

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**Alimentos probióticos: expresión génica de
Bifidobacterium animalis subps. *lactis* en leche fermentada**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

DAVID FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

JULIO, 2014





Master Universitario en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.uniovi.es/MBTA>



PROFESORES TUTORES:

Dra. Dña. PATRICIA RUAS MADIEDO, Científico Titular, y Dra. Dña. NOELIA MARTÍNEZ ÁLVAREZ, Doctora Contratada, del Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC),

CERTIFICAN:

Que D. **DAVID FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción 2013-214.

Villaviciosa, 11 de Julio de 2014

Fdo. Tutores:

Patricia Ruas Madiedo

Noelia Martínez Álvarez

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

Después de haber recibido tanto, me veo en la necesidad de expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado y facilitado su apoyo, consejo y ánimo a lo largo de este proyecto, sin las cuales no hubiera sido posible lograr este objetivo.

Agradezco a la Dra. Patricia Rúas Madiedo y la Dra. Noelia Martínez Álvarez, las cuales han supervisado y dirigido este trabajo, quienes siempre han estado a mi lado haciendo de esta tarea algo realmente formativa, interesante y, por supuesto, enriquecedor. Me han permitido iniciarme en la investigación científica, resolviendo mis dudas, facilitando el acceso a datos, bibliografías, etc. y dedicando muchísimo de su tiempo libre en mi favor.

Al personal del IPLA, por el trato que he recibido, y en especial al grupo de Probióticos, donde he realizado este trabajo, por hacerme sentir como uno más desde el primer día, un honor y un placer trabajar a su lado.

A David y Nuria en particular, por sus consejos y su apoyo pero sobre todo por los momentos de cafetería entre risas, consiguiendo que las horas de trabajo hayan sido muchísimo más llevaderas.

A mis compañeros de viajes y lloros Marta, Lei y Guillermo por compartir su tiempo, humor, entusiasmo y conocimientos... han hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

Gracias también a mis queridos compañeros de MBtA, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante este año y de convivir dentro y fuera del aula clase.

Y por último pero quizá el más importante a mi familia y amigos que me acompañaron durante todos estos años y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos los que hice mención ya que con su aporte hicieron posible esta presentación.

Gracias a todos.

Índice

Resumen/ Abstract

Listas de Figuras

Lista de Tablas

1. Introducción	7
1.1. Leches fermentadas.....	7
1.1.1. Definición y aspectos históricos	7
1.2. Aspectos nutricionales.....	8
1.3. Objetivos del trabajo	12
2. Consideraciones teóricas.....	13
2.1. Tecnología de elaboración de leches fermentadas.....	13
2.1.1. Papel de los cultivos iniciadores.....	13
2.1.2. Ejemplo de tecnología de elaboración: yogur y tipos de yogur	14
2.2. Alimentos funcionales: Probióticos	16
2.2.1. Historia y definición.....	17
2.2.2. Efectos beneficiosos de los probióticos	19
2.2.3. Guía de evaluación de probióticos en alimentos	20
2.2.4. <i>Bifidobacterium spp.</i> como probiótico	22
2.2.4.1. Propiedades funcionales	22
2.2.4.2. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.....	23
2.3. Exopolisacáridos (EPS) de BAL y Bifidobacterias	25
2.3.1. Homopolisacáridos (HoPS)	25
2.3.2. Heteropolisacáridos (HePS).....	26
2.3.2.1 Consideraciones generales.....	26
2.3.2.2. Síntesis de HePS y clusters <i>eps</i>	26
2.3.3. Aplicaciones de los EPS.....	27
2.4. Técnicas para el estudio de la expresión génica	28

