversidad fenotípica que presenta esta especie es muy grande. La selección de adecuadas cepas malolácticas aprovecha de esta diversidad y tiene en cuenta diversas características fisiológicas, metabólicas y tecnológicas relevantes para llevar a cabo la FML y mejorar las cualidades organolépticas de los vinos.

El primer paso en la caracterización de las cepas es una correcta discriminación entre ellas. La caracterización puede llevarse a cabo mediante el análisis de características fenotípicas. Sin embargo, la caracterización molecular permite llevar a cabo este objetivo de forma más rápida y fiable.

Por otro lado, la selección de cepas malolácticas es una tarea que supone un considerable gasto de tiempo. Algunos autores han descrito la existencia de diferencias en las secuencias de los genes *rpoB* y *rpoC* (Renouf *et al.*, 2009), así como la presencia/ausencia de determinados marcadores (Renouf *et al.*, 2008) entre las cepas aisladas de momentos tempranos (menos resistentes a las condiciones del vino) o tardíos (más resistentes). De ser ciertas estas relaciones podría facilitar la selección de cepas adecuadas para llevar a cabo la FML.

Los objetivos del presente trabajo fueron 1) La discriminación molecular de 90 aislados de la colección ENOLAB aisladas de diversas etapas de la vinificación y 2) la búsqueda de las relaciones entre características genéticas y la fase de aislamiento de las bacterias: principio o del final de la vinificación.

Para llevar a cabo el análisis molecular de la diversidad se recurrió a dos técnicas: RAPD con el cebador M13 (Zaparolli *et al.*, 2000) y el análisis de longitud de fragmentos de las secuencias repetidas en tándem (VNTR) (Claise y Lonvaud-Funel, 2012). Para llevar a cabo el segundo objetivo se secuenciaron parcialmente los genes *rpoB*, *rpoC* y se investigó la presencia/ausencia de 16 marcadores moleculares descritas por Renouf *et al.* (2008). Los resultados obtenidos de la caracterización molecular de 90 aislados de la colección, utilizando un método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación de Pearson, nos permitió agrupar los 90 aislados en 77 grupos, a un valor de similitud de 97 %.

Los resultados obtenidos de la secuenciación parcial de los genes *rpoB* y *rpoC* muestran que existe una diversidad de alelos superior a la reportada por otros autores y que no existe una relación clara entre posesión de un determinado alelo de estos genes y la fase en la que han sido aisladas las cepas.

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico utilizando la prueba Kruskal Wallis para contrastar la existencia o no de dos grupos de cepas (tempranas o tardías) en función del número de marcadores moleculares. Se ha observado con un 95 % de confianza de que existen diferencias estadísticamente significativas entre el número de marcadores presentes en los aislados y la fase de aislamiento.

Además, un análisis de Regresión Logística ha demostrado que los marcadores M2 y M6 están asociados a cepas aisladas de fase tardía con un porcentaje de clasificación correcta del 84.1 y 81.8 %, respectivamente.

Referencias:

Renouf *et al.*, 2008. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35: 27-33.

Renouf *et al.*, 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 85-97.

Zaparolli *et al.* 2000. Current Microbiol. 40: 351-355.

Agradecimientos: Ministerio de Ciencia e Innovación y Generalitat Valenciana por la financiación del proyecto RM2010-00001-00-00 y de L.E. Cruz-Pio.

PALABRAS CLAVE: *Oenococcus oeni*, RAPD-PCR, VNTR, *rpoB*, *rpoC*,

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Supervivencia a la digestión *in vitro* de los microorganismos asociados a los biofilms de aceitunas de mesa

Á. León Romero, J.M. Moreno Baquero, F.N. Arroyo López, A. López López y R. Jiménez Díaz

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero, 4, 41012 Sevilla

RESUMEN

Muchos alimentos se utilizan como vehículos para la incorporación de microorganismos probióticos al tracto gastrointestinal humano (TGI). Además de servir de medio de transporte, la matriz alimentaria protege a los microorganismos de las condiciones ambientales extremas que se dan en el TGI: saliva (lisozima y α -amilasa), jugo gástrico, sales biliares, enzimas proteolíticos, etc. Entre los múltiples alimentos que se utilizan para este fin, figuran los vegetales fermentados y, entre ellos, las aceitunas. En este estudio mostramos cómo las bacterias lácticas y levaduras que forman biofilms en la superficie de aceitunas fermentadas estilo español o sevillano sobreviven a las condiciones de estrés que se dan en el TGI.

Se han utilizado como cultivos iniciadores dos cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas estilo español, seleccionadas en función de sus características tecnológicas y potencialmente probióticas. Con ellas se llevaron a cabo fermentaciones a pequeña escala según el método tradicional de elaboración. Aceitunas de la variedad Gordal se colocaron en pequeños fermentadores y se cubrieron con salmuera; dos de ellos se inocularon con *L. pentosus* 119 y otros dos con *L. pentosus* 13B4, siguiendo su desarrollo y el de las levaduras en los biofilms formados en la epidermis de los frutos. Una vez finalizada la fermentación (aprox. 80 días), se hicieron dos lotes con las aceitunas de cada fermentador. De cada uno de éstos se tomaron muestras de frutos (25 g) y, bien las aceitunas se homogeneizaban en un "stomaker" después de deshuesarlas (para simular la masticación), bien se extraían los biofilms de la superficie de los frutos mediante un método mecánico-enzimático puesto a punto por nosotros. En ambos casos, previamente a la digestión, se hacía un recuento de los microorganismos y se comprobaba la implantación de las cepas de *L. pentosus* en los biofilms mediante RAPD-PCR con el primer OPL5, identificándose las levaduras por RFLP de la región 5.8S ITS.

El procedimiento de la digestión gastrointestinal humana simulada fue como sigue: 25 g de aceituna homogeneizada ó 25 ml de extracto del biofilm se incubaron en saliva (5 min, 200 rpm, 37 °C), tomando una muestra para recuento de microorganismos en placa y microscopía electrónica de barrido (MEB) (etapa oral). A continuación, se incubaban las muestras en jugo gástrico (4 h, 200 rpm, 37 °C), tomando de nuevo una muestra para recuento en placa y MEB (etapa gástrica). Posteriormente, se incubaron las muestras en jugo intestinal durante toda la noche (200 rpm, 37 °C), cogiendo muestras para recuento de lactobacilos y levaduras y para MEB (etapa intestinal). Al final del proceso, de nuevo se analizaron por RAPD-PCR los lactobacilos sobrevivientes, así como las levaduras, éstas mediante RFLP de la región 5.8S ITS.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: tanto la cepa *L. pentosus* 119 como la cepa *L. pentosus* 13B4 presentes en la aceituna homogeneizada sobrevivieron a la digestión intestinal, aunque perdiendo algo de viabilidad sobre todo en el caso de la cepa 119. Por el contrario, ninguna de ellas sobrevivió a la etapa gástrica cuando se trataba de las muestras de extracto de biofilms desintegrados. Por su parte, las levaduras sobrevivieron a todas las etapas de la digestión en ambos tipos de muestra, aunque perdiendo viabilidad en esos casos. En las fotografías al MEB de las diferentes etapas de la digestión de las aceitunas homogeneizadas se podía apreciar cómo iba desapareciendo la pulpa y la matriz polimérica que envolvía a los microorganismos en el biofilm, dejando al descubierto a lactobacilos y levaduras y haciéndolos más sensibles a los agentes de estrés.

Estos resultados indican que, al menos *in vitro*, las aceitunas protegen a los lactobacilos de las condiciones ambientales extremas que se dan en el TGI.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus pentosus*, levaduras, fermentación, aceitunas, probióticos

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Respuesta de células inmunes aisladas de tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y de sangre periférica en presencia de cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* productoras de exopolisacáridos y de sus polímeros purificados

Claudio Hidalgo-Cantabrana^{1,2}, Milica Nikolic², Patricia López³, Ana Suárez³, Abelardo Margolles¹, Natasa Golic y Patricia Ruas-Madiedo^{1,*}

¹, Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)

², Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (University of Belgrade, Serbia) ³, Departamento de Biología Funcional-Área de Inmunología (Universidad de Oviedo).

* IPLA-CSIC Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. E-mail: ruas-madiedo@ipla.csic.es

RESUMEN

Las bifidobacterias son residentes habituales de la microbiota intestinal humana y son los primeros colonizadores del tracto intestinal tras el nacimiento, declinando sus poblaciones en la senescencia. Se conoce que algunas cepas de este género son capaces de ejercer efectos positivos para la salud humana si bien los mecanismos de acción están poco esclarecidos. Recientemente se ha correlacionado alguno de los atributos probióticos de las bifidobacterias con su capacidad para producir polímeros extracelulares denominados exopolisacáridos (EPS). De forma específica, parece que estos polímeros son capaces de actuar como moduladores de la respuesta inmune^{1,2}. En trabajos previos del grupo hemos analizado *in vitro* la respuesta de células mononucleares aisladas de sangre periférica humana (PBMC) en presencia de los EPS purificados de tres cepas isogénicas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* muy relacionadas entre sí: A1 (parental), A1dOx (derivada de A1, adaptada a bilis) y A1dOxR (derivada de A1dOx y con fenotipo “ropy”). Hemos comprobado que el perfil de producción de citocinas es dependiente del polímero y que el EPS ropy sintetizado por la cepa A1dOxR, caracterizado por presentar una fracción polimérica de gran tamaño (~1x10⁶ Da), parece atenuar la respuesta inmune³.

En el presente trabajo pretendemos evaluar *in vitro* si la respuesta de PBMC es similar a la que se produciría en células inmunes localizadas a nivel de la mucosa intestinal, es decir, las células del GALT (gut associated lymphoid tissue). Para ello, hemos optimizado un método para aislar, purificar y cultivar células inmunes del GALT de rata que posteriormente hemos co-incubado (durante 4 días) con las tres cepas indicadas anteriormente (inactivadas por radiación UV), con cuatro tipos de EPS (incluida la fracción de gran tamaño purificada del EPS A1dOxR) y los respectivos controles. En paralelo se han realizado los mismos co-cultivos con PBMC de rata. Se ha determinado la capacidad de estos factores bacterianos para modificar la proliferación de las células presentes en los dos tipos de tejidos, así como su perfil de producción de citocinas. Los análisis preliminares indican que la respuesta de PBMC es mayor que la detectada con células del GALT dado que en estas últimas habría un mayor porcentaje de células activadas por su localización en la mucosa. Además, se ha detectado que la respuesta inducida en PBMC por las bacterias completas es mayor que la inducida con sus EPS purificados.

[1] Fanning *et al.* (2012). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**: 2108-13

[2] Hidalgo-Cantabrana *et al.* (2012). *Probiotics & Antimicrob. Prot.* **4**: 227-37

[3] López *et al.* (2012) *Food Res. Int.* **46**:99-107

PALABRAS CLAVE: exopolisacáridos, bifidobacterias, probióticos, citocinas, GALT, PBMC

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Uso de cultivos de células epiteliales para determinar el efecto de probióticos ¿Qué es ruido y qué es señal?

Bäuerl, Christine y Pérez Martínez, Gaspar

Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Paterna, Valencia

RESUMEN

Para la caracterización del modo de acción de los probióticos es imprescindible contar con sistemas modelo bien *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, donde testar sus propiedades y estudiar sus mecanismos de acción, antes de pasar a ensayos en humanos. Los cultivos de células epiteliales intestinales (CEI) son realmente prácticos, ya que permiten realizar múltiples ensayos en un experimento generalmente de forma reproducible. Los ensayos de adhesión de probióticos son un típico ejemplo de ensayo con un grado de reproducibilidad bastante satisfactorio. Sin embargo, no ocurre igual en experimentos en los que los cultivos celulares son sometidos a estímulos, tras los que se mide secreción de proteínas (p. ejem. citoquinas) o su expresión génica. En esos casos hemos observado una gran variabilidad debida a las propias condiciones de cultivo de las CEI, pero además, porque son muy sensibles a cambios en el procedimiento experimental.

Ensayos anteriores nos mostraron que la línea celular HT29 es muy sensible al estímulo inflamatorio con TNF- α . Hemos diseñado una serie de experimentos de coincubación con HT29 de diversos probióticos comerciales (*L.rhamnosus* GG, *L. casei* VSL#3 y *L. plantarum* 299v, *E. coli* Nissle1917) y cepas de laboratorio (*L. paracasei* BL23, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* MG1363, *E. coli* ECOR26), entre otras. Nos planteamos tres diseños experimentales para testar el efecto preventivo, y/o terapéutico, de modo que las CEI HT29 eran estimuladas con TNF- α : (i) antes de su incubación con las cepas bacterianas, (ii) simultáneamente o (iii) después. A continuación se extrajo el RNA total y se determinó por RT-qPCR la expresión de una serie de quimioquinas y reguladores de la ruta de transducción del NF- κ B (IL8, CCL20, GCP-2, IP-10, I-TAC, A20 y BCL3) que pudieran sugerir la ruta de transducción de señal del posible efecto antiinflamatorio.

Tanto la cepa probiótica como la comensal de *E.coli*, inducen la sobreexpresión de todas las quimioquinas en casi todas las condiciones, por lo que el sistema modelo se comporta de forma coherente con esta bacteria, no distinguiendo una de la otra. Sin embargo, el efecto de las bacterias lácticas, probióticas o no, es muy diferente según el patrón de incubación con TNF- α . Las cepas de *L.paracasei/rhamnosus* incubadas junto a TNF- α potencian su efecto proinflamatorio, mientras que muestran el efecto contrario o ningún efecto en otras condiciones de incubación. Las otras cepas de lactobacilos muestran perfiles también muy variables. No obstante, la condición en la que menos cambios en la expresión génica se observó fue al incubar con bacterias antes de TNF- α , con un lavado de las células intermedio. Al repetir este ensayo con células fijadas el comportamiento fue de nuevo distinto, pues la mayoría reprimen la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Para determinar si el efecto observado se pudiera deber, en parte, al cambio en pH del medio durante la incubación con bacterias vivas, se repitió la incubación con ácido clorídrico y láctico (L ó D,L) y luego con TNF- α . Sorprendentemente, el pH ácido bloquea el efecto inductor de TNF- α . Se ha descrito que rutas que se activan por estrés ácido interfieren con la ruta de transducción del TNF- α /NF- κ B.

Estos ensayos indican el diseño experimental de sistemas modelo para estudiar el efecto de probióticos con CEI no es trivial, ya que el propio metabolismo bacteriano condiciona los resultados más allá del efecto que se pretende observar, pues existen rutas de señalización, como la de estrés ácido, que en células epiteliales confluyen en la ruta TNF- α /NF- κ B.

PALABRAS CLAVE: Probióticos, sistemas modelo, HT29, inflamación, pH ácido

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Adhesión de cepas de bacterias del ácido láctico a la línea intestinal HT29. Competición, inhibición y desplazamiento del patógeno *Listeria monocytogenes*.

Raquel Rubio¹, Patricia Ruas-Madiedo², Teresa Aymerich¹, Margarita Garriga¹

¹IRTA-Programa de Seguridad Alimentaria. Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona). ²Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias).

RESUMEN

Según la FAO/WHO (2002), una de las propiedades más importantes que debe poseer un microorganismo con potencial probiótico es la capacidad de adherirse al tejido epitelial intestinal del hospedador, puesto que se considera un factor necesario para que pueda producirse la colonización en el intestino. Debido a la dificultad que implica investigar la capacidad de adhesión bacteriana *in vivo*, la adhesión a la superficie intestinal se ha estudiado frecuentemente *in vitro*, usando superficies y líneas celulares intestinales de origen humano.

El objetivo de este estudio fue valorar la capacidad de adhesión de 5 cepas de bacterias del ácido láctico (BAL) a células epiteliales humanas, empleando la línea celular HT29 procedente de adenocarcinoma de colon humano en estado confluyente y diferenciado (en monocapa). *Lactobacillus rhamnosus* GG se utilizó como cepa de referencia. Las cepas ensayadas fueron 3 cepas aisladas de niños, previamente caracterizadas como potencialmente probióticas (*Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677, *L. casei/paracasei* CTC1678 y *L. rhamnosus* CTC1679) y las cepas *Lactobacillus sakei* CTC494 y *Enterococcus faecium* CTC8005, ambas de origen cárnico.