2.4.1. PCR cuantitativa a tiempo real	28
2.4.1.1. Tipos de fluoróforos	30
2.4.1.2. Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR	31
2.4.1.3. Requisitos de las muestras para cuantificación génica	31
2.4.1.4. Otras Aplicaciones	32
3. Material y Métodos	33
3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	33
3.2. Elaboración de leches fermentadas	33
3.2.1. Preparación y tratamiento térmico de la leche.....	33
3.2.2. Fermentación y curvas de acidificación de la leche	34
3.2.3. Recuentos microbianos	34
3.3. Optimización de la extracción de ARN	35
3.4. Cuantificación y calidad del ARN extraído.....	36
3.5. Obtención de ADNc (transcripción inversa)	37
3.6. Técnica de PCR cuantitativa	37
3.6.1. Cebadores empleados	37
3.6.2. Condiciones de PCR	38
3.6.3. Análisis de datos.....	38
3.7. Análisis estadístico.....	38
4. Resultados y Discusión	39
4.1. Fermentación de la leche por <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A1 y A1dOxR	39
4.2. Optimización del método de extracción de ARN	40
4.2.1. Propuesta de Protocolo.....	44
4.3. Expresión de genes <i>eps</i> de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche fermentada.....	46
5. Conclusiones.....	50
6. Bibliografía.....	51

Símbolos y Abreviaturas	55
APÉNDICE.....	56
Datos de expresión relativa de la cepa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A1 para el gen <i>cpsD</i> utilizando como gen de referencia <i>recA</i>	56
Datos de expresión relativa de la cepa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A1dOxR para el gen <i>cpsD</i> utilizando como gen de referencia <i>recA</i>	57
Datos de expresión relativa de la cepa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A1 para el gen <i>rfbP</i> utilizando como gen de referencia <i>recA</i>	58
Datos de expresión relativa de la cepa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A1dOxR para el gen <i>rfbP</i> utilizando como gen de referencia <i>recA</i>	59

Resumen

El término probiótico define *aquellos microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador*. Los probióticos se incluyen en alimentos, especialmente en productos lácteos fermentados, siendo el yogur el vehículo más utilizado y disponible el mercado. Para consumo humano las bacterias probióticas más habituales pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y en éste último la especie más habitual es *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. En el presente trabajo se emplearon dos cepas (A1 y A1dOxR), pertenecientes a la colección del IPLA-CSIC, de *B. animalis* subsp. *lactis* capaces de producir exopolisacáridos con las que se optimizó un protocolo de extracción de ARN a partir de leches fermentadas. Tras la obtención del ARN, se analizó la expresión mediante qPCR de genes relacionados con la síntesis de EPS en las dos cepas crecidas en leche suplementada con distintos sustratos nitrogenados. Se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes *rfbP* y *cpsD* entre las dos cepas, para cada tipo de sustrato, y únicamente en el caso de la cepa A1dOxR entre los tres sustratos. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia para la industria alimentaria del estudio del comportamiento de cepas con potencial probiótico en la matriz del alimento que será utilizado como vehículo de administración oral. La optimización de un protocolo para la extracción de ARN de leche fermentada permitirá, en un futuro, abordar el estudio de la expresión génica de cepas de bifidobacterias en el ambiente lácteo.

Abstract

Probiotics are *microorganisms that when ingested in appropriate amounts produce benefit on the host health*. Probiotics are included in foods especially in fermented dairy products, being the yogurt the vehicle most used and available in the market. For human consumption probiotic bacteria belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*; the species *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is the most common one of this genus. In this work two strains (A1 and A1dOxR) of this species, belonging to the IPLA-CSIC culture collection which are able to produce exopolysaccharides (EPS), were used for the optimization of RNA extraction from fermented milks. After RNA extraction from the two strains grown in milk supplemented with different nitrogen substrates, the expression of genes related to the synthesis of EPS was analyzed by qPCR. Significant differences were observed in the expression of genes *cpsD* and *rfbP* between the two strains, for each type of substrate, and only in the case of strain A1dOxR among the three substrates. These results underline the importance for the food industry of studying the behavior of strains with probiotic potential in the food matrix that will be used as vehicle for oral administration. The optimization of a protocol to extract RNA from fermented milks will allow in the future the study of gene expression in bifidobacteria growing in dairy products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tecnología básica de fabricación de yogur (reproducido de Ruas-Madiedo y cols., 2014).
- Figura 2.** Aplicaciones tradicionales y novedosas de cepas probióticas basadas en el nivel de evidencia científica (recopilado de Mayo y cols, 2008).
- Figura 3.** Guía para la evaluación de probióticos en alimentos (recopilado de FAO-WHO, 2006).
- Figura 4.** Morfología género *Bifidobacterium* en distintos tipos de microscopio.
- Figura 5.** Mapa físico del “cluster” *eps* de la cepa tipo *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (recopilado de Hidalgo-Cantabrana y cols, 2014).
- Figura 6.** Grafica de amplificación de PCR a tiempo real.
- Figura 7.** Grafica de amplificación por PCR a tiempo real en escala logarítmica, muestras con diluciones seriadas de la cantidad inicial de ADNc (reproducido de <http://www.gene-quantification.info/>).
- Figura 8.** Condiciones (medios de cultivo) ensayadas en el presente estudio.
- Figura 9.** Curvas de pH obtenidas tras la fermentación de leche suplementada con distintos sustratos nitrogenados por las cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR (cepa ropy).
- Figura 10.** Recuentos del número de viables (Log UFC/mL), de las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR crecidas en leche con diferentes sustratos nitrogenados.
- Figura 11.** Gel de 1% de agarosa con lejía (al 2%) para la comprobación de la integridad del ARN extraído (después del segundo tratamiento con *DNaseI*).
- Figura 12.** Gel de 1% de agarosa con lejía (2%) para comprobar la integridad del ARN extraído de leche fermentada con la cepa A1dOxR.
- Figura 13.** Protocolo optimizado propuesto para la extracción de ARN en leches fermentadas con bifidobacterias.
- Figura 14.** Geles de 1% agarosa con lejía (2%) para la comprobación de la integridad de los ARN extraídos de muestras correspondientes a la Fermentación 1.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de productos lácteos en base a la norma CODEX STAN 243-2003.

Tabla 2. Composición de la leche de vaca y sus variantes fermentadas. Datos obtenidos del Sistema de Información para la Sanidad Ambiental e Higiene Alimentaria de la Comunidad de Madrid.

Tabla 3. Composición de vitaminas en la leche de vaca y sus variantes fermentadas. Datos obtenidos del Sistema de Información para la Sanidad Ambiental e Higiene Alimentaria de la Comunidad de Madrid.

Tabla 4. Cebadores empleados en este trabajo para el estudio de la expresión génica relativa.

Tabla 5. Concentraciones y ratios ARN extraído.

Tabla 6. Comparación de las Cts obtenidas para las cepas A1 y A1dOXR en función del método de extracción del ARN empleado.

Tabla 7. Concentraciones y ratios cepa A1dOxR.

Tabla 8. Concentraciones y ratios ARN extraído, utilizados en experimentos de expresión génica, correspondiente a ambas fermentaciones.

Tabla 9. Análisis de la varianza (ANOVA) de la expresión relativa ($\Delta\Delta ct$) de los genes de las “priming-glycosyltransferases” CpsD y RfbP en dos cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* crecidas durante 18 h en leche pasteurizada. Los datos se relativizaron a la expresión constitutiva del gen de referencia recA y se refirieron a los niveles de expresión obtenidos al tiempo 0 de inicio de fermentación (suspensiones bacterianas en leche procedentes de un cultivo de 18 h en MRSC). Para cada cepa se compararon los resultados obtenidos en leches suplementadas con tres fuentes de nitrógeno distintas.

Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) de la expresión relativa ($\Delta\Delta ct$) de los genes de las “priming-glycosyltransferases” CpsD y RfbP en dos cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* crecidas durante 18 h en leche pasteurizada. Los datos se relativizaron a la expresión constitutiva del gen de referencia recA y se refirieron a los niveles de expresión obtenidos al tiempo 0 de inicio de fermentación (suspensiones bacterianas en leche procedentes de un cultivo de 18 h en MRSC). Para cada tipo de leche, suplementada con fuentes de nitrógeno distintas, se compararon los resultados obtenidos en cada cepa.