Además, se incluyó *Listeria monocytogenes* CTC1034 para llevar a cabo estudios de competición, inhibición, y desplazamiento del patógeno por la acción de las 6 cepas de BAL. Para los tres ensayos, en cada tiempo de incubación (1 y 2 h) se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y, seguidamente, pasados los tiempos de incubación de cada ensayo (1 h para el ensayo de competición y 2 h para los ensayos de inhibición y desplazamiento), se procedió a despegar las monocapas con tripsina durante 5 min a 37°C y 5% CO₂. El número de bacterias adheridas en cada pocillo se determinó mediante recuentos en agar selectivo (MRS para las cepas de BAL y CLA para *L.monocytogenes*).

L. rhamnosus CTC1679, *L. sakei* CTC494 y *L. monocytogenes* CTC1034 mostraron mayor capacidad de adhesión a las células HT29 que la cepa de referencia *L. rhamnosus* GG, mientras que *L. casei* CTC1677, CTC1678 y *E.faecium* CTC8005 mostraron porcentajes de adhesión equivalentes. En el ensayo de competición, sólo *L. sakei* CTC494 fue capaz de reducir significativamente la adhesión del patógeno a las células HT29. Ninguna de las cepas testadas inhibieron la adhesión de *L. monocytogenes* CTC1034 a la monocapa de HT29 ya colonizada por las BAL y los porcentajes de adhesión se mantuvieron en los mismos niveles ($p>0.05$) que el patógeno añadido solo. En el estudio de desplazamiento, la adhesión de *L. monocytogenes*, previamente adherida a las células HT29, disminuyó ($p<0.05$) únicamente en presencia de *L. sakei* CTC494.

Podemos concluir que de las 5 cepas BAL ensayadas *L. rhamnosus* CTC1679 se erige como la más prometedora para colonizar el tracto gastrointestinal, seguida de *L. sakei* CTC494. Asimismo, los resultados obtenidos indican que la inhibición/desplazamiento de la adhesión del patógeno no está relacionada con la capacidad de adhesión de las cepas a la línea celular HT29. La cepa *L. sakei* CTC494, reconocido cultivo iniciador antilisteria, es la que ha mostrado mayor capacidad de competición y desplazamiento de la adhesión de *L. monocytogenes* CTC1034.

Este trabajo ha sido realizado en el IPLA en el marco de una estancia de formación de Raquel Rubio. Proyecto INIA RTA2009-00045-00-00.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, cultivo celular, adhesión, confluencia, probióticos.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus plantarum* con fenotipo de agregación

García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., Peláez, C., Requena, T., Martínez-Cuesta, M.C.

Biología Funcional de Bacterias Lácticas. Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM). C/Nicolás Cabrera 9, Campus Cantoblanco, 28049, Madrid. carmen.martinez@csic.es

RESUMEN

La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino constituye un criterio importante a tener en cuenta para la selección de cepas con potencial probiótico. Así, la capacidad de adhesión a componentes de la mucosa gastrointestinal es considerada como una propiedad fundamental para la colonización y para manifestar los efectos beneficiosos sobre la salud que proveen los probióticos en su interacción con el huésped. La autoagregación de cepas probióticas parece jugar un papel fundamental en la adhesión al epitelio intestinal, mientras que la capacidad de coagregación puede desarrollar una barrera que impida la colonización de bacterias patógenas. Algunas características físico-químicas de la superficie celular, tales como la hidrofobicidad, también pueden afectar a la capacidad de adhesión bacteriana.

Durante la caracterización de la colección de bacterias lácticas de nuestro laboratorio, aisladas de leche cruda y quesos artesanales, hemos podido observar cómo ciertas cepas de *Lactobacillus plantarum* muestran un fenotipo de autoagregación, mostrando de esta manera capacidad para formar agregados visibles tras la agitación vigorosa del cultivo. Así, en este trabajo se ha evaluado la correlación entre ciertas propiedades físico-químicas de la superficie celular y la capacidad de adhesión de cepas de *Lactobacillus plantarum* que fueron previamente seleccionadas por poseer este fenotipo de agregación. Para ello, se han llevado a cabo ensayos de hidrofobicidad, autoagregación, coagregación y adhesión a células intestinales Caco-2.

Los resultados mostraron que las cepas con mayor capacidad de autoagregación (que se correlacionó con el fenotipo visualmente observado tras 24 h de incubación del cultivo) fueron las que mostraron los mayores niveles de coagregación con los microorganismos ensayados *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Asimismo, se constató una relación positiva entre autoagregación y adhesión a células Caco-2, si bien se observó que otros factores, además de la capacidad de autoagregación, deben influir en la capacidad de adhesión. Por otra parte, no se observó ninguna relación entre hidrofobicidad y capacidad de adhesión para todas las cepas evaluadas.

Todos estos resultados sugieren que la capacidad de autoagregación de las cepas bacterianas así como su capacidad de coagregación con cepas patógenas pueden ser utilizadas como un primer paso a la hora de seleccionar cepas con potencial uso probiótico.

PALABRAS CLAVE: Probiótico, adhesión, autoagregación, coagregación

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Cinética de unión de la adhesina OppA de *Lactobacillus salivarius* a glicosaminoglicanos de la superficie epitelial: identificación de los motivos de unión mediante mutagénesis sitio específica.

Carla Martín, Susana Escobedo, José María Coll ¹, Evaristo Suárez, Gaspar Pérez ¹, Luis Quirós

Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. ¹ Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC), Valencia.

RESUMEN

Los lactobacilos juegan un papel fundamental en la protección de la mucosa vaginal frente a la invasión por microorganismos oportunistas o patógenos. Este efecto se implementa en gran medida a través de su unión al epitelio que recubre la cavidad, interfiriendo así con la adherencia del patógeno al epitelio.

En nuestro laboratorio hemos descubierto que las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en los proteoglicanos de la superficie de las células Hela, actúan como receptores para *Lactobacillus salivarius* Lv72.

En base a estos datos y mediante cromatografía en columnas de heparina, pudimos aislar una proteína con alta afinidad por este GAG. Esta molécula se identificó como una proteína extracelular homóloga al presunto transportador de péptidos OppA de *L. salivarius* UCC118. Tras clonar y sobreexpresar dicha proteína en *Escherichia coli*, se realizaron experimentos de competencia con la adherencia y se pudo ver que OppA interfiere la unión del lactobacilo a cultivos celulares en un proceso dependiente de su concentración. Esto sugiere que realmente juega un papel como adhesina en el reconocimiento de los receptores de la superficie celular eucariota.

La modelación estructural de OppA presenta un surco central con un diámetro adecuado para la inserción de los GAGs. En dicho surco existen dos motivos enfrentados entre sí con secuencias consenso de unión a heparina. Estas secuencias están integradas por aminoácidos hidropáticos y básicos, pudiendo actuar estos últimos como elementos de anclaje de los GAGs debido a su carácter altamente aniónico.

Para comprobar si dichos motivos están implicados en el anclaje a los GAGs, se procedió a su mutagénesis *in vitro* alterando la carga del aminoácido básico central. Una vez obtenidos los mutantes, se comprobó que dichas mutaciones afectan a la unión de OppA a los GAGs. La interacción entre los GAGs y la proteína OppA salvaje y mutantes, se examinó por Resonancia de Plasmón de Superficie en un Biacore T100, utilizando GAGs biotinilados e inmovilizados sobre chips de estreptavidina.

La proteína salvaje mostró una alta afinidad por heparán sulfato (HS) (K_D 113 nM), mientras que los condroitines sulfato (CS) poseían una afinidad un orden de magnitud inferior, siendo además dependiente de que la sulfatación apareciese en el C4 o C6 (K_D 1 μ M y 4,7 μ M para el condroitín sulfato C y condroitín sulfato A respectivamente) y de la epimerización del ácido glucurónico (K_D 1 μ M para el condroitín sulfato B). La heparina por su parte presentó una afinidad muy alta con una K_D de 2 nM. La mutación en el aminoácido 192K/E hizo descender la afinidad por HS un orden de magnitud (K_D 1 μ M) pero alteró poco la afinidad por los CSs (K_D de aproximadamente el doble).

En el caso de la mutación 424R/E, disminuyó drásticamente la afinidad por todos los GAGs, efecto que se vio reforzado en el doble mutante. Por tanto, los resultados reflejan que OppA se une a los GAGs a través de dichos motivos, unión que depende del tipo de GAG.

PALABRAS CLAVE: lactobacilo, vagina, glicosaminoglicano, adherencia, resonancia de plasmón de superficie.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Estudio de intervención nutricional doble ciego, controlado por placebo y aleatorizado para la evaluación de los efectos del consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 sobre la función intestinal y la respuesta inmune en adultos sanos

Noemí Redondo¹, Jorge R. Mujico¹, Ligia E. Díaz¹, Aurora Hernández¹, Alina Gheorghe¹, Marta Bermejo², M^a Paz Díaz-Ropero³, Mónica Olivares³, Esther Nova¹ y Ascensión Marcos¹

¹ Grupo de Inmunonutrición (Departamento de Metabolismo y Nutrición) - Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) - C/ José Antonio Novais 10 - 28040 - Madrid. ² Unidad de Vigilancia de la Salud del CSIC Central - Calle Serrano 117 - 28006 - Madrid. ³ BIOSEARCH S.A. - C/ Purchil 66 - 18004 - Granada

RESUMEN

Introducción: El consumo de bacterias lácticas ha acompañado al hombre a lo largo de la historia, pero fue a principios del siglo XX cuando se relacionó su consumo con propiedades beneficiosas para la salud. A partir de ese momento, una enorme cantidad de estudios (tanto *in vitro* como *in vivo*) han demostrado los efectos beneficiosos que el consumo de este tipo bacterias tiene sobre la salud. Efectos como la mejora de la función intestinal, prevención de infecciones intestinales e inmunomodulación han sido ampliamente demostrados. *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 es una cepa originariamente aislada de un queso de cabra fabricado artesanalmente, cuya especie se encuentra dentro del listado de bacterias calificadas como seguras (QPS, del inglés ‘*qualified presumption of safety*’) publicada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Objetivo: El objetivo principal del presente estudio consiste en evaluar los efectos de la cepa probiótica *L. coryniformis* CECT5711 sobre la función intestinal y la respuesta inmune en adultos sanos.

Diseño del estudio: En el estudio participan 120 individuos (20-43 años, 30% hombres y 70 % mujeres), normopeso (IMC 18,5-24,9 kg/m²) y sin anticuerpos frente a la Hepatitis A en el momento del inicio del estudio. El estudio completo tiene una duración de 8 semanas y consta de 3 periodos: durante el periodo de lavado (2 semanas), así como durante toda la intervención, los sujetos deben evitar el consumo de alimentos fermentados (tales como yogures, probióticos, encurtidos, quesos y ciertos embutidos); periodo pre-vacunación (2 semanas de intervención, previas a la vacunación frente a la Hepatitis A); y periodo post-vacunación (4 semanas de intervención, posteriores a la vacunación). Al terminar las 2 semanas del periodo de lavado, los voluntarios se distribuyen aleatoriamente en 3 grupos: (1) un grupo placebo, que recibe una cápsula diaria de maltodextrina durante las 6 semanas de intervención; (2) un grupo probiótico, que recibe una cápsula diaria de *L. coryniformis* CECT5713 durante las 6 semanas de intervención; y (3) un grupo mixto, que recibe una cápsula diaria de probiótico durante las 2 semanas previas a la vacunación y una cápsula diaria de placebo durante las 4 semanas posteriores a la vacunación. Se toman muestras de heces y sangre al principio (semana 0) y tras 2 y 6 semanas de tratamiento.

Evaluación de respuesta: Como variable principal se evaluará la respuesta inmunológica inducida por el proceso de vacunación y su modulación debido al consumo del probiótico. Se pondrá especial atención a los niveles de anticuerpos en plasma frente a los antígenos de la vacuna de la Hepatitis A (mediante ELISA). Como variables secundarias de respuesta (i) en heces, se analizará la frecuencia/consistencia de las deposiciones y los síntomas gastrointestinales, la microbiota fecal (mediante qPCR) y el perfil de ácidos grasos de cadena corta (mediante HPLC); y (ii) en sangre, se determinará el hemograma y la fórmula leucocitaria (laboratorio clínico UNILABS), las inmunoglobulinas totales (IgA/E/G/M, UNILABS), la osmolaridad y concentración de sodio (UNILABS), las subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19, CD45, CD45RA y CD45RO, mediante anticuerpos y citometría de flujo), las citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- α , IFN- γ , TGF- β y TNF- α , mediante ELISA y Milliplex[®]) y las actividades fagocítica (Fagotest[®], BD) y NK (mediante cultivos celulares y citometría de flujo).

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus*, vacunación, Hepatitis A, microbiota fecal, inmunonutrición

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

***Bifidobacterium longum* CECT 7347 regula el metabolismo del hierro en un modelo de enteropatía inducida por gliadinas**

Olivares M, Laparra JM, Sanz Y

Ecología Microbiana, Nutrición y Salud. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Avda. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna, Valencia

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune desencadenada por la ingesta de las proteínas del gluten (gliadina) de los cereales en individuos genéticamente predispuestos. En los pacientes la ingesta de gluten causa inflamación y pérdida de la arquitectura de la mucosa intestinal, lo que comúnmente conlleva malabsorción de nutrientes y aparición de anemia ferropénica. Un estudio previo llevado a cabo en nuestro grupo demostró que la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 era capaz de reducir la respuesta inflamatoria y mejorar la integridad del epitelio intestinal de ratas neonatas sensibilizadas con IFN- γ y alimentadas con gliadina.

OBJETIVO: Valorar el efecto que la cepa *B. longum* CECT 7347 podía ejercer sobre las alteraciones en la homeostasis del hierro mediadas por la gliadina.

METODOLOGÍA: Se emplearon ratas neonatas sensibilizadas o no con IFN- γ a las que se les administró gliadina acompañada o no de la bifidobacteria. A nivel sistémico, se midió el contenido de hemoglobina espectrofotométricamente mediante su oxidación a metahemoglobina y el de hepcidina por LC-Ms/Ms. En el hígado, el contenido de hierro total se cuantificó por espectrometría de absorción atómica. Mediante RT-qPCR se determinó la expresión de marcadores inflamatorios (IL-6, TNF- α) y de homeostasis del hierro (receptor de transferrina y hepcidina).

RESULTADOS: La administración de gliadina aumentó la deposición de hierro hepático, pero sólo las ratas sensibilizadas con IFN- γ mostraron concentraciones significativamente menores de hemoglobina en suero que los controles. Se observó un descenso en la expresión del receptor de transferrina en el hígado en las ratas sensibilizadas y no sensibilizadas a las que se les administró gliadina, que fue parcialmente restaurado por la administración de la bifidobacteria. Este descenso se acompañó en todos los grupos de un aumento en la expresión de IL-6, mientras que la expresión de TNF- α sólo aumentó significativamente en los animales a los que se les administró gliadina y en los sensibilizados con IFN- γ . Por último, la expresión de hepcidina en el hígado se redujo en todos los grupos que recibieron alguno de los tratamientos, pero de manera más acusada en los animales sensibilizados con IFN- γ y alimentados con gliadina acompañada o no de la bifidobacteria. Además, en este grupo de animales se observó un incremento significativo de la forma proteica de la hepcidina en suero.