1. Introducción

La demanda creciente de productos lácteos fermentados adicionados con bacterias probióticas, que suponen un valor añadido de su papel nutricional, es una realidad actual y una apuesta de futuro para la innovación empresarial y la investigación en el campo de la alimentación. Las bifidobacterias forman parte de la microbiota intestinal y el estudio de sus posibles propiedades beneficiosas para la salud ha sido el foco de atención en los últimos años. De todas ellas, la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* presenta mejor potencialidad tecnológico para su incorporación en productos lácteos fermentados debido a una cierta tolerancia al oxígeno y a valores bajos de pH, en relación a otras especies de bifidobacterias. La capacidad de *B. animalis* subsp. *lactis* para ejercer una actividad metabólica beneficiosa, como integrante de la microbiota intestinal transeúnte, depende en gran medida de la dosis ingerida. De ahí la gran importancia del mantenimiento de unos niveles altos de viabilidad en los productos fermentados adicionados con estos microorganismos. Por ello es importante estudiar el comportamiento de esta especie en el ambiente lácteo como paso previo para intentar mejorar su viabilidad en el alimento final. En este sentido, las técnicas de expresión génica son una herramienta útil para llevar a cabo este tipo de estudios.

1.1. Leches fermentadas

1.1.1. Definición y aspectos históricos

Las leches fermentadas se definen como aquellos productos obtenidos mediante la fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche, con o sin modificaciones en su composición según las limitaciones de composición que se muestran en la Tabla 1, por medio de la acción de microorganismos seguros y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica de la caseína). Según la Norma CODEX STAN 243-2003 del “Codex Alimentarius” (<http://www.codexalimentarius.org>) para leches fermentadas (Norma Codex Alimentarius, 2011) estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente después de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. Al igual que otros productos lácteos, como por ejemplo los quesos, las leches fermentadas han acompañado al ser humano desde hace miles de años en sus diferentes variantes y su consumo ha ido creciendo debido a su gran aceptación y prestigio de alimento altamente nutritivo. Las leches fermentadas son tan antiguas como el pan o el vino, otros ejemplos de alimentos fermentados que se han incorporado a la cultura gastronómica de las muchas civilizaciones occidentales.

La acidificación mediante fermentación microbiana espontánea es la manera de conservación de la leche más primitiva y elemental. En general, las bacterias del ácido láctico (BAL) son responsables de esta

bajada de pH por su capacidad para utilizar la lactosa y generar ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Las leches fermentadas elaboradas actualmente mediante procesos tecnológicos controlados, como es el caso del yogur, son productos de corta duración comercial. Recientemente se ha aprobado la nueva norma de calidad para la elaboración y comercialización del yogur recogida en el Real Decreto 271/2014 (Real decreto BOE, 2014). En ella se establece que el etiquetado de fechas del yogur se rige por la Normativa Horizontal Europea sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y la relativa a la higiene de los alimentos. Dicho Real Decreto ha derogado la especificidad del etiquetado de la fecha de caducidad del yogur, así como el límite de venta de 28 días desde su fecha de fabricación, recogidos en el Real Decreto 179/2003 (Real Decreto BOE, 2003). El decreto actual indica que los operadores de empresas alimentarias deberán determinar el tipo de fecha apropiada a cada producto, así como su límite temporal. Este nuevo marco legal posibilita que los productores de yogur puedan establecer una fecha de caducidad para sus productos diferente a la establecida hasta ahora o, alternativamente, proponer una fecha de consumo preferente (Ruas-Madiedo y cols, 2014).

Tabla 1. Composición química y microbiológica de productos lácteos (recopilado de la Norma CODEX STAN 243-2003, Codex Alimentarius, 2011).

	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidófila	Kefir	Koumis
Proteína láctea (% p/p) ^(a)	mín. 2,7%	mín. 2,7%	mín. 2,7%	
Grasa láctea (% p/p)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	menos del 10%
Acidez valorable (expresada como % de ácido láctico, % p/p)	mín. 0,3%	mín. 0,6%	mín. 0,6%	mín. 0,7%
Etanol (% v/p)				mín. 0,5%
Suma de microorganismos totales del cultivo (ufc/g)	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷
Microorganismos etiquetados (ufc/g) ^(b)	mín. 10 ⁶	mín. 10 ⁶		
Levaduras (ufc/g)			mín. 10 ⁴	mín. 10 ⁴

^(a) El contenido en proteínas es de 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado.

^(b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que ha sido agregado como complemento del cultivo específico.

1.2. Aspectos nutricionales

La leche es un alimento básico cuya función principal es la de satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido. Es una mezcla equilibrada de proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales, vitaminas y otros componentes menores solubilizados o emulsionados en el agua, presentando

por tanto una amplia gama de nutrientes dentro de los cuales solo el hierro aparece como deficitario. Los siguientes apartados, referidos al valor nutricional de la leche fermentada, han sido elaborados siguiendo la evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española propuesta por la “Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética” (FESNAD, 2013).

El **valor nutritivo** de los productos lácteos depende principalmente de la leche de partida que se utilice en su elaboración, aunque también se verá influido por los efectos de la tecnología de procesado y almacenamiento. En el caso concreto del yogur, y las leches fermentadas en general, la actividad de los microorganismos responsables de la fermentación también repercute sobre el valor nutricional y biológico de los diferentes nutrientes en el producto final. El valor energético y la composición en macronutrientes se mantienen similares a los de la leche de partida, así como el contenido mineral que tampoco sufren grandes cambios. Pero desde el punto de vista nutricional, las leches fermentadas son un alimento con mejor digestibilidad, mayor disponibilidad de nutrientes más fácilmente asimilables, así como una alta concentración de enzimas. Además, en general, se incrementa ligeramente las vitaminas del grupo B gracias a su síntesis por algunas bacterias. Todo esto convierte a las leches fermentadas en un alimento de alto valor nutritivo, mayor que el de la leche cruda (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la leche de vaca y sus variantes fermentadas. (Documentos Técnicos de Salud Pública nº 106. www.publicaciones-isp.org).

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL EN AGUA, ENERGÍA Y MACRONUTRIENTES DE LA LECHE DE VACA LÍQUIDA Y DEDIFERENTES TIPOS DE LECHE FERMENTADAS						
	Agua (g)	Energía (Kcal)	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Lípidos (g)	
Leche entera	88,4	65,9	3,1	4,7	3,8	
Leche desnatada	91	37,6	3,9	4,9	0,2	
Yogur natural entero	87,9	64,4	4	5,5	2,6	
Yogur natural desnatado	89,1	47,8	4,3	6,3	0,32	
Yogur de sabores entero	75,6	114	5,4	15,6	3,4	
Yogur entero con frutas	78,7	95	3,8	14,3	2,3	
Yogur griego	78	139	6,4	5,4	10,2	
Leche fermentada + bifidobacterias entera	88,6	62,6	3,6	4,4	3,4	
Leche fermentada + bifidobacterias desnatada	89,3	44,3	4,9	5,5	0,3	
Leche fermentada + <i>L. casei</i>	79,6	98,1	3	14,1	3,3	
Leche fermentada + <i>L. acidophilus</i>	79,5	98,5	3,1	14,1	3,3	

El **contenido proteico** de las leches fermentadas es similar al de la leche de partida, pero en algunos casos este podría ser ligeramente superior debido a la suplementación de la leche con leche en polvo. La diferencia entre ambos alimentos radica en la mejor digestibilidad de las proteínas en las leches fermentadas debido a las enzimas proteolíticas de los microorganismos fermentadores que hidrolizan parcialmente las proteínas. Por esto, el valor nutricional aumenta respecto a la leche líquida ya que la acción proteolítica de las bacterias durante la fermentación, junto con la acidez y la coagulación de la caseína, mejoran la digestión y asimilación de este macronutriente. Por ello el valor biológico de la fracción nitrogenada del yogur, y en general de las leches fermentadas, es mayor que el de la leche de partida.