CONCLUSIÓN: Los resultados en conjunto indican que la administración de *B. longum* CECT 7347 podría aminorar las alteraciones en la homeostasis del hierro ligadas al daño inducido por las gliadinas en un modelo animal de enteropatía.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad celíaca, *Bifidobacterium. longum* CECT 7347, homeostasis del hierro.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Evaluación del potencial probiótico de bacterias lácticas de origen enológico

Almudena García-Ruíz, Dolores González de Llano, Adelaida Esteban, Tomás García-Cayuela, Teresa Requena, Begoña Bartolomé, M. Victoria Moreno-Arribas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. c/ Nicolás Cabrera, 9. Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid. E-mail: victoria.moreno@csic.es

RESUMEN

Las bacterias lácticas del vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*, siendo *Oenococcus oeni* la especie más importante desde el punto de vista biotecnológico. La ecología de este grupo bacteriano es compleja y se caracteriza por presentar un crecimiento favorable en medios hostiles como el vino, i.e. bajo pH (en torno a 3,5), escasa proporción de nutrientes y presencia de etanol. La resistencia a estos factores junto con la similitud estructural y funcional con otros grupos bacterianos a los que pertenecen la mayoría de probióticos convencionales (especialmente procedentes de productos lácteos fermentados), convierte a las bacterias lácticas del vino en potenciales candidatos para ejercer efectos beneficiosos en la salud humana. Sin embargo, apenas existen estudios que describan la disponibilidad de una Colección de microorganismos de origen enológico correctamente identificados y que hayan sido caracterizados para determinar su posible aptitud como microorganismos beneficiosos para la salud.

Con el objetivo de explorar el potencial efecto para la salud humana de las principales especies de bacterias lácticas presentes en el vino, en este trabajo se ha realizado un estudio sistemático *in vitro* de caracterización de la funcionalidad probiótica de una colección de cepas de bacterias lácticas enológicas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y de la especie *Oenococcus oeni*, empleándose dos cepas probióticas, *Lactobacillus plantarum* CLC 17 y *L. fermentum* CECT 5716, como control. Inicialmente, se procedió a la identificación taxonómica de las cepas de bacterias lácticas enológicas mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Posteriormente, se evaluó la capacidad de resistencia al tránsito gastrointestinal mediante ensayos de resistencia a saliva, pepsina-jugo gástrico y sales biliares. Finalmente, se analizó la capacidad de adhesión a células intestinales humanas mediante el empleo de la línea celular Caco-2 como modelo *in vitro* del epitelio del colon. Los resultados mostraron una gran capacidad de supervivencia *in vitro* a las condiciones del tracto gastrointestinal y una buena adhesión a las células intestinales por parte de las bacterias lácticas enológicas estudiadas. En especial, la cepa *P. pentosaceus* CIAL-86 mostró un elevado porcentaje de adhesión a las células intestinales, incluso superior al mostrado por las cepas probióticas. En conjunto, estos resultados sugieren el potencial empleo de bacterias lácticas enológicas como microorganismos probióticos en la industria alimentaria.

PALABRAS CLAVE: bacterias lácticas, vino, potencial probiótico

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Selección de prebióticos y probióticos para la tercera edad

Lorena Valdés^{1*}, Nuria Salazar¹, Sonia González², Silvia Arboleya¹, Abelardo Margolles¹, Clara G. de los Reyes-Gavilán¹, Patricia Ruas-Madiedo¹ y Miguel Gueimonde¹

¹, Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)

² Departamento de Biología Funcional-Área de Fisiología (Universidad de Oviedo).

* IPLA-CSIC Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. E-mail: lvaldes@ipla.csic.es, mgueimonde@ipla.csic.es

RESUMEN

La microbiota intestinal ejerce importantes funciones en la salud del hospedador. La composición de esta comunidad microbiana se ve afectada por el envejecimiento, por lo que el desarrollo de productos prebióticos y probióticos dirigidos a modular la microbiota de esta población constituye una estrategia de gran interés. Sin embargo, el desarrollo de dichos productos requiere la identificación previa de las alteraciones específicas presentes en la microbiota de los ancianos que nos permita realizar una selección racional de prebióticos y/o probióticos en función de las mismas. Para identificar dichas alteraciones se analizó, mediante PCR cuantitativa, PCR cualitativa y por cromatografía de gases, la microbiota intestinal de 38 ancianos institucionalizados (media 84 años) y se comparó con la de un grupo control de 38 adultos de mediana edad (media 62 años). Los ancianos presentaron niveles más bajos de los grupos de *Bacteroides*, *Blautia coccooides* y de *Faecalibacterium prausnitzii*, niveles más elevados del grupo de *Lactobacillus* y una mayor incidencia de la especie *Bifidobacterium adolescentis*, así como niveles reducidos de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estos resultados se consideraron entonces objetivos para la modulación de la microbiota intestinal en personas de edad avanzada y se utilizaron para la selección de prebióticos y probióticos específicamente dirigidos a esta población. Con este fin se utilizaron cultivos *in vitro* de inóculos fecales de personas de edad avanzada, en los que se determinó el efecto de prebióticos (Inulina, Actilight, Synergy 1, FOS95 y Vivinalgos) sobre la microbiota intestinal. Los resultados obtenidos nos permitieron identificar los sustratos prebióticos con un mayor potencial para su utilización en la modulación de la microbiota intestinal de personas de la tercera edad.

PALABRAS CLAVE: microbiota intestinal, prebióticos, probióticos, tercera edad

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Análisis del carácter probiótico en lactobacilos productores de exopolisacáridos para su uso en la elaboración de alimentos funcionales

A. I. Puertas¹, I. Ibarburu¹, M. G. Llamas¹, I. Berregui¹, M. E. Muñoz², A. Prieto³ y M. T. Dueñas¹

¹Dpto. de Química Aplicada, ²Dpto. de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Paseo Manuel de Lardizabal, 3, San Sebastián. ³Departamento de Biología Medioambiental, Centro Investigaciones Biológicas, (C.S.I.C.), Madrid.

RESUMEN

Durante los últimos años y en colaboración con los grupos de las Dras. Paloma López y Rosa Aznar, hemos analizado el potencial probiótico de bacterias lácticas productoras de (1,3)(1,2)- β -D-glucanos pertenecientes a los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*, así como su aplicación para el desarrollo de alimentos funcionales, comprobando la capacidad tecnológica de estas estirpes para la elaboración de derivados lácteos o mezclas zumo-leche. En este trabajo se ha pretendido evaluar las características fenotípicas de relevancia probiótica de cuatro cepas de *Lactobacillus* productoras de heteropolisacáridos (HePS), así como su crecimiento en varias matrices alimentarias.

Las cepas seleccionadas fueron aisladas de sidra natural ahilada e identificadas como *L. collinoides* (CUPV2371), *L. suebicus* (CUPV225 y CUPV226), y *Lactobacillus* sp. (CUPV261). El análisis mediante HPLC-SEC de los HePS reveló la producción de dos fracciones con un peso molecular promedio en peso (Mw) del orden de 10^4 y 10^6 g/mol cuando fueron crecidas en un medio semidefinido con glucosa como sustrato, siendo estos polisacáridos resistentes al proceso de esterilización y a temperaturas de degradación por encima de los 200°C. Se estudió el comportamiento de estas bacterias al ser inoculadas en leche, bebida de avena o soja, y las características reológicas que aportaron a estos medios tras el periodo de incubación a 28°C y de almacenamiento a 4°C. Se observaron crecimientos en avena y soja con coagulación de estas matrices alimentarias, y solamente *Lactobacillus* sp. CUPV 261 provocó una disminución del pH en leche. Se analizó la resistencia de los aislados y de los HePSs a las condiciones de estrés del tracto digestivo, observándose efectos protectores de los alimentos sobre las bacterias y resistencia de los exopolisacáridos a pH ácidos y enzimas digestivas. En estas cepas se comprobó la capacidad de autoagregación y formación de biofilm así como cierto carácter hidrófobo, propiedades que han sido relacionadas con la capacidad de adhesión al epitelio intestinal.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus*, sidra, alimento funcional, exopolisacárido.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Estudios funcionales, de seguridad y de probiosis de una cepa productora de AS-48

A. Baños², J. García-López², R. Cebrián¹, C. Núñez², R. Pérez-Pulido¹, M. Martínez-Bueno¹, M. Maqueda¹, E. Valdivia¹

¹ Dpto Microbiología, Fac. Ciencias. Universidad de Granada. C/ Fuente Nueva s/n, 19071-Granada. ² DMC RESEARCH CENTER, S.L.U., Camino de Jayena s/n, 18620 Alhendín, Granada

RESUMEN

AS-48 es una bacteriocina circular de amplio espectro de actividad y elevada estabilidad térmica, en un extenso intervalo de pH y en el tiempo. Es producida por especies del género *Enterococcus*, y sus aplicaciones biotecnológicas, en los ámbitos alimentario, clínico y/o veterinario, están siendo abordadas por nuestro grupo de investigación en colaboración con diversas entidades.

Recientemente hemos aislado a partir de un queso artesanal una cepa productora de AS-48, UGRA10, que fue caracterizada por su ARNr 16S como *E. faecalis*, sobre la que estamos realizando un extenso estudio de sus características funcionales, de bioseguridad y probióticas, tanto *in vitro* como en cultivos celulares y en animales de experimentación. Sus características funcionales más destacables son sus altas actividades caseinasa, esterasa y esterasa lipasa C8. Mediante PCRs específicas hemos encontrado que UGRA10 presenta los genes *gelE*, *asal*, *esp*, *efaA* y *ace* y el gen para la tirosin Descarboxilasa, considerados como posibles genes de virulencia enterocócicos. Respecto a su resistencia a antibióticos, (investigada mediante el sistema semi-automático Wider, panel para Gram + 94B MIC/ID) se ha encontrado que es sensible a la mayoría de antibióticos de relevancia clínica, incluida vancomicina, y resistente a bajos niveles de gentamicina, tobramicina, y amikacina (aminoglucósidos), quinupristina/dalfopristina y clindamicina, si bien estas resistencias son consideradas como intrínsecas del género *Enterococcus*, en particular de la especie *E. faecalis*. En cuanto a las propiedades relacionadas con la supervivencia e implantación en el intestino, UGRA10 muestra buena resistencia al pH ácido, moderada resistencia al tratamiento consecutivo pH ácido/sales biliares, forma biofilmes y se adhiere a células Caco-2 y HeLa 229. Pero lo más interesante es su alta capacidad para interferir con la adhesión de *Listeria monocytogenes* a las células Caco-2.

Los estudios *in vivo* se han realizado con ratones BALB/c hembras, inmunocompetentes e inmunodeprimidos. En un primer experimento los ratones fueron administrados durante 21 días, mediante canulación intragástrica, con 10⁸ ufc de UGRA10. Durante ese periodo se siguió el estado de salud general de los animales determinando peso, ingesta y presencia de heces diarreicas u otros signos obvios de enfermedad. Al fin del experimento se obtuvieron el hemograma y diversos parámetros bioquímicos en sangre. No se han encontrado diferencias en ninguno de los parámetros entre los animales control, administrados con PBS, y los administrados con UGRA10. Además la ausencia de enterococos en hígado, bazo y ganglios mesentéricos descarta la posibilidad de translocación de la bacteria a través de la mucosa intestinal.

También se ha estudiado la velocidad de aclaramiento de los enterococos por el bazo de los animales determinando la presencia de enterococos en este órgano tras 1, 3 y 5 días después de ser administrados por vía plexo retro orbital con 10⁸ ufc de UGR10. En este caso, con propósitos de comparación, se estableció un lote de ratones administrado en idénticas condiciones con la cepa probiótica comercial *E. faecalis* Symbioflor y otro con la cepa de origen clínico *E. faecalis* CECT 5254. UGRA10 fue la cepa aclarada con mayor rapidez, desapareciendo del bazo entre los 3 y 5 días. Le siguieron las cepas Symbioflor y CECT 5254 que fueron detectadas en bazo a los 5 días a niveles de 1,29 y 1,36 log ufc, respectivamente.

Un tercer experimento ha sido llevado a cabo para estudiar el efecto protector de UGRA10 frente a la infección por *Listeria monocytogenes*. Para ello los ratones fueron administrados con 10⁹ ufc de UGRA 10 durante 20 días y entonces fueron inoculados por igual vía con 10⁹ ufc de *L. monocytogenes* CECT 4032 a la vez que se continuó administrando UGRA10 durante los 6 días siguientes a la infección. A los 3 y 6 días de la infección con *Listeria* se determinó la presencia del patógeno en hígado y bazo, encontrándose que los órganos de los ratones alimentados con el probiótico estaban significativamente ($P \leq 0.05$) menos infectados que los administrados sólo con PBS.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de excelencia P07-AGR-02539 de la Junta de Andalucía y el proyecto GREIB (CEB-005) de la Universidad de Granada.

PALABRAS CLAVE: AS-48, UGRA-10, probiótico, características funcionales, bioseguridad.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Explorando la capacidad colonizadora de bacterias lácticas probióticas en el modelo *in vivo* pez cebra

Iturria Iñaki¹, Russo Pasquale³, Mohedano M^a Luz², Rainieri Sandra¹, Spano Giuseppe³, Caggianiello Graziano³, López Paloma², Pardo Miguel Ángel¹

¹Unidad de Investigación Alimentaria. AZTI-Tecnalia, Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea, Edificio 609 E-48160 Derio, Bizkaia, Spain. E-mail: mpardo@azti.es. ²Departamento de Microbiología Molecular Centro de Investigaciones Biológicas CSIC-CIB, c/ Ramiro de Maeztu 9 28040 Madrid Spain. ³Department of Agriculture, Food and Environment Sciences. Università degli Studi di Foggia, Facoltà di Agraria, via Napoli 25, 71100 Foggia, Italy.

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios en la salud del organismo huésped (OMS, 2001), y generalmente pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). De hecho, se han propuesto varias especies de *Lactobacillus* como bacterias probióticas que incluso han sido comercializadas como ingredientes alimentarios. (Bove et al., 2013). A pesar de las investigaciones realizadas por medio de modelos *in vitro*, con el fin de comprobar la capacidad de estos microorganismos para colonizar el tracto gastrointestinal humano, no se ha dilucidado completamente su efecto *in vivo*. El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo vertebrado ampliamente utilizado en el estudio de numerosos procesos biológicos y que presenta muchas ventajas entre las que se encuentran: (i) las larvas son transparentes, permitiendo la observación de los órganos internos y el uso de marcadores fluorescentes; (ii) los costes de mantenimiento son relativamente bajos; (iii) son éticamente preferibles a los modelos mamíferos y (iv) su genoma se encuentra completamente secuenciado y existen herramientas para su análisis. En este trabajo se describe por primera vez el uso del pez cebra para estudiar la capacidad de colonización *in vivo* del tracto digestivo por parte de diferentes especies de BAL monitorizando la expresión de una proteína recombinante fluorescente.

Se obtuvieron larvas totalmente axénicas de pez cebra empleando un procedimiento que combina el uso de antibióticos (Pham et al, 2008) y un tratamiento de luz pulsada. Por otro lado, se construyeron cepas recombinantes de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* empleando un nuevo vector, pRCR12 (no publicado), que contiene un gen *mrfp* sintético controlado por el promotor Px, diseñado para la expresión óptima de la proteína mCherry en BAL. (García-Cayuela et al. 2012). Se expusieron a estos microorganismos tanto larvas gnotobióticas (axénicas) como convencionales (no axénicas) ambas de 5 dpf (días post fecundación) por medio de su inmersión en un medio líquido a una concentración bacteriana de 10⁷ ufc/mL, 27 °C y sometido a agitación (90 rpm) durante 16 h. Pasado ese tiempo de exposición se lavaron las larvas varias veces y se comprobó la capacidad de colonización de las diferentes cepas a las 5 y 24h por visualización a través de un estereomicroscopio de fluorescencia.

Las diferentes especies de BAL analizadas mostraron diferentes capacidades de adhesión como demostraron los resultados obtenidos por observación de la fluorescencia a las 5h. *Lactobacillus plantarum* mostró la tendencia a adherirse tanto al intestino proximal como al distal, mientras que *L. fermentum* se pudo localizar únicamente en el intestino distal. Así mismo, se observó que la fluorescencia registrada en las larvas expuestas a *L. plantarum* era mayor que en las expuestas a *L. fermentum*. A las 24h tras la exposición, no se observó fluorescencia en larvas expuestas a *L. fermentum*, mientras que aproximadamente el 50% de las larvas expuestas a *L. plantarum* siguieron presentando fluorescencia, principalmente en el intestino distal. No se observaron diferencias significativas entre las larvas gnotobióticas y las convencionales.

En conclusión, los resultados sugieren que la larva del pez cebra representan un modelo animal alternativo que puede ser de gran utilidad en el estudio *in vivo* de la actividad de los microorganismos probióticos.

Referencias:

- Bove P., Russo P., Capozzi V., Gallone A., Spano G., Fiocco D. (2013). Microbiol Res 168: 351-359.
De Vrese M., Schrezenmeir J. (2008). Adv Biochem Eng Biotechnol 111: 1-66.
García-Cayuela, T., Gómez de Cadiñanos, L.P., Mohedano, M.L., Fernández de Palencia, P., Boden, D., Wells, J., Peláez, C., López, P., Requena, T. (2012). Appl Microbiol Biotechnol 96:171-181.
Pham LN., Kanther M., Semova I., Rawls JF. (2008). Nat Protoc 3: 1862-75.

PALABRAS CLAVE: probiótico, bacteria ácido láctica, pez cebra, colonización, gnotobiótico.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Suceptibilidad a antibióticos de cepas de *Lactobacillus pentosus* con potencial probiótico: búsqueda de genes de resistencia

A. León-Romero, J. Bautista-Gallego, F.N. Arroyo-López, A. Garrido-Fernández y R. Jiménez-Díaz

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC), Avda. Padre García Tejero, 4, 41012 Sevilla

RESUMEN

Se ha estudiado la resistencia a antibióticos de 15 cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas de mesa estilo español o sevillano. Dichas cepas se seleccionaron en función de sus características potencialmente probióticas (portadoras de genes de adhesión a la mucosa, tolerancia al pH ácido, al jugo gástrico y a las sales biliares, capacidad de autoagregación y coagregación, alta tasa de hidrofobicidad, producción de bacteriocinas, etc.) y tecnológicas.

Los antibióticos y los rangos de concentraciones utilizados fueron los siguientes: ciprofloxacina, 2-512 µg/ml; cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, penicilina y tetraciclina, 0.125-32 µg/ml; kanamicina y estreptomycin, 32-4.096 µg/ml; y rifampicina y ampicilina, 0.125-16 µg/ml. Se determinó la supervivencia de cada una de las cepas de *L. pentosus* (expresada en % respecto al control sin antibiótico) utilizando para ello un espectrofotómetro automatizado modelo Bioscreen C, incubando las placas con las muestras a 30 °C durante 48 h. Asimismo, se obtuvieron las CMI₅₀ y CMI₉₀ para cada cepa y antibiótico. Por otro lado, se determinó la presencia de genes de resistencia a eritromicina y tetraciclina en dichas cepas, así como en 61 cepas más aisladas de fermentaciones de aceitunas, procedentes de salmueras y biofilms adheridos a la epidermis de los frutos.

De las 15 cepas de *L. pentosus*, 11 y 12 cepas fueron resistentes a kanamicina y lincomicina, respectivamente. Todas las cepas de *L. pentosus* fueron sensibles a los demás antibióticos probados, con CMIs por debajo de los puntos de corte establecidos por la EFSA (2008) para *L. plantarum*.

La presencia de genes de resistencia a antibióticos (eritromicina y tetraciclina) se llevó a cabo mediante PCR utilizando primers específicos descritos en la bibliografía. El gen *erm(B)* se encontró en 18 cepas, mientras que *erm(C)* se encontró en 5 de ellas. Tan sólo 2 cepas presentaron ambos genes simultáneamente. Por otro lado, el gen *tet(M)* se encontró en 10 cepas mientras que *tet(S)* no se detectó en ninguna. Finalmente, tan sólo dos cepas de las 76 ensayadas presentaron simultáneamente los genes *tet* y *erm*.

Estos resultados indican que la mayoría de las cepas analizadas son aptas para su utilización como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas, ya que no presentan riesgo alguno de transmisión de resistencias a antibióticos.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus pentosus*, fermentación, aceitunas, antibióticos, probióticos

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Actividad inhibitoria de *Lactobacillus reuteri* INIA P572, productor de reuterina, frente a *Clostridium* spp. relacionadas con la hinchazón tardía del queso

Marta Ávila, Natalia Gómez y Sonia Garde

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de La Coruña km 7, Madrid 28040

RESUMEN

La hinchazón tardía es una de las principales alteraciones que se produce en quesos duros y semiduros, y origina defectos de textura, aroma y sabor en el queso que dan lugar a pérdidas económicas importantes. *Clostridium tyrobutyricum* se considera el causante principal de la hinchazón tardía de queso, pero se ha visto que otras especies como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* también contribuyen a la aparición de la misma. La hinchazón tardía aparece cuando las cepas de *Clostridium* llevan a cabo la fermentación del ácido láctico con producción de ácido butírico y ácido acético, CO₂ y H₂. La presión de los gases acumulados puede causar rajaduras y roturas en el queso, generalmente acompañadas de un olor desagradable y rancio.

Por otra parte, la bioconservación de alimentos mediante el empleo de bacterias lácticas productoras de metabolitos antimicrobianos constituye una alternativa importante para mejorar su calidad y seguridad. Entre estos metabolitos se encuentra la reuterina (3-hidroxiacetaldehído), producida por distintas especies de *Lactobacillus* (*L. reuteri*, *L. coryniformis*, *L. collinoides*, *L. buchneri*, *L. brevis*) a partir de glicerol. Es un potente agente antimicrobiano activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, mohos y protozoos. Es soluble en agua, y resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas, y estable en un amplio rango de pH. Por ello, y por su amplio espectro inhibitorio, nos planteamos que el empleo de bacterias lácticas productoras de reuterina como adjuntos en la fabricación de queso podría constituir una estrategia alternativa a las existentes para prevenir la hinchazón tardía de queso.

Previo al estudio de la eficacia de esta estrategia en queso, se ha evaluado la actividad inhibitoria de la reuterina producida por *L. reuteri* frente a esporas y células vegetativas de 4 especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes*). Se utilizó un sobrenadante libre de células con una concentración de reuterina 65 mM, producido por *L. reuteri* INIA P572 a partir de una solución acuosa de glicerol 100 mM, tras una incubación de 3 h a 37°C en anaerobiosis. Cada especie de *Clostridium* estuvo representada por tres cepas, una de colección y dos aisladas de quesos Manchegos con hinchazón. También se incluyeron en el estudio la lisozima y el nitrato de sodio, inhibidores que se emplean más comúnmente para prevenir la hinchazón tardía en el queso, así como nisina, bacteriocina eficaz frente a aislados de *Clostridium* en un estudio previo. Las máximas concentraciones ensayadas de los inhibidores fueron 32,5 mM, 1000 UI/ml, 400 µg/ml y 800 µg/ml para la reuterina, nisina, lisozima y nitrato, respectivamente. Las placas de microtiter se inocularon con 10⁵ esporas/ml ó 10⁶ células vegetativas/ml, en caldo RCM y leche, y se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 7 días.

La sensibilidad de las distintas cepas de *Clostridium* a los antimicrobianos fue cepa dependiente, pero en general *C. sporogenes* mostró mayores CMI que el resto de especies. Las CMI también fueron en general mayores para las esporas que para las células vegetativas, y en leche que en caldo RCM. El nitrato no inhibió el crecimiento de las células vegetativas ni de las esporas de ninguna de las cepas, a pesar de que se ensayó una concentración máxima muy superior a la que permite la legislación europea. La reuterina y nisina fueron capaces de inhibir el crecimiento de todas las cepas de *Clostridium*, al menos a una de las concentraciones ensayadas. La lisozima no fue capaz de inhibir a la máxima concentración ensayada, habitualmente empleada en las queserías, el crecimiento de *C. sporogenes*. En general, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* se mostraron bastante resistentes a la acción de la lisozima. Sin embargo, este antimicrobiano resultó eficaz en la inhibición de dos de las cepas de *C. tyrobutyricum*.

PALABRAS CLAVE: *Clostridium*, reuterina, nisina, lisozima, hinchazón tardía, queso

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Efecto combinado de reuterina, diacetilo y ácido láctico frente a microorganismos patógenos alimentarios

Martín-Cabrejas, I., Langa, S., Montiel R., Rodríguez, E., Arqués, J.L., Medina, M.

Dpto. Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. La Coruña Km 7, Madrid 28040

RESUMEN

Las bacterias lácticas son los principales componentes en la elaboración y maduración de productos lácteos fermentados. Los mecanismos fundamentales de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH. Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, reuterina, etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico e isómeros D de aminoácidos. El diacetilo (2,3-butanodiona) forma parte de los compuestos responsables del aroma del queso, pudiéndose encontrar a concentraciones de aproximadamente 20 ppm en este producto (Dacremont y Vickers, 1994).

La combinación de reuterina (β -hidroxipropionaldehído) con otros antimicrobianos ha sido poco investigada. Se ha descrito que la presencia de ácido láctico (5% vol/vol) puede aumentar la actividad inhibitoria de la reuterina frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en carne (El-Ziney *et al.*, 1999).

En este trabajo estudiamos la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis y *L. monocytogenes* de reuterina en presencia de diferentes concentraciones de diacetilo, y en condiciones de pH neutras y ácidas. Para ello, se emplearon las cepas seleccionadas *Lactobacillus reuteri* INIA P572 e INIA P579, las cuales mostraron previamente buenas características tecnológicas y mayores niveles de producción de reuterina en modelos de queso y yogurt (Langa *et al.*, 2013), así como reuterina purificada.

Inicialmente se realizaron ensayos de inhibición mediante la técnica descrita por Spinler *et al.* (2008). Se cultivó *L. reuteri* en gota en doble capa de medio sólido en presencia de glicerol 50 mM, a pH de 7 y 5 (ac. láctico) y con concentraciones de diacetilo de 10, 25, 50 y 100 ppm, incluyéndose los correspondientes controles negativos. También se realizaron pruebas en medio líquido, realizando curvas de crecimiento de los patógenos a 37°C en placas multipocillo con el sistema Bioscreen C a concentraciones de reuterina purificada de 1 y 2 UR/ml y de diacetilo de entre 10 y 50 ppm. En ambos ensayos se observó un mayor efecto antimicrobiano de la reuterina a pH 5 frente a las tres cepas patógenas testadas. El efecto antimicrobiano de la reuterina aumentó claramente a ambos valores de pH en presencia de concentraciones crecientes de diacetilo de hasta 50 ppm, en el caso de *E. coli* O157:H7 y *S. Enteritidis*. Para *L. monocytogenes*, este efecto del diacetilo solamente se observó a pH ácido.

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se confirmaron en leche inoculada con los patógenos e incubada 24 h a 37°C. Se observó un efecto inhibitorio sinérgico para las tres cepas patógenas al combinar reuterina (1 UR/ml) con ácido láctico (pH 5), o con diacetilo (50 y 100 ppm). El potente efecto antimicrobiano de la combinación de reuterina con pH ácido aumentó de forma sinérgica en presencia de diacetilo 100 ppm en el caso de *L. monocytogenes*.

Referencias:

Dacremont C y Vickers Z (1994). *J. Food Sci* 59: 981-985.

El-Ziney MG, van den Tempel T, Debevere J, Jakobsen M (1999). *J Food Protect* 62: 257-261.

Langa S, Landete JM, Martín-Cabrejas I, Rodríguez E, Arqués JL, Medina M (2013). *Food Control* 33: 200-206.

Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J (2008). *Anaerobe* 14:166-171.

PALABRAS CLAVE: Reuterina, diacetilo, pH, efecto combinado.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Resistencia a antimicrobianos en enterococos procedentes de alimentos

Leire Lavilla Lerma, Miguel Ángel Fernández Fuentes, Antonio Sánchez Valenzuela, M^a José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Hikmate Abriouel, Elena Ortega Morente, Rosario Lucas López, Nabil Benomar, Magdalena Martínez Cañamero, Antonio Gálvez

Universidad de Jaén, Dpto. Ciencias de la Salud. 23071-Jaen. agalvez@ujaen.es

RESUMEN

La resistencia a antimicrobianos en bacterias a lo largo de la cadena alimentaria es un tema cada vez más preocupante. La resistencia a antibióticos de uso clínico ha sido y es objeto de numerosos estudios, dado el impacto directo que tiene para la salud humana. Sin embargo, los estudios sobre resistencia a otros agentes o factores que comprometen la supervivencia de los microorganismos son mucho más limitados. Los biocidas constituyen un grupo amplio de sustancias antimicrobianas de amplio espectro que presentan numerosos usos industriales (incluyendo por ejemplo procesos de desinfección o desarrollo de recubrimientos antimicrobianos) así como en productos para la salud y el aseo personal. La exposición a este tipo de agentes antimicrobianos puede ser un factor para la co-selección de resistencias a antibióticos.

Las bacterias del género *Enterococcus* (y en especial las especies *E. faecalis* y *E. faecium*) representan uno de los grupos de bacterias lácticas más versátiles por su capacidad para proliferar en diferentes ambientes tanto bióticos como abióticos, producir sustancias antimicrobianas, e intercambiar determinantes genéticos de resistencia a antibióticos. Los enterococos también presentan interés en el ámbito de la salud humana y animal bien como comensales, por el carácter probiótico que presentan algunas cepas, o por su capacidad de actuar como patógenos oportunistas. Están presentes en numerosos alimentos fermentados, y en algunos de ellos son importantes en las etapas de maduración.

En el marco de un proyecto más amplio sobre resistencia a antibióticos y biocidas en la cadena alimentaria, hemos estudiado una colección de enterococos procedentes de diferentes ambientes, en cuanto a su resistencia a diferentes tipos de biocidas (derivados de amonio cuaternario, bisfenoles, guaninas y poliguaninas) y a antibióticos. El estudio molecular de los determinantes genéticos implicados ha permitido establecer la presencia de diferentes bombas de exporte hasta ahora no descritas en este grupo bacteriano y que contribuyen al aumento de la tolerancia a biocidas y otros agentes antimicrobianos en enterococos. La adición de inhibidores de bombas de exporte reduce la tolerancia a los antimicrobianos ensayados, demostrando el papel protector de las mismas. Se ha iniciado un estudio de tipificación por MLST (Multi-Locus Sequence Typing) de las cepas más representativas procedentes de diferentes ambientes. Los resultados obtenidos para cepas de *E. faecium* procedentes de alimentos de origen vegetal indican que todas ellas pertenecen a seis secuencias tipo (STs) que están bastante alejadas de los complejos clonales actualmente considerados de interés clínico. Los resultados permiten obtener una nueva perspectiva de los mecanismos de resistencia/tolerancia de este grupo de bacterias.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2009-08921 y P08-AGR-4295 así como por el Plan Propio de Apoyo a la Investigación de la U. de Jaén.

PALABRAS CLAVE: Enterococos, resistencia a biocidas

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Las bacterias del ácido láctico como vectores para la producción en el intestino delgado de enzimas capaces de degradar el gluten

Patricia Álvarez-Sieiro, Begoña Redruello, Víctor Ladero, M^o Cruz Martín, María Fernández and Miguel A. Álvarez.

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n. 33300. Villaviciosa, Asturias, España.

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de carácter autoinmune que se desarrolla tras la ingestión de gluten en individuos genéticamente predispuestos. Se estima una prevalencia de 1:100 personas en todo el mundo y puede llegar a desencadenar graves síntomas extra intestinales, relacionados incluso con mortalidad. El único tratamiento que existe actualmente es una dieta libre de gluten para toda la vida del paciente. La dificultad de seguir esta dieta ha impulsado el estudio de nuevas terapias alternativas. Actualmente se conocen los péptidos del gluten responsables de la enfermedad, los cuales poseen una secuencia aminoacídica rica en residuos de prolina y glutamina que les confiere resistencia a la degradación por los enzimas del tracto gastrointestinal y que está asociada a su toxicidad. Por lo tanto, una opción terapéutica sería la degradación de estos péptidos inmunotóxicos.

Las prolil endopeptidasas (PEP) son enzimas ampliamente estudiados por su posible uso como agentes terapéuticos frente a la EC, ya que degradan específicamente residuos internos de prolina. El problema es que, aunque degradan los péptidos inmunotóxicos del gluten, su irreversible inhibición bajo condiciones gástricas dificulta su uso mediante vía oral. En este contexto, se han desarrollado varias cepas de *Lactobacillus casei* de grado alimentario que producen distintas PEP. *L. casei* actúa como un vector resistente al paso por el tracto gastrointestinal y capaz de producir PEP en el intestino delgado, donde se dan las condiciones óptimas para esta actividad enzimática y por lo tanto para la degradación de los péptidos inmunotóxicos.