El **contenido lipídico** de las leches fermentadas dependerá principalmente del contenido graso de la leche de partida, es decir, de si la leche empleada es entera, semidesnatada o desnatada. Las BAL que llevan a cabo las fermentaciones lácteas se caracterizan por tener una escasa actividad lipolítica. Sin embargo otros microorganismos, como hongos o levaduras, presentes en algunas leches fermentadas más complejas que el yogur también podrían actuar sobre el componente graso de la leche generando derivados (ácidos grasos libres) más fácilmente digeribles y asimilables que la grasa.

Las leches fermentadas, al igual que la leche líquida de la que proceden, son ricas en diversos **minerales** como magnesio, zinc, fósforo y principalmente calcio (Tabla 3). Aunque las cantidades de estos micronutrientes no varían significativamente respecto a la leche líquida, la fermentación de la leche incrementa su disponibilidad. La principal proteína láctea (caseína) se encuentra formada parte de micelas (o agregados) que están estabilizadas por puentes de fosfato cálcico. Debido a la disminución del pH por la producción de ácido láctico durante la fermentación, el calcio y el fosfato pasan a su forma soluble produciéndose la precipitación de las caseínas cuando el pH es aproximadamente 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína). Este hecho hace que la leche “coagule”, transformándose en un producto semi-sólido como es el caso del yogur, y favorece que el calcio y el fosfato liberados sean más fácilmente asimilables.

La leche entera es una fuente muy importante de **vitaminas** liposolubles, principalmente de vitamina A y en menor medida de vitamina D y E. También contiene vitaminas hidrosolubles, principalmente del grupo B y vitamina C (Tabla 3). El valor vitamínico de las leches fermentadas es difícil de establecer debido a que sobre él influyen diversos factores. Mientras algunas bacterias de los cultivos iniciadores favorecen la síntesis de vitaminas del grupo B, cuyo contenido aumenta en la leche fermentada respecto a la leche de partida, otros cultivos van a utilizar estas y otras vitaminas de la leche para su propio crecimiento. Además el tratamiento tecnológico aplicado a la leche de partida (por ejemplo tratamiento térmico de pasterización) suele destruir parte de las vitaminas que son termolábiles, lo que determina en gran medida el contenido vitamínico final de las leches fermentadas. Hay que tener en cuenta también que la presencia en las leches fermentadas de vitaminas liposolubles se encuentran asociadas a la fracción grasa

de la leche de la leche, por lo que su contenido depende en gran medida del tipo de leche de partida (Tabla 3). A este respecto, se puede suplementar la leche con vitamina A y D con el objeto de restituir las pérdidas que se producen en el desnatado, dado que la vitamina D juega un papel relevante en la absorción del calcio.

Tabla 3. Composición de vitaminas en la leche de vaca y sus variantes fermentadas. (Documentos Técnicos de Salud Pública nº 106. www.publicaciones-isp.org).