Paralelamente, se ha llevado a cabo otra estrategia que nos ha permitido aislar a partir de muestras de alimentos con alto contenido en gluten, BAL capaces de degradar los péptidos inmunotóxicos responsables de la EC.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad celíaca, gluten, prolil endopeptidasa, lactobacillus, bacterias del ácido láctico

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Desarrollo de un queso fresco con *Lactobacillus salivarius* UCM37, una cepa aislada de leche materna con propiedades probióticas

Nivia Cárdenas¹, Martha Cruz, Rosa Escudero¹, Esther Jiménez¹, Ángela Peirotén², Javier Calzada², Margarita Medina², Juan Miguel Rodríguez¹, Leónides Fernández¹

¹Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. ²Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA. Ctra. de la Coruña, km. 7,5 28040 Madrid

RESUMEN

La producción de quesos con la incorporación de cultivos probióticos constituye una oportunidad interesante en el mercado de los alimentos funcionales. Por un lado, dentro de los productos lácteos, el queso es uno de los más consumidos por cualquier grupo de la población debido a la amplia variedad en las que se presenta. Pero, además, las características de este producto (pH menos ácido y una mayor capacidad tampón, una consistencia más sólida y un contenido en grasa relativamente superior a otros productos lácteos) pueden ofrecer una mayor protección a las bacterias probióticas para que mantengan su viabilidad durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Por otro lado, diversos estudios han confirmado que la leche materna es una fuente de bacterias lácticas y bifidobacterias con un potencial probiótico comparable al de otras cepas empleadas en la elaboración de productos probióticos comerciales (Martín y col., 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la incorporación de *Lactobacillus salivarius* UCM37, una cepa aislada de leche materna, para desarrollar un queso probiótico. Esta cepa se seleccionó teniendo en cuenta diversas propiedades bioquímicas y probióticas, que habían sido ensayadas en estudios previos. Durante la elaboración del queso, el probiótico liofilizado se añadió a la cuajada cortada, después del desuerado, hasta obtener una concentración final de 10^8 ufc/g. En los quesos experimentales elaborados se evaluó la supervivencia de *L. salivarius* UCM37 a lo largo del almacenamiento del queso (hasta un máximo de 28 días) para comprobar su viabilidad durante la vida útil del producto. Paralelamente se hizo un seguimiento de dicho probiótico mediante PCR-DGGE, una técnica molecular independiente de cultivo. Por otro lado, se determinaron las características físico-químicas básicas del queso: humedad, actividad de agua (a_w), grasa, proteína, lactosa, cenizas y pH. En cuanto a las propiedades sensoriales, se hizo el análisis de perfil de textura (TPA), en el que se incluyen los parámetros de dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad, y se realizó un análisis del color con un colorímetro triestímulo. Para evaluar la contribución de *L. salivarius* UCM37 al desarrollo del aroma en el producto, se analizaron los compuestos volátiles por SPME-GC/MS. Por último, se hizo una evaluación sensorial para determinar la calidad organoléptica del queso fresco elaborado.

Además de confirmarse la presencia de DNA de *L. salivarius* UCM37 en el queso, se comprobó que su viabilidad fue apropiada. Se obtuvieron recuentos de bacterias probióticas viables en torno a 10^7 ufc/g de queso después de 28 días en refrigeración. Esta concentración sería satisfactoria según las recomendaciones dadas para los productos probióticos (Talwalkar y col., 2004). Respecto al color y el perfil de textura no hubo diferencias significativas entre el queso probiótico y el control, que había sido elaborado en las mismas condiciones exceptuando la adición de *L. salivarius* UCM37. Sin embargo, la concentración de algunos compuestos volátiles como alcanos, 2-propanona y acetoína, compuestos que tienen una incidencia positiva en el aroma de los quesos, fue superior en los quesos en los que se había adicionado *L. salivarius* UCM37. La evaluación sensorial del queso probiótico con *L. salivarius* UCM37 por parte de jueces entrenados fue buena, superando incluso en ciertos aspectos a los quesos control.

En conclusión, *L. salivarius* UCM37 tiene un excelente potencial para el desarrollo de un queso probiótico.

Martín et al. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:965-9. Talwalkar et al. 2004. *Int. Dairy J.* 14:1055-66.

PALABRAS CLAVE: queso probiótico, *Lactobacillus salivarius*, leche materna

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Identificación de una nueva actividad en un viejo enzima

^aSara Callejón, ^bRamón Sendra, ^aIsabel Pardo y ^aSergio Ferrer

^aENOLAB – Departament de Microbiologia i Ecologia/ERI BIOTECMED/MCL IViSoCa. Universitat de València, Dr. Moliner, 50. E-46100, Burjassot, Valencia, España. ^bDepartament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat de València, Dr. Moliner, 50. E-46100, Burjassot, Valencia, España.

RESUMEN

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas de bajo peso molecular que se producen con frecuencia en los alimentos y bebidas fermentados. A concentraciones elevadas pueden ser tóxicas para la salud humana y sus efectos se incrementan por la presencia de etanol en el caso de las bebidas alcohólicas. Además, su existencia afecta negativamente la comercialización de los vinos. Los principales objetivos de este trabajo han sido la búsqueda de actividades enzimáticas responsables de la degradación de AB en bacterias lácticas del vino (BAL), su identificación y la evaluación de su aplicación en vino con el fin de reducir estos compuestos tóxicos. La detección de las actividades enzimáticas en extractos celulares se realizó por ensayo en gel de poliacrilamida con tinción específica de actividad. La capacidad de degradar las aminas biógenas por parte de células se cuantificó en medio sintético y en vino por HPLC. La purificación de los enzimas se consiguió por precipitación fraccionada con sulfato amónico, cromatografía de intercambio catiónico y resolución de proteínas por PAGE en presencia de SDS. La identificación de la proteína purificada se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, acoplado a TOF-TOF.

De los setenta y seis extractos celulares analizados mediante ensayo de actividad en gel, el 56% mostraron actividad degradadora de aminas biógenas. La determinación de las actividades de células enteras en medio sintético sobre histamina, tiramina y putrescina mostraron que la mayoría de las bacterias analizadas fueron capaces de degradar las tres aminas. Las seis cepas más activas en medio sintético, pertenecientes a las especies *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus farciminis*, se ensayaron también en vino. Los mayores porcentajes de degradación se alcanzaron para la putrescina que disminuyó en un 41% tras una semana de incubación. Se consiguió una degradación del 28% para la tiramina y un 15% para la histamina. Se aislaron y purificaron los enzimas responsables de la degradación de AB procedentes del extracto de *Lactobacillus plantarum* J16 y de *Pediococcus acidilactici* 4626. Ambos enzimas resultaron ser multicobre oxidasas (MCO). En este trabajo se ha demostrado la doble función de los enzimas purificados en estas especies, que actúan sobre el 2,6-dimetoxifenol como multicobre oxidasas y también sobre las aminas biógenas, aunque la naturaleza de esta reacción es aún desconocida. Este es el primer trabajo en el que se ha llevado a cabo una eficiente reducción de AB en vino usando BAL y además, se ha identificado y purificado el enzima responsable de la degradación de aminas en *L. plantarum* J16 y *P. acidilactici* 4626.

Agradecimientos: Ministerio de Educación y Ciencia, por la financiación de los proyectos AGL2006-08495 y AGL2009-12167), fondos FEDER y Excmo. Ayuntamiento de Valencia.

PALABRAS CLAVE: Vino, aminas biógenas, histamina, tiramina, putrescina, multicobre oxidasa, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Caracterización cuanti/cualitativa de la producción de ácido láctico (L (+) y D (-)) por 18 cepas lácticas y optimización de la producción de este compuesto por la cepa seleccionada como hiperproductora

Raquel Virto, Beatriz Marín

CNTA Carretera NA-134, Kilómetro 53. 31570 San Adrián (Navarra)

RESUMEN

En el marco de un proyecto de investigación y desarrollo Europeo (CARBIO- convocatoria LEAD-Era) liderado por la empresa de gestión de subproductos agroalimentarios (Tratamiento Subproductos Agroalimentarios S.L. -TRASA) CNTA realizó un screening de 18 cepas lácticas con objeto de seleccionar aquella que a temperaturas de mesofilia ($\leq 40^{\circ}\text{C}$) produjese la máxima concentración de ácido láctico dirigido a su posterior polimerización y producción del biopolímero plástico ácido poli-láctico (PLA). El ácido poli-láctico (PLA) es un polímero biodegradable derivado del ácido láctico. Es un material altamente versátil, que se hace a partir de recursos renovables al 100%, como son la maíz, la remolacha, el trigo y otros productos ricos en almidón. Este ácido tiene muchas características equivalentes e incluso mejores que muchos plásticos derivados del petróleo, lo que hace que sea eficaz para una gran variedad de usos. El PLA puede obtenerse por condensación directa del ácido láctico o bien por polimerización tras la apertura del anillo de L-lactida (ROP: ringopening polymerization).

Existen dos isómeros ópticos de ácido láctico, el D(-) láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D(-) y L (+). A diferencia del isómero D(-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano. Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición.

Con objeto de caracterizar completamente la producción de ácido láctico por parte de las 18 cepas lácticas propuestas por CNTA, se realizaron las curvas de crecimiento y de evolución de pH en caldo de cultivo modelo rico en monosacáridos (MRS) y se aplicó el modelo cinético de Gompertz para cuantificar las velocidades de crecimiento microbiano (parámetro B), los incrementos de recuento (parámetro C), las velocidades de acidificación (BpH) y los descensos de pH máximos alcanzados (parámetro ΔpH).

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Bacteria	B (h^{-1})	C (Log UFC/mL)	BpH (h^{-1})	ΔpH
<i>L. rhamnosus</i>	0,33	3,08	0,25	1,49
<i>L. casei</i> CECT 475	0,26	2,95	0,21	1,52
<i>L. gasseri</i> CECT 4479	0,46	2,96	0,23	1,53
<i>L. sakei</i>	0,23	2,99	0,16	1,26
<i>L. curvatus</i>	0,19	2,88	0,14	1,32
<i>L. mesenteroides</i>	0,23	2,97	0,31	1,26
<i>Leuconostoc spp.</i>	0,24	2,69	0,31	1,25
<i>Lc. lactis</i> Oveja	1,27	2,37	0,94	1,45
<i>L. acidophilus</i> CECT 903	0,45	2,47	0,18	1,43
<i>L. plantarum</i> CECT 220	0,37	3,10	0,34	1,51
<i>L. casei</i> ACTIMEL	0,19	3,43	0,17	1,52
<i>L. delbrueckii</i>	0,25	3,14	0,14	1,35
<i>L. alimentarius</i> P	0,33	4,32	0,09	1,55
<i>L. sakei</i> P	0,29	2,99	0,13	1,32
<i>L. plantarum</i> P	0,40	3,27	0,29	1,46
<i>L. reuteri</i>	0,37	2,96	0,21	1,34
<i>L. paracasei</i> Zumos	0,30	3,02	0,27	1,45
<i>L. casei</i> Oveja	0,35	2,81	0,48	1,47

Estos resultados cinéticos (crecimiento y acidificación) serán utilizados en el cálculo de rendimientos (ácido láctico/unidad de biomasa; ácido láctico/unidad de tiempo) y constituirán en sí mismo un argumento más para la selección del microorganismo más adecuado para optimizar la producción de ácido láctico.

En cuanto la producción de ácido láctico por estas 18 cepas bacterianas, la siguiente tabla muestra los

resultados obtenidos.

Bacterias (BAL)	Consumo de Glucosa (g/L)	producción ácido láctico (g/L)	Producción L láctico (g/L)	Producción D láctico (g/L)	Producción otros ácidos (g/L)
<i>L. rhamnosus</i>	18,95 ±0,07	9,94 ±4,95	13,07 ±4,90	0,16 ±0,17	2,78 ±3,61
<i>L. casei</i> CECT 475	17,3 ±2,40	14,7 ±2,42	15,32 ±4,62	0,37 ±0,52	-1,11
<i>L. gasserii</i> CECT 4479	15,6 ±3,57	14,19 ±4,56	6,57 ±2,20	8,96 ±1,91	-2,65
<i>L. sakei</i>	13,81 ±4,67	6,58 ±1,91	5,2 ±1,52	0,22 ±0,11	2,56 ± 1,57
<i>L. curvatus</i>	11,7 ±1,84	6,34 ±2,53	4,43 ±1,38	1,32 ±1,28	1,19 ±4,49
<i>L. mesenteroides</i>	16,6 ±0,42	6,25 ±2,76	0,82 ±1,50	4,45 ±3,62	1,96 ±4,98
<i>Leuconostoc spp.</i>	16 ±0,42	5,91 ±0,49	0,1 ±0,43	0 ±0,00	5,81 ±0,15
<i>Lc. lactis</i> Oveja	19 ±0,00	8,13 ±8,07	10,17 ±8,06	0,06 ±0,75	-2,19
<i>L. acidophilus</i> CECT 903	12,85 ±3,39	7,73 ±1,74	3,45 ±1,41	0,04 ±0,00	4,96 ±2,08
<i>L. plantarum</i> CECT 220	19 ±0,00	15,32 ±1,56	5,07 ±0,54	9,97 ±1,71	1,7 ±0,49
<i>L. casei</i> ACTIMEL	17,7 ±0,85	11,19 ±4,35	10,05 ±3,98	0,06 ±0,54	5,08 ±2,87
<i>L. delbrueckii</i>	11,7 ±0,42	7,51 ±2,68	0,71 ±0,43	4 ±1,29	5,89 ±2,13
<i>L. alimentarius</i> P	12,75 ±0,49	8,06 ±1,48	3,04 ±2,46	4,22 ±2,34	2,94 ±0,48
<i>L. sakei</i> P	10,95 ±1,63	7,52 ±0,94	6,46 ±0,28	0 ±0,18	1,91 ±0,51
<i>L. plantarum</i> P	16,64 ±2,08	15,55 ±4,55	3,33 ±3,00	7,23 ±3,18	2,84 ±4,85
<i>L. reuteri</i>	19 ±0,00	9,23 ±2,13	6,14 ±2,58	0 ±0,00	3,86 ±1,88
<i>L. paracasei</i> Zumo	15,87 ±2,73	13,25 ±2,73	9,53 ±3,20	0 ±0,72	3,37 ±2,09
<i>L. casei</i> Oveja	18,95 ±0,07	16,43 ±2,48	12,09 ±3,96	1,47 ±0,29	2,34 ±3,68

De los resultados anteriores se seleccionó a la cepa salvaje de *Lactobacillus casei* aislada de las ubres de una oveja como la máxima productora de ácido láctico (fundamentalmente del isómero L (+)).

Con objeto de optimizar la producción de ácido láctico por este microorganismo, se propuso un diseño de experimentos considerando las principales variables que, teniendo en cuenta bibliografía, afectaban a la producción de este ácido: Concentración inicial de glucosa (g/L), Temperatura (°C), Extracto de levadura como fuente de nitrógeno (g/L) y pH inicial del medio de cultivo. La siguiente tabla recoge el set de 16 experimentos que se llevó a cabo con objeto de definir las condiciones óptimas del sustrato de fermentación y del proceso para maximizar la producción de ácido láctico con el microorganismo seleccionado.

Run	Rand	Glucose	Temperature	Yeast extract	pH
		g/L	°C	g/L	
1	6	150	42	30	4
2	14	150	42	30	4
3	13	50	42	30	6
4	8	50	42	30	6
5	12	50	33	30	6
6	4	50	33	30	6
7	11	150	33	10	6
8	7	150	33	10	6
9	5	50	42	10	4
10	3	50	42	10	4
11	16	150	33	30	4
12	10	150	33	30	4
13	1	150	42	10	6
14	15	150	42	10	6
15	2	50	33	10	4
16	9	50	33	10	4

Los resultados del diseño experimental, señalaron a las condiciones de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de extracto de levadura, pH 6 y temperatura de fermentación de 33°C como las óptimas para maximizar la producción de ácido láctico (2,23; 18,52 y 18,73 g/L para el ácido láctico L, D y total respectivamente).

Se seleccionan estas condiciones como las más adecuadas de las estudiadas para producir ácido láctico. Sin embargo, la bibliografía indica que la producción de ácido láctico por vía biotecnológica debe llevarse a cabo en condiciones de pH constante con objeto de evitar la inhibición del crecimiento microbiano debido a la bajada de pH por debajo del valor pKa de éste ácido. Por lo tanto y con el fin de conocer el potencial de esta especie láctica en la producción de ácido láctico se realizaron las pruebas en biorreactor (1,5 L) a pH constante alcanzándose concentraciones de ≈50 g/L tras 48 horas de incubación.

En la actualidad CNTA está utilizando la cepa seleccionada para obtener ácido láctico a partir de distintos subproductos agroalimentarios abriendo una nueva línea de negocio al sector. Los primeros resultados son prometedores alcanzando concentraciones similares a las obtenidas en los caldos sintéticos

PALABRAS CLAVE: ácido láctico, bacterias lácticas, ácido poliláctico

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Perfil metabólico de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* bajo diferentes condiciones de cultivo

Rocío Fernández¹, Lorena Díez¹, Miriam González¹, Myriam Zarazaga², Carmen Torres², Carmen Tenorio¹, Oscar P. Kuipers³ y Fernanda Ruiz-Larrea¹

¹Universidad de La Rioja ICVV (CSIC-UR-GR). ²Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja. C/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño, La Rioja. ³Molecular Genetics, Centrum voor Levenswetenschappen, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute (GBB), Rijksuniversiteit, Groningen (RUG), the Netherlands.

RESUMEN

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* MG1363 es el prototipo internacional para estudios de genética y fisiológicos en BAL; es una cepa libre de plásmidos obtenida de un iniciador de fermentados lácteos y se halla distribuida por laboratorios y colecciones de todo el mundo. Respecto al metabolismo aminoacídico, para esta cepa la arginina no es un aminoácido esencial (1), pero constituye una rica fuente de nitrógeno. Los aminoácidos utilizados por *L. lactis* se puede agrupar en: I) grupo de la glutamina, degradados a ornitina vía deiminasa (Arg, Glu, Gln y Pro); II) los que pueden ser degradados directamente vía piruvato (Ala, Cys, Gly, Ser) o vía oxalacetato (Asp, Asn y Thr); y III) resto de aminoácidos con rutas no totalmente caracterizadas (Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr, Lys, His y Met) (2). La utilización de los aminoácidos en rutas no biosintéticas y su degradación excretando al medio de cultivo los productos finales del catabolismo vendrán determinadas por las condiciones de cultivo y la velocidad de crecimiento de la bacteria. El objetivo de este trabajo fue determinar y evaluar los cambios en la producción de los metabolitos extracelulares generados en las rutas de los aminoácidos por la especie *L. lactis* subsp. *cremoris* en respuesta a la situación de estrés de presencia de etanol en el medio de cultivo. Mediante cromatografía h.p.l.c. de fase reversa, previa derivatización con el reactivo dietil-etoxi-metilen-malonato (3), se analizaron los aminoácidos, aminos biógenas y ion amonio generados por la cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 bajo distintas condiciones de cultivo. Se empleó el medio de cultivo químicamente definido (CDM) mínimo y necesario para el crecimiento óptimo de la cepa (con todos los aminoácidos proteínogénicos menos Cys y Tyr). Se empleó una temperatura de incubación de 30° C y las condiciones para el crecimiento bacteriano de ausencia y presencia de arginina (2,5 mg/L), y ausencia y presencia de etanol (2% vol/vol) en el medio de cultivo.

Los resultados mostraron que la cepa MG1363 creció hasta fase estacionaria consumiendo los aminoácidos del medio, siendo los más significativos: el OH-Trp, cuya concentración disminuyó al 55,6% de la inicial, la arginina, que disminuyó al 63,7%, y la glicina al 65,7%. La cepa a su vez generó 34,21 ± 2.23 mg/L de ornitina y amonio, cuya concentración aumentó 1,3 veces respecto a la inicial en el medio de cultivo. En ausencia de arginina la cepa utilizó mayoritariamente Gln (cuya concentración disminuyó al 15,7 % de la concentración inicial) y en menor proporción Asp, Ser y Gly.

En presencia de 2% de etanol en el medio, la arginina fue el aminoácido más utilizado y su concentración disminuyó al 50,4% de la inicial, mientras que las concentraciones de OH-Trp, Gly y Ser disminuyeron al 68,4%, 67,4% y 69,1% respectivamente. Simultáneamente, en presencia de 2% etanol la cepa generó 56,99 ± 2.23 mg/L de ornitina y amonio, cuya concentración aumentó 1,5 veces respecto a la inicial en el medio de cultivo. Estos resultados indicaron que la degradación de la arginina generando ornitina y el ion amonio es una vía utilizada por *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 como defensa contra la condición de estrés que supone la presencia de etanol en el medio de cultivo.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido llevado a cabo con la ayuda del proyecto AGL2010-15466 del MCINN y FEDER de la EU.

1. Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J. 2007. J Bacteriol. 189(8):3256-70.
2. Adamberg K, Seiman A, Vilu R. 2012. PLoS One. 7(10):e48223. doi: 10.1371/journal.pone.0048223. Epub 2012 Oct 25.
3. Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I, García-Romero E. 2007. J Agric Food Chem. 55(3):608-13.

PALABRAS CLAVE: *Lactococcus lactis*, aminoácidos, arginina, ornitina, catabolismo aminoacídico

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Identificación y caracterización de esterasas de *Lactobacillus plantarum* con interés en tecnología de alimentos

María Esteban-Torres ^a, Gloria Fernández-Lorente ^b, Iván Acebrón ^c, Yanaisis Álvarez ^c, Inés Reverón ^a, Laura Santamaría ^a, Natalia Jiménez ^a, Félix López de Felipe ^a, José Miguel Mancheño ^c, Blanca de las Rivas ^a, Rosario Muñoz ^a

^a Grupo de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid. ^b Microbiología y Biocatálisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC), Madrid. ^c Grupo de Cristalografía y Biología Estructural, Instituto Rocasolano (IQFR-CSIC), Madrid

RESUMEN

Los ésteres son compuestos aromáticos que a pesar de encontrarse en niveles traza, son muy importantes en el perfil aromático de los alimentos. Pequeñas variaciones en los niveles de estos compuestos pueden tener importantes efectos en el aroma, y por lo tanto en la calidad, de los alimentos. Los ésteres de los alimentos se originan por acción de enzimas con actividad esterasa (EC 3.1.1.x) que pueden catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis en función de las condiciones de reacción, por lo que tienen un gran interés en biotecnología. Entre estas enzimas se pueden distinguir carboxilesterasas, arilesterasas y lipasas. Las carboxilesterasas y las arilesterasas catalizan la hidrólisis de ésteres de cadena alifática corta o media solubles en agua, mientras que las lipasas presentan actividad frente a ésteres de cadena larga e insolubles en agua. Las feruloil esterasas, son un tipo de arilesterasas capaces de hidrolizar el enlace éster entre los ácidos cinámicos y los azúcares de las paredes celulares vegetales liberando compuestos fenólicos como el ácido cafeico, *p*-cumárico y ferúlico, los cuales presentan numerosas aplicaciones en la industria alimentaria.

Lactobacillus plantarum es la especie de bacteria láctica modelo en fermentaciones de sustratos vegetales, en donde los ésteres de compuestos fenólicos, se encuentran en altas concentraciones. En el genoma de *L. plantarum* aparecen anotados genes que codifican “esterasas” o “lipasas” cuya funcionalidad no se ha comprobado bioquímicamente a pesar del interés biotecnológico que presentan. Por ello el objetivo de este trabajo es la identificación y caracterización de posibles esterasas en *L. plantarum* WCFS1. A pesar de que se han clonado los genes que codifican 14 posibles esterasas o lipasas, sólo se han podido producir y purificar correctamente las proteínas Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_2923, Lp_2987, Lp_3561 y Lp_3562. Utilizando ésteres derivados de *p*-nitrofenilo que varían en la longitud de su cadena alifática (desde acetato de *p*-nitrofenilo hasta palmitato de *p*-nitrofenilo) se ha comprobado que todas las proteínas estudiadas hidrolizan mejor los ésteres de cadena corta, aunque Lp_1002, Lp_2926 y Lp_3562 también hidrolizan eficazmente palmitato de *p*-nitrofenilo. La proteína Lp_2987 es la única que no presenta actividad sobre ninguno de los derivados ensayados por lo que no se puede considerar como “esterasa”. La especificidad de sustrato de las esterasas también se ha evaluado mediante una colección de ésteres que permite conocer su selectividad respecto a la carga del sustrato, al tamaño de la cadena o al alcohol presente. Todas las proteínas purificadas, excepto Lp_2987, presentan actividad sobre acetato de fenilo, por lo que se pueden considerar como “aril esterasas”. La proteína Lp_0973 es la única que, además de acetato de fenilo, degrada triacetina y tributirina. De las esterasas estudiadas, la proteína Lp_0796 es la más interesante puesto que es una “feruloil esterasa” que hidroliza ésteres de ácidos hidroxicinámicos, siendo la primera vez que se describe una proteína con esta actividad en *L. plantarum*. Con objeto de mejorar la actividad de las esterasas para su posible uso industrial se han realizado experimentos de cristalización, inmovilización y evolución dirigida de alguna de ellas.

Los resultados obtenidos indican que *L. plantarum* es una fuente adecuada de enzimas con actividad esterasa de gran influencia en el aroma de los alimentos.

PALABRAS CLAVE: *L. plantarum*, ésteres, esterasa, feruloil esterasa, compuestos fenólicos, aroma

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Estrategias de eliminación de fitatos mediante el empleo de fitasas en alimentos fermentados

Izaskun García-Mantrana^{1,2}, M^a Jesús Yebra¹, Monika Haros² y Vicente Monedero^{1*}

¹Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos; ²Grupo de Cereales, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, *e-mail: btcmon@iata.csic.es

RESUMEN

La inclusión de productos de origen vegetal en la dieta, como productos de grano entero de cereales, leguminosas y frutos secos, nos aporta un gran beneficio nutricional. Sin embargo, a su vez también incluyen un alto contenido en sustancias antinutritivas como son el ácido fítico (hexakisfosfato de *mio*-inositol o $InsP_6$) y sus sales (fitatos), con gran afinidad por minerales y proteínas presentes de los alimentos, comprometiendo su biodisponibilidad.

Algunas cepas de *Bifidobacterium*, como *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 o *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919, muestran actividad fitasa con capacidad de reducir significativamente los fitatos de productos fermentados con ellas. A su vez, una desfosforilación parcial de los fitatos no sólo disminuye el efecto negativo en la biodisponibilidad mineral, sino que también genera productos intermedios de menor grado de fosforilación, algunos de los cuales con propiedades funcionales. Sin embargo, el empleo de bifidobacterias durante procesos fermentativos no hidrolizó eficientemente los fitatos hasta valores umbrales de no inhibición. Por lo tanto, se planteó la sobreexpresión de estas fitasas en *Escherichia coli* con el fin de purificar las enzimas e incluirlas en procesos de cereales, o bien, expresarlas en cepas del género *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* BL23, *Lactobacillus plantarum* 299v y *L. plantarum* WCFS1) para ser incluidas en procesos fermentativos de cereales y/o leguminosas. La adición de las fitasas purificadas en productos de panadería o en la elaboración de cereales infantiles redujo el contenido de fitatos inicial eficientemente. Por otro lado, la adición de *Lactobacillus* recombinantes productores de fitasas produjo una hidrólisis eficaz de fitatos sólo en medio líquido (MRS y leche de soja fermentada) con la consiguiente acumulación de trifosfatos de *mio*-inositol ($InsP_3$).

PALABRAS CLAVE: ácido fítico, fitatos, fosfatos de *mio*-inositol, fitasas de *Bifidobacterium*, productos de panadería, cereales infantiles, leche fermentada de soja

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Análisis transcripcional de la expresión de la dextransacarasa DsrLS de *Lactobacillus sakei* MN1 y aplicación del dextrano sintetizado como potencial antivírico en acuicultura

Montserrat Nácher-Vázquez¹, Maria de la Luz Mohedano¹, Natalia Andrea Ballesteros¹, Nuria Peña-Vidal¹, Sylvia Rodríguez¹, Sara Isabel Pérez¹, Rosa Aznar^{2,3} y Paloma López¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), 28040 Madrid. ²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), 46980 Paterna (Valencia) ³Universitat de València (UVEG), 46100 Burjassot (Valencia)

RESUMEN

Algunas bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weisella* poseen glucansacararas (GSs), enzimas capaces de sintetizar α -glucanos a partir de sacarosa. La síntesis de estas enzimas es constitutiva en especies de *Streptococcus*, mientras que en *Leuconostoc* se induce por sacarosa. En el caso de los *Lactobacillus* sólo se conoce que la cepa *Lactobacillus reuteri* 121 sintetiza una reuteransacarasa de forma constitutiva.

Las dextransacararas son un tipo de GSs, secretadas al medio o unidas a la superficie de la célula, que sintetizan a partir de sacarosa, dextrano (un α -glucano con enlaces $\alpha(1-6)$ en su cadena principal y con diferentes ramificaciones $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-2)$ ó $\alpha(1-4)$). Estos dextranos se utilizan en diversas aplicaciones industriales y médicas.

Los objetivos del siguiente estudio han sido: (I) Secuenciar el gen *dsrLS* de *Lactobacillus sakei* MN1, que codifica la dextransacarasa (DsrLS), así como su entorno genético; (II) analizar la expresión del gen *dsrLS* y de su entorno genético y (III) desarrollar una nueva aplicación del dextrano producido por *Lactobacillus sakei* MN1 como antivírico e inmunoestimulante en acuicultura.

(I) Estudios previos mediante la técnica de Southern pusieron de manifiesto la localización del gen *dsrLS* de *L. sakei* en uno de sus plásmidos, por lo que para este estudio se realizó una extracción de DNA plasmídico total y se procedió a la secuenciación completa del gen y de su entorno genético. El análisis de dichas secuencias frente a aquellas depositadas en los bancos de datos del National Center for Biotechnology (NCBI, USA) con el programa BLAST, pusieron de manifiesto que el gen *dsrLS* (5.304 nt) presentaba una elevada homología con el gen *gfl1624* de *L. curvatus* TMW 1.624 y el gen *gflkg15* de *L. sakei* Kg15. Además, con la secuenciación del entorno genético se determinó que corriente arriba del gen *dsrLS* se encontraban los genes *RepA*, *RepB*, *hsdR*. Los productos de los dos primeros genes poseen homología con proteínas implicadas en la replicación del plásmido y el tercero con la región N-terminal de la subunidad HsdR de las enzimas de restricción de tipo I.

(II) Para estudiar la expresión de los genes detectados se realizaron extracciones de RNA total a partir de cultivos de *L. sakei* MN1 crecido en medio definido con 0,8 % de glucosa y sacarosa. Los transcritos fueron detectados mediante la técnica RT-PCR y posterior electroforesis en geles de agarosa. Los resultados revelaron que existe una co-transcripción de los genes *RepA*, *RepB* y *hsdR*, así como de *hsdR* y *dsrLS*. La expresión de *dsrLS* también ha sido estudiada mediante la fusión de sus promotores al gen reportero *mrfp* y la determinación de los niveles de fluorescencia emitidos por la proteína mcherry.

(III) Para evaluar la capacidad antiviral *in vitro* del dextrano producido por *L. sakei* MN1 se utilizaron dos virus: el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI, ATCC VR1318) y virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI, ATCC VR714). Se utilizaron diferentes concentraciones de los dextranos purificados a partir de *L. sakei* MN1 y de otras dos bacterias lácticas, así como del dextrano comercial T2000 (Pharmacia fine chemicals AB Upsala, Suecia). La actividad antiviral se determinó por la capacidad de los dextranos para inhibir los efectos citopáticos de los virus y proteger la monocapa celular de las líneas celulares ensayadas BF-2 (ATCC CRL 1681) y EPC (ATCC CRL-2872), así como por el porcentaje de células supervivientes (% inhibición). Todos los dextranos ensayados mostraron una actividad antiviral similar frente al VNPI, requiriéndose una concentración entre 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 3.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtener un 50% de inhibición. Sin embargo, frente al VNHI el dextrano producido por *L. sakei* MN1 mostró una actividad antiviral mucho más eficiente obteniéndose una inhibición del 50% con una concentración de tan sólo 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En el caso del dextrano T2000 se requirió una concentración 10 veces superior (5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para obtener el mismo efecto. El análisis de la masa molecular del dextrano de *L. sakei* mediante RMN (2D-DOSY) reveló que es muy superior a la del dextrano T2000.