COMPOSICIÓN EN VITAMINAS Y MINERALES DE LA LECHE DE VACA Y DIFERENTES TIPOS DE LECHE FERMENTADAS													
	B1	B2	B3	B6	B9	B12	C	A	D	E	Ca	P	Zn
Leche entera	0,04	0,19	0,73	0,04	5,5	0,3	1,4	46	0,3	0,1	124	92	0,38
Leche desnatada	0,04	0,17	0,90	0,04	5,3	0,3	1,7	Tr ^(a)	Tr	Tr	121	97	0,54
Yogur natural entero	0,04	0,18	0,44	0,05	3,7	0,2	0,7	9,8	0,06	0,04	142	170	0,59
Yogur natural desnatado	0,04	0,19	1,2	0,08	4,7	0,4	1,6	0,8	0	Tr	140	109	0,44
Yogur de sabores entero	0,03	0,2	0,44	0,05	13,5	0,17	0,94	27,4	0,05	0,08	121	140	0,52
Yogur entero con frutas	0,03	0,2	1,4	0,013	18,1	0,18	0,7	14,5	0,04	0,03	109	130	0,3
Yogur griego	0,03	0,36	1,6	0,05	6	0,2	Tr	121	0,05	0,38	150	130	0,5
Leche fermentada + bifidobacterias entera	0,04	0,18	0,42	0,09	5	0,3	1	33,5	0,2	0,3	141	107	0,4
Leche fermentada + bifidobacterias desnatada	0,04	0,21	0,42	0,11	5	0,3	Tr	2	0	Tr	164	135	0,5
Leche fermentada + <i>L. casei</i>	0,04	0,08	0,42	0,09	2,6	0,2	Tr	2,6	0,03	Tr	110	107	0,3
Leche fermentada + <i>L. acidophilus</i>	0,04	0,08	0,42	0,09	2,6	0,2	Tr	2,6	0,03	Tr	105	107	0,7

^(a) Tr: trazas

La información nutricional recogida en esta apartado pone de manifiesto el alto valor nutricional de la leche y los productos lácteos en general, y de las leches fermentadas en particular que son además consideradas como productos saludables. Por ello, los lácteos constituyen hoy en día una de las bases de la pirámide nutricional, dentro de una dieta equilibrada y con ejercicio moderado, y el sector lácteo es además un segmento productivo de cierta de relevancia económica (Tecnifood, 2014).

1.3. Objetivos del trabajo

Como se ha recogido en el apartado anterior, las bifidobacterias pueden formar parte de los microorganismos que se encuentran en las leches fermentadas presentes actualmente en el mercado a disposición de los consumidores. Teniendo en cuenta que según la definición de probiótico estos tienen que ser ingeridos “vivos” para que ejerzan su efecto beneficioso, es de vital importancia estudiar su viabilidad y supervivencia en el alimento en el que son incorporados. Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica de la especie *B. animalis* subsp. *lactis* que es la que se encuentra más frecuente en los productos lácteos, cuando crece en leche. Para ello abordamos los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1. Optimización de la extracción de ARN en leches fermentadas

Ensayos, y propuesta final, de un método sencillo para la extracción de ARN microbiano de alta calidad a partir de distintas leches fermentadas, que pueda ser empleado para evaluar la expresión génica de *Bifidobacterium* ssp.

Objetivo 2. Expresión relativa de genes EPS durante fermentaciones lácteas

Validación del método propuesto mediante el estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis de EPS de dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* después de un proceso fermentativo empleando leche desnatada suplementada con distintos sustratos nitrogenados.

2. Consideraciones teóricas

2.1. Tecnología de elaboración de leches fermentadas

El término “leche fermentada” incluye los productos lácteos obtenidos a partir de una tecnología equivalente a la de fabricación del yogur en los que se pueden incluir microorganismos diferentes a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que son los únicos cultivos iniciadores aceptados para la elaboración del yogur, tal y como establece la Norma de Calidad para este producto 271/2014 (Real Decreto BOE, 2014). En las leches fermentadas con potencial probiótico es habitual la presencia de cepas de *B. animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus rhamnosus* algunas de las cuales pueden llevar a cabo también la fermentación de la leche.

La tecnología de las leches fermentadas es relativamente simple y las elaboraciones a pequeña escala sólo requieren un equipo muy sencillo. En las fabricaciones a gran escala es necesaria una producción uniforme y a bajo coste, lo que exige un mayor control y generalmente un equipamiento más sofisticado, aunque los principios básicos de fabricación son los mismos. Hay muchos tipos de leches fermentadas que se elaboran utilizando una tecnología parecida y, en muchos casos, las diferencias se limitan al tipo de cultivo iniciador, al contenido en sólidos totales de la leche y a los aditivos o suplementos que se añaden (Tamime y Robinson, 1991).