PALABRAS CLAVE: dextrano, expresión génica, antivírico, dextransacarasa, acuicultura, inmunoestimulante.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Respuesta transcriptómica de *Oenococcus oeni* a las condiciones estresantes del vino

Meritxell Bordas*, Isabel Araque, Nicolas Rozès, Cristina Reguant, Albert Bordons

*Equipo BL-URV, Grupo de Biotecnología Enológica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades edifici N4, 43005 Tarragona. *meritxell.bordas@urv.cat*

RESUMEN

La supervivencia de *Oenococcus oeni* y la realización de la fermentación maloláctica (FML) en el vino a menudo presenta dificultades, debido a las condiciones estresantes del mismo para esta bacteria láctica. El etanol, los pocos nutrientes, el pH bajo, los compuestos fenólicos y otros, hacen que las cepas autóctonas y / o las comerciales añadidas como estárteres muchas veces no logran completar la FML. Además, la concentración de etanol en vinos de muchas regiones está aumentando estos últimos años, debido al cambio climático global.

La variabilidad entre cepas de *O. oeni* en cuanto a esta tolerancia al “medio vino” es evidente. Ya se han secuenciado 14 cepas, con lo cual se ha obtenido mucha información, debido a las variaciones inter-cepa. Pero a pesar del éxito utilizando estrategias genotipo-fenotipo, además del estudio genómico, es preciso estudiar la regulación diferencial de características fenotípicas entre cepas cercanas genéticamente.

Por ello estamos estudiando los mecanismos moleculares del estrés y de la adaptación de varias cepas de *O. oeni*. Se han comparado cepas altamente tolerantes (3P2 y 2T2), aisladas de vinos del Priorat con 14% etanol o más, con otras menos tolerantes, como la cepa tipo CECT217. Habíamos cuantificado la expresión de varios genes relacionados con el estrés y la FML mediante PCR cuantitativa, tanto en vino simulado (con 12 y 14% etanol) como en vino real, viendo diferencias a lo largo de la FML entre las cepas más tolerantes y otras, y sobre todo en el gen *citE* de la ruta del citrato.

Con estas mismas cepas se ha realizado un estudio transcriptómico de los 1800 genes de *O. oeni* en su respuesta a las condiciones del medio. Hemos visto que 1 h después de la inoculación en todas las cepas hay una sobreexpresión de genes de chaperonas. Por otro lado, hay inhibición de genes relacionados con el transporte de carbohidratos, y también de los involucrados en procesos de oxidación-reducción. Al inicio de la FML en todas las cepas se sobreexpresan genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, mientras que siguen estando inhibidos genes de transporte de carbohidratos y de procesos redox. En cuanto a la expresión diferencial, hay un grupo de genes de permeasas que se sobreexpresan en las cepas más tolerantes y no lo hacen en la menos tolerante, y lo mismo sucede con los genes de la proteasa ClpP y de Hsp18. Algunos genes de proteínas de membranas también se sobreexpresan solamente en las cepas tolerantes.

Con el estudio transcriptómico se consigue una mayor comprensión de la adaptación metabólica, para poder identificar los procesos biológicos más involucrados en la tolerancia de *O. oeni* a las condiciones estresantes del vino, como el alto contenido en etanol, lo que posibilitará el diseño de métodos de preadaptación. Además, la variabilidad encontrada entre cepas permite utilizar el conocimiento de estos mecanismos como herramienta de selección de estárteres de la FML.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por los proyectos Deméter-Cenit (CDTI), y AGL09-07369 del Plan Nacional I + D (Ministerio de Ciencia e Innovación).

PALABRAS CLAVE: vino, *Oenococcus oeni*, maloláctica, adaptación, transcriptómica

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

La ausencia de *ftsH* impide la liberación de viriones TP712 en *Lactococcus lactis*.

Clara Rocés¹, Ana B. Campelo¹, Ana Rodríguez¹, Pilar García¹, Udo Wegmann², Marie-Pierre Chapot-Chartier³ y Beatriz Martínez¹

¹Grupo DairySafe. Departamento de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos. IPLA-CSIC. Paseo Río Linares, s/n. 33300, Villaviciosa (Asturias); ²INRA, Unité de Biochimie Bactérienne, UR477, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France. ³ Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, UK.

RESUMEN

FtsH es una proteasa-chaperona de membrana conservada que regula la calidad de las proteínas y se activa en condiciones de estrés. De hecho, forma parte del regulón de CesSR, un sistema de dos componentes que regula la respuesta al estrés sobre la envoltura celular en *Lactococcus lactis*. Además, FtsH posee funciones reguladoras en algunos microorganismos, como la decisión lisis-lisogenia del fago lambda en *Escherichia coli*.

Considerando el impacto negativo de la infección por bacteriófagos de cepas iniciadoras en la industria láctea, se analizó el posible papel de FtsH en la regulación del ciclo de infección del bacteriófago TP712 en *L. lactis*, componente mayoritario de los cultivos iniciadores mesófilos utilizados en quesería. La ausencia de placas de lisis tras la infección de un mutante *L. lactis* Δ *ftsH* con el bacteriófago TP712, y la ausencia de lisis tras la inducción del profago con mitomicina C demostraron que TP712 no era capaz de propagarse en ausencia de *ftsH*. Sin embargo, esta mutación no impedía la propagación de otros bacteriófagos como c2 o sk1.

La obtención de colonias *L. lactis* Δ *ftsH* resistentes a espectinomicina tras la infección con un fago marcado con el gen de resistencia a este antibiótico descartó la implicación de FtsH en la adsorción fago-bacteria y en la integración del ADN fágico en la célula hospedadora. Asimismo, se descartó su papel en la escisión y replicación del ADN fágico y en el ensamblaje de las partículas virales tras la inducción del profago. La ruptura con lisozima de las células demostró que las partículas fágicas son infectivas pero incapaces de lisar la célula hospedadora Δ *ftsH* para liberar la progenie viral, apuntando a un papel regulador de *ftsH* sobre la lisis celular.

La mayor resistencia del mutante *L. lactis* Δ *ftsH* a los antimicrobianos de pared lisozima y bacteriocina Lcn972, y el mayor grado de O-acetilación de su peptidoglicano, sugerían que la ausencia de *ftsH* provocaba la formación de un peptidoglicano modificado no degradable por la endolisina del fago TP712. La ausencia de degradación de paredes celulares de Δ *ftsH* por extractos celulares de *L. lactis* conteniendo endolisina activa demostraron esta hipótesis.

En este trabajo hemos identificado un mecanismo de resistencia de *L. lactis* al bacteriófago TP712 basado en la modificación de la composición del peptidoglicano de la célula hospedadora, dependiente de *ftsH*, que impide su degradación por la endolisina del fago TP712. Esta característica, junto con la menor susceptibilidad a compuestos antimicrobianos que pueden comprometer la funcionalidad de los *starters*, son propiedades atractivas desde un punto de vista tecnológico.

PALABRAS CLAVE: FtsH, *Lactococcus*, bacteriófagos, peptidoglicano, endolisina, *starter*

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Regulación del metabolismo de galotaninos en *Lactobacillus plantarum*

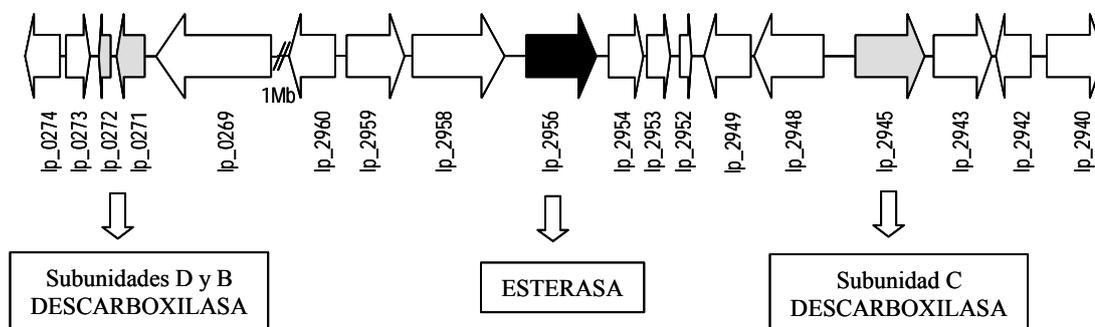
Natalia Jiménez, Inés Reverón, José Antonio Curiel, María Esteban-Torres, Félix López de Felipe, Blanca de las Rivas, Rosario Muñoz

Grupo de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid.

RESUMEN

Los taninos son compuestos fenólicos presentes en alimentos y bebidas de origen vegetal que poseen efectos antagonicos para la salud. Se ha descrito que los taninos tienen actividad quimiopreventiva contra la carcinogénesis y mutagénesis, aunque también se han considerado como antinutrientes y se han asociado con cáncer y hepatotoxicidad. *Lactobacillus plantarum* es una especie de bacteria láctica que se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos, desde hábitats relacionados con alimentos vegetales, al tracto gastrointestinal humano. *L. plantarum* es la especie utilizada con mayor frecuencia como cultivo iniciador en la fermentación de alimentos de origen vegetal. Aunque los taninos son compuestos tóxicos y bacteriostáticos, *L. plantarum* ha conseguido desarrollar rutas metabólicas para degradar estos compuestos fenólicos, lo que le confiere una mejora adaptativa. *L. plantarum* degrada taninos, como el ácido tánico, mediante la acción secuencial de dos enzimas que están codificadas por genes situados muy próximos en el genoma. Inicialmente, la esterasa de ácido gálico (Lp_2956 o tanasa) hidroliza el ácido tánico produciendo ácido gálico, el cual posteriormente se descarboxila por acción de la galato descarboxilasa, recientemente descrita como una enzima multimérica (Lp_0271, Lp_0272 y Lp_2945), originando pirogalol. La secuenciación de varias cepas de la especie *L. plantarum* ha revelado diferencias significativas entre sus genomas, como por ejemplo, la existencia en algunas cepas de un nuevo gen que codifica una proteína anotada también como “probable tanasa”.

En este estudio se describe la organización genética y transcripcional, así como la regulación de los genes implicados en el metabolismo de galotaninos en *L. plantarum* WCFS1.



Se ha elucidado la organización transcripcional de esta región cromosómica mediante transcripción reversa, identificándose los operones presentes. Con objeto de conocer las proteínas realmente implicadas en el metabolismo de galotaninos, en once de las ORFs se han construido mutantes *knockout* por inserción-duplicación de un plásmido no replicativo mediante recombinación homóloga. Este estudio ha revelado que sólo la interrupción de la esterasa (Lp_2956) o de las subunidades B (Lp_0271) y C (Lp_2945) de la galato descarboxilasa inhiben completamente dichas actividades en los correspondientes mutantes. Por otro lado, la interrupción de un posible transportador (Lp_2943) origina que la cepa mutante sólo descarboxile parcialmente ácido gálico. En este estudio también se ha analizado, mediante RT-qPCR, la variación en la expresión de estos genes en presencia de ácido gálico o uno de sus ésteres (galato de metilo) tanto en la cepa *wild type* como en los distintos mutantes *knockout* construidos. Este estudio ha permitido obtener una visión global, que incluye desde las proteínas implicadas hasta los mecanismos de su regulación, de la primera ruta completa de degradación de un compuesto fenólico en una bacteria láctica.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus plantarum*, galotaninos, tanasa, galato descarboxilasa.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Regulación genética de la biosíntesis de putrescina en *Lactococcus lactis*

Víctor Ladero, Beatriz del Río, Daniel M. Linares, M^a Cruz Martín, María Fernández and Miguel A. Álvarez.

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n. 33300. Villaviciosa, Asturias, España.

RESUMEN

La putrescina es una de las aminas biógenas que se encuentra más frecuentemente y en mayores concentraciones en alimentos y bebidas fermentados. Su acumulación en los alimentos se debe a la actividad microbiana y su posterior ingestión en cantidades elevadas conlleva una serie de efectos tóxicos directos (taquicardia e hipotensión) e indirectos (potencia los efectos tóxicos de otras aminas biógenas como la histamina y la tiramina). Además, tanto la putrescina como las poliaminas derivadas de ella (espermina y espermidina) están relacionadas con el desarrollo de determinados tumores. La putrescina puede ser sintetizada por dos rutas metabólicas diferentes: la ruta de la ornitina descarboxilasa (ODC) o la ruta de la agmatina deiminasa (AGDI). La acumulación de putrescina en productos lácteos se debe a la acción de determinadas BAL (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactococcus lactis*) que la sintetizan por la ruta AGDI. Dada la importancia de *L. lactis* como cultivo iniciador en la Industria Láctea, estamos estudiando en profundidad la ruta de biosíntesis de putrescina en esta especie. Hemos secuenciado los genes que componen el cluster AGDI, el cual está formado por 4 genes catalíticos que forman un operón (*aguBDAC*) regulado transcripcionalmente por la concentración de agmatina (el sustrato de la reacción) y por el pH del medio, además de estar sometido a represión catabólica, y por un gen que se transcribe independientemente de forma constitutiva (*aguR*). *AguR* es una proteína de membrana que actúa como activador de los genes catalíticos y que funcionaría como un sistema de transducción de señal de un solo componente, con un dominio transmembrana que actuaría como sensor de la concentración de agmatina en el medio y un dominio citoplasmático que sería un activador de la transcripción de los genes catalíticos. Paralelamente hemos secuenciado el cluster AGDI en diversas cepas aisladas de productos lácteos e iniciadores industriales y los hemos comparado con genomas disponibles en la base de datos permitiéndonos postular una teoría sobre su origen.

PALABRAS CLAVE: Aminas biógenas, putrescina, *L. lactis*, regulación transcripcional.

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Identificación y caracterización del operon *lnb* implicado en el metabolismo de lacto-N-biosa y galacto-N-biosa en *Lactobacillus casei*

Gonzalo N. Bidart, Jesús Rodríguez-Díaz, Vicente Monedero y María Jesús Yebra

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna

RESUMEN

Lactobacillus casei BL23 tiene reconocidas propiedades probióticas y su capacidad de prevalecer en el sistema gastrointestinal depende en parte de su habilidad de utilizar los carbohidratos disponibles. En este sentido hemos demostrado que esta cepa es capaz de crecer utilizando lacto-N-biosa (LNB; Galactosa- β (1-3)-N-acetilglucosamina) o galacto-N-biosa (GNB; Galactosa- β (1-3)-N-acetilgalactosamina) como fuentes de carbono. La LNB forma parte de la estructura de los oligosacáridos de la leche humana, de los glicoconjugados del epitelio intestinal y de los antígenos Lewis. La GNB es una estructura importante en muchos glicoconjugados como el antígeno T, y se encuentra también en las glicoproteínas de la mucina presente en la leche y en el tracto gastrointestinal humanos. Una búsqueda en la secuencia del genoma de *L. casei* BL23 de genes que codificasen putativas β -galactosidasas nos reveló que esta cepa contiene un gen (LCABL_02910) anotado como una β -galactosidasa de la familia 35 de glicosil hidrolasas (denominado *lnbG*). Por encima de este gen están presentes tres genes que codifican para un hipotético regulador transcripcional (LCABL_02880, *lnbR*), una tagatosa-6P ketosa/aldosa isomerasa (LCABL_02890, *lnbE*) y una N-acetilglucosamina-6P deacetilasa (LCABL_02900, *lnbF*). Por debajo del gen *lnbG* se encuentran cuatro genes (*lnbBCDA*) que codifican para proteínas con homología a los componentes EIIB, EIIC, EIID y EIIA de un sistema de transporte de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). Una cepa mutante de *L. casei* construida por disrupción del gen que codifica para el dominio IIC del PTS perdió su capacidad de utilizar la LNB o la GNB como únicas fuentes de carbono. El análisis del contenido en azúcares de los sobrenadantes de los cultivos demostró que ambos disacáridos no eran hidrolizados ni consumidos en el mutante, sugiriendo que el PTS codificado por *lnbBCDA* está implicado en el transporte de LNB y GNB y no de sus monosacáridos derivados. Análisis transcripcionales demostraron que el operon *lnb* está inducido por LNB y GNB por medio del represor transcripcional *lnbR*. Posibles rutas para el metabolismo de ambos disacáridos en *L. casei* serán propuestas.

PALABRAS CLAVE: Lacto-N-biosa, galacto-N-biosa, *Lactobacillus*

RESUMENES DE LAS PRESENTACIONES

Análisis de la carga eléctrica superficial de *Lactobacillus casei* mediante medidas de potencial ζ : aplicación al estudio de la interacción de péptidos antimicrobianos

Ainhoa Revilla-Guarinos¹, Orlando L. Sánchez-Muñoz², Jesús Salgado² y Manuel Zúñiga¹

¹ Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Dpto. Biotecnología de Alimentos, IATA-CSIC. ² Grupo de Biomembranas, Instituto de Ciencia Molecular (ICMOL), Universitat de València

RESUMEN

El potencial ζ de partículas coloidales, como por ejemplo bacterias en suspensión, se define como el potencial eléctrico relativo al medio de dispersión en el límite de la denominada capa de Stern que rodea a la partícula. Dado que potencial ζ depende de la carga eléctrica de las partículas, para una suspensión de bacterias dicho parámetro permite estimar la magnitud de la carga expuesta en la superficie celular. En general, dicha carga superficial puede variar dependiendo de condiciones de la disolución y/o interacciones con moléculas iónicas, como por ejemplo la unión a péptidos antimicrobianos catiónicos. En el presente estudio se describe un análisis de las propiedades de carga eléctrica superficial de *Lactobacillus casei* utilizando medidas electrocinéticas de potencial ζ , así como de los efectos sobre dicha carga de propiedades de la disolución y de la interacción con el péptido antimicrobiano nisina. Nuestro objetivo último es estudiar la relación entre la carga superficial bacteriana y la susceptibilidad a condiciones ambientales y a péptidos antibióticos.

Como organismos modelo se utilizaron dos cepas de *Lactobacillus casei*: BL23 y una variante de ésta deficiente en el sistema de dos componentes TCS12 (Δ RR12), caracterizada por su mayor sensibilidad a pH ácido y a péptidos antimicrobianos. Ensayos previos de adhesión de citocromo *c* sugieren que la cepa mutante Δ RR12 presenta mayor carga negativa que la cepa silvestre, lo que parece debido al control ejercido por TCS12 sobre Dlt (D-alaninización de los ácidos teicoicos) y MprF (lisinización de fosfolípidos de la membrana celular), implicados en la regulación de la carga de la superficie celular.

En este trabajo hemos puesto a punto ensayos de determinación y análisis del potencial ζ de suspensiones de bacterias tipo bacilo (partículas coloidales cilíndricas) a partir de la movilidad electroforética medida mediante un analizador de partículas ZetaSizer NanoZS Zen3600 (Malvern Instruments Ltd., UK). Ello ha permitido una caracterización de la carga electrocinética de las dos cepas estudiadas, así como su dependencia con el pH y la fuerza iónica. Así mismo, hemos puesto a punto también ensayos de interacción de nisina con *L. casei* BL23 y Δ RR12.

Los resultados obtenidos mostraron una fuerte disminución del potencial ζ con la fuerza iónica en las dos cepas estudiadas. Se observó también un aumento del potencial ζ en medio ácido, aunque mostrando una dependencia diferente para cada una de las dos cepas. El cálculo de la carga electrocinética a partir de estos datos permitió determinar que la cepa Δ RR12 mantiene una mayor densidad de carga en la superficie que la cepa silvestre.

Por otro lado, la presencia de nisina resulta en una disminución del potencial ζ , a partir del cual, utilizando la teoría de Gouy-Chapmann, determinamos los parámetros físicos que caracterizan la interacción bacteria-péptido (valencia aproximada del péptido, constante de asociación y variación de la energía libre de Gibbs).

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus casei*, potencial ζ , sistema de dos componentes, nisina

LISTA DE PARTICIPANTES

Álvarez González	Miguel Ángel	maag@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Álvarez Sieiro	Patricia	pas@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Arqués Orobón	Juan Luis	arques@inia.es	INIA
Ávila Arribas	Marta	arribas@inia.es	INIA
Aymerich Calvet	Teresa	teresa.aymerich@irta.cat	IRTA
Aznar Novella	Rosa	rosa.aznar@uv.es	IATA-CSIC
Barroso Merinero	Elvira	elvira.barroso@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Bidart	Gonzalo	bidart@iata.csic.es	IATA-CSIC
Bordas Sánchez	Meritxell	merybordas@hotmail.com	U. Rovira i Virgili
Bordons de Porrata-Doria	Albert	albert.bordons@urv.cat	U. Rovira i Virgili
Callejón Salinas	Sara	sara.callejon@uv.es	U. Valencia
Cárdenas Cárdenas	Nivia	niviacu@yahoo.com	U. Complutense
Cebrián Castillo	Rubén	rcebrian@ugr.es	U. Granada
Collado Amores	M ^a Carmen	mcolam@iata.csic.es	IATA-CSIC
Cruz Pio	Liz Erika	liz.cruz@uv.es	U. Valencia
de las Rivas González del Rey	Blanca	blanca.r@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
del Campo Moreno	Rosa M ^a	rosacampo@yahoo.com	H. Ramón y Cajal
Díaz García	María	maria_dga@hotmail.com	IPLA-CSIC
Dueñas Chasco	M ^a Teresa	mariateresa.duenas@ehu.es	U. Pais Vasco
Escobedo Martín	Susana	smariconda@yahoo.com	U. Oviedo
Esteban Torres	M ^a del Mar	mariaet@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Fernández Álvarez	Leónides	leonides@vet.ucm.es	U. Complutense
Fernández de Palencia Delgado	Pilar	ppalencia@cib.csic.es	CIB-CSIC
Fernández Pérez	Rocío	m-del- rocio.fernandezp@unirioja.es	U. La Rioja
Flórez García	Ana Belén	abflores@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Gálvez del Postigo Ruiz	Antonio	agalvez@ujaen.es	U. Jaén
García Cayuela	Tomás	tomas.garcia@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
García Mantrana	Izaskun	izasval@hotmail.com	IATA-CSIC

García Ruiz	Almudena	almudena.garcia@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Garde López-Brea	Sonia	sgarde@inia.es	INIA
Gómez Torres	Natalia	natalia.gomez@inia.es	INIA
González de los Reyes Gavilán	Clara	greyes_gavilan@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
González del Llano	Dolores	d.g.dellano@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Guadamuro García	Lucía	luciagg@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Haros	Mónica	mharos@iata.csic.es	IATA-CSIC
Iturria Gallego	Iñaki	iiturria@azti.es	AZTI
Jiménez Díaz	Rufino	rjimenez@cica.es	IG-CSIC
Jiménez Martín	Natalia	nataliajm@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Jiménez Quintana	Esther	esjimene@vet.ucm.es	U. Complutense
Ladero Losada	Víctor	ladero@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Landete Irazo	José M ^a	landete.josem@inia.es	INIA
Langa Marcano	Susana	langa.susana@inia.es	INIA
Llamas Arriba	María Goretti	gorettillamas@gmail.com	U. País Vasco
López García (*)	Paloma	plg@cib.csic.es	CIB-CSIC
Lucena Padrós	Helena	hlucpad@hotmail.es	IG-CSIC
Maqueda Abreu	Mercedes	mmaqueda@ugr.es	U. Granada
Marcos Sánchez	Ascensión	amarcos@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Martín Cueto	Carla	lotti86@hotmail.com	U. Oviedo
Martín Cabrejas	Izaskun	martin.izaskun@inia.es	INIA
Martínez Cañamero	Magdalena	canamero@ujaen.es	U. Jaén
Martínez Cuesta	M. Carmen	carmen.martinez@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Martínez Fernández	Beatriz	bmf1@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Medina Fernández-Regatillo	Margarita	mmedina@inia.es	INIA
Mohedano Bonilla	M. Luz	mmoheda@cib.csic.es	CIB-CSIC
Monedero García	Vicente	btcm@iata.csic.es	IATA-CSIC
Montiel Moreno	Raquel	rakelm@inia.es	INIA
Moreno-Arribas	M. Victoria	victoria.moreno@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Mujico Fernandez	Jorge Raúl	jorge.mujico@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC

Muñoz Moreno	Rosario	rmunoz@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Nácher Vázquez	Montserrat	montsens@cib.csic.es	CIB-CSIC
Neef	Alexander	aneef@iata.csic.es	IATA-CSIC
Nova Rebato	Esther	enova@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Olivares	Marta	m.olivares@iata.csic.es	IATA-CSIC
Pardo Cubillos	Isabel	isabel.pardo@uv.es	U. Valencia
Peirotén Moreno	Ángela	angela.peiroten@inia.es	INIA
Peláez Martínez	Carmen	carmen.pelaez@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Peña Vidal	Nuria	yrun3@hotmail.com	CIB-CSIC
Pérez Martínez	Gaspar	gaspar.perez@iata.csic.es	IATA-CSIC
Pérez Ramos	Adrián	apramos@estumail.ucm.es	CIB-CSIC
Picón Gálvez	Antonia M ^a	apicon@inia.es	INIA
Prieto Orzano	Alicia	aliprieto@cib.csic.es	CIB-CSIC
Puertas González	Ana Isabel	ana.isabel.puertas@gmail.com	U. Pais Vasco
Redondo Useras	Noemí	noemi_redondo@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Reguant Miranda	Cristina	cristina.reguant@urv.cat	U. Rovira i Virgili
Requena Rolanía	Teresa	t.requena@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Reverón Poján	Inés María	imreveren@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Revilla Guarinos	Ainhoa	btcarg@iata.csic.es	IATA-CSIC
Roces Rodríguez	Clara	clara_roces@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rodríguez Gómez	Juan Miguel	jmrodrig@vet.ucm.es	U. Complutense
Rodríguez González	Ana	anarguez@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rodríguez Mínguez	Eva	minguez@inia.es	INIA
Romero Hernández	Beatriz	bea_romeroh@hotmail.com	H. Ramón y Cajal
Ruas-Madiedo	Patricia	ruas-madiedo@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rubio Moreno	Raquel	raquel.rubio@irta.cat	IRTA
Ruiz Barba	José Luis	jlruiz@cica.es	IG-CSIC
Santamaría Rubio	Laura	laura.santamaria@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Seseña Prieto	Susana	susana.sprieto@uclm.es	U. Castilla-La Mancha
Suárez Fernández	Juan Evaristo	evaristo@uniovi.es	U. Oviedo

Tenorio Rodríguez	Carmen	carmen.tenorio@unirioja.es	U. La Rioja
Torres Manrique	Carmen	carmen.torres@unirioja.es	U. La Rioja
Valdés Varela	Lorena	lvaldes@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Virto	Raquel	rvirto@cnta.es	CNTA
Yebra Yebra	María Jesús	yebra@iata.csic.es	IATA-CSIC
Zúñiga Cabrera	Manuel	btzman@iata.csic.es	IATA-CSIC

LISTA DE PARTICIPANTES

Haros	Mónika	mharos@iata.csic.es	IATA-CSIC
Iturria Gallego	Iñaki	iiturria@azti.es	AZTI
Jiménez Díaz	Rufino	rjimenez@cica.es	IG-CSIC
Jiménez Martín	Natalia	nataliajm@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Jiménez Quintana	Esther	esjimene@vet.ucm.es	U. Complutense
Ladero Losada	Víctor	ladero@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Landete Iranzo	José M ^a	landete.josem@inia.es	INIA
Langa Marcano	Susana	langa.susana@inia.es	INIA
Llamas Arriba	María Goretti	goretillamas@gmail.com	U. Pais Vasco
López García (*)	Paloma	plg@cib.csic.es	CIB-CSIC
Lucena Padrós	Helena	hlucpad@hotmail.es	IG-CSIC
Maqueda Abreu	Mercedes	mmaqueda@ugr.es	U. Granada
Marcos Sánchez	Ascensión	amarcos@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Martín Cueto	Carla	lotti86@hotmail.com	U. Oviedo
Martín Cabrejas	Izaskun	martin.izaskun@inia.es	INIA
Martínez Cañamero	Magdalena	canamero@ujaen.es	U. Jaén
Martínez Cuesta	M. Carmen	carmen.martinez@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Martínez Fernández	Beatriz	bmf1@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Medina Fernández-Regatillo	Margarita	mmedina@inia.es	INIA
Mohedano Bonilla	M. Luz	mmoheda@cib.csic.es	CIB-CSIC
Monedero García	Vicente	btcmn@iata.csic.es	IATA-CSIC
Montiel Moreno	Raquel	rakelm@inia.es	INIA
Moreno-Arribas	M. Victoria	victoria.moreno@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Mujico Fernandez	Jorge Raúl	jorge.mujico@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Muñoz Moreno	Rosario	rmunoz@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Nácher Vázquez	Montserrat	montsenv@cib.csic.es	CIB-CSIC
Neef	Alexander	aneef@iata.csic.es	IATA-CSIC
Nova Rebato	Esther	enova@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Olivares	Marta	m.olivares@iata.csic.es	IATA-CSIC
Pardo Cubillos	Isabel	isabel.pardo@uv.es	U. Valencia
Peirotén Moreno	Ángela	angela.peiroten@inia.es	INIA
Peláez Martínez	Carmen	carmen.pelaez@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Peña Vidal	Nuria	yrun3@hotmail.com	CIB-CSIC
Pérez Martínez	Gaspar	gaspar.perez@iata.csic.es	IATA-CSIC

LISTA DE PARTICIPANTES

Pérez Ramos	Adrián	apramos@estumail.ucm.es	CIB-CSIC
Picón Gálvez	Antonia M ^a	apicon@inia.es	INIA
Prieto Orzano	Alicia	aliprieto@cib.csic.es	CIB-CSIC
Puertas González	Ana Isabel	ana.isabel.puertas@gmail.com	U. Pais Vasco
Redondo Useras	Noemí	noemi_redondo@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Reguant Miranda	Cristina	cristina.reguant@urv.cat	U. Rovira i Virgili
Requena Rolanía	Teresa	t.requena@csic.es	CIAL-CSIC-UAM
Reverón Poján	Inés María	imreveron@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Revilla Guarinos	Ainhoa	bt carg@iata.csic.es	IATA-CSIC
Roces Rodríguez	Clara	clara_roces@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rodríguez Gómez	Juan Miguel	jmrodrig@vet.ucm.es	U. Complutense
Rodríguez González	Ana	anarguez@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rodríguez Mínguez	Eva	minguez@inia.es	INIA
Romero Hernández	Beatriz	bea_romeroh@hotmail.com	H. Ramón y Cajal
Ruas-Madiedo	Patricia	ruas-madiedo@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Rubio Moreno	Raquel	raquel.rubio@irta.cat	IRTA
Ruiz Barba	José Luis	jlruiz@cica.es	IG-CSIC
Santamaría Rubio	Laura	laura.santamaria@ictan.csic.es	ICTAN-CSIC
Seseña Prieto	Susana	susana.sprieto@uclm.es	U. Castilla-La Mancha
Suárez Fernández	Juan Evaristo	evaristo@uniovi.es	U. Oviedo
Tenorio Rodríguez	Carmen	carmen.tenorio@unirioja.es	U. La Rioja
Torres Manrique	Carmen	carmen.torres@unirioja.es	U. La Rioja
Valdés Varela	Lorena	lvaldes@ipla.csic.es	IPLA-CSIC
Virto	Raquel	rvirto@cnta.es	CNTA
Yebra Yebra	María Jesús	yebra@iata.csic.es	IATA-CSIC
Zúñiga Cabrera	Manuel	btzman@iata.csic.es	IATA-CSIC