2.1.1. Papel de los cultivos iniciadores

2.1.1.1. Tipos de microorganismos

Los microorganismos que se utilizan con más frecuencia como cultivos iniciadores pertenecen al grupo conocido genéricamente como BAL (bacterias del ácido láctico). Como se ha indicado anteriormente, en el caso del yogur estas bacterias son *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* que establecen una simbiosis para favorecer su mutuo crecimiento en leche. En la fermentación de algunas leches fermentadas intervienen también las levaduras, como por ejemplo, en la producción de koumis y de kéfir. En estas “leches alcohólicas fermentadas” conjuntamente con las BAL actúan levaduras, como *Kluyveromyces lactis* y *Candida kéfir*, que generan cierta cantidad de etanol tras la fermentación alcohólica de la leche. El renovado y creciente interés sobre las propiedades terapéuticas de las leches fermentadas ha llevado a la inclusión de las bacterias intestinales, por ejemplo *Bifidobacterium* y diversas especies de *Lactobacillus*, como suplementos adjuntos a los cultivos iniciadores.

2.1.1.2. Propiedades tecnológicas de los cultivos iniciadores

Las propiedades de los cultivos iniciadores que tienen importancia tecnológica en las leches fermentadas son esencialmente las mismas que las del queso. Sin embargo, dado que las primeras no están sometidas a un periodo de maduración, solo intervienen los cultivos iniciadores acidificantes (“*starters*”) y están ausentes cultivos adjuntos, o microbiota natural secundaria, que son los responsables de la formación de los compuestos que proporcionan aroma y “*flavor*” durante la maduración del queso. Los componentes principales del aroma típico de yogur, y la mayoría de leches fermentadas, son el diacetilo y el acetaldehído producidos durante la fermentación de la lactosa por algunas especies y cepas BAL. La principal propiedad tecnológica de los cultivos iniciadores para elaboración de leches fermentadas es la rápida acidificación de la leche. El descenso del pH produce la inhibición del desarrollo de microorganismos no deseables (patógenos y alterantes) que pudieran haber sobrevivido a la pasteurización. Esta inhibición se lleva a cabo por acción de los ácidos orgánicos (principalmente láctico) y otros metabolitos, como el H₂O₂ y sustancias con actividad antibiótica (por ejemplo bacteriocinas), así como por competición directa por nutrientes entre los patógenos/alterantes y las BAL. Finalmente, otra de las características deseables en los cultivos iniciadores es la producción de exopolisacáridos (EPS) que actúan como espesantes naturales, mejorando las propiedades de viscosidad y textura de las leches fermentadas (Leroy y De Vuyst, 2004).

2.1.2. Ejemplo de tecnología de elaboración: yogur y tipos de yogur

El yogur se puede obtener a partir de la leche de todas las especies aunque en nuestro mercado la más común es la de vaca. La calidad de las proteínas de la leche determina su aptitud para la fabricación de yogur y por ello, es necesario que la proteólisis en la leche sea mínima. La proteólisis se reduce controlando el buen estado microbiológico y manteniendo la temperatura de almacenamiento lo suficientemente baja para limitar la actividad de las proteasas microbianas o nativas de la leche. La leche puede ser entera o desnatada; normalmente el contenido graso se estandariza para cumplir los requisitos legales o para adaptarse a las preferencias del consumidor. Los nombres de los yogures con diferentes contenidos grasos y las normas legales varían según los países. En el caso de nuestro país, como se ha indicado en apartados anteriores, la clasificación se rige por la nueva Norma de Calidad 271/2014 (Real Decreto BOE, 2014) teniendo en cuenta la composición (contenido graso y extracto seco), y puede ser natural o con sustancias añadidas, como frutas, azúcar, agentes gelificantes etc. Existen distintos tipos de yogur pero, según su método de elaboración, se pueden clasificar en “yogures firmes o compactos” (semi-sólidos) en los que la fermentación se lleva a cabo en el envase de comercialización y los “yogures batidos” (fluidos) que se fermentan en cubas y al finalizar la misma se baten y se procede al llenado de los envases (Figura 1).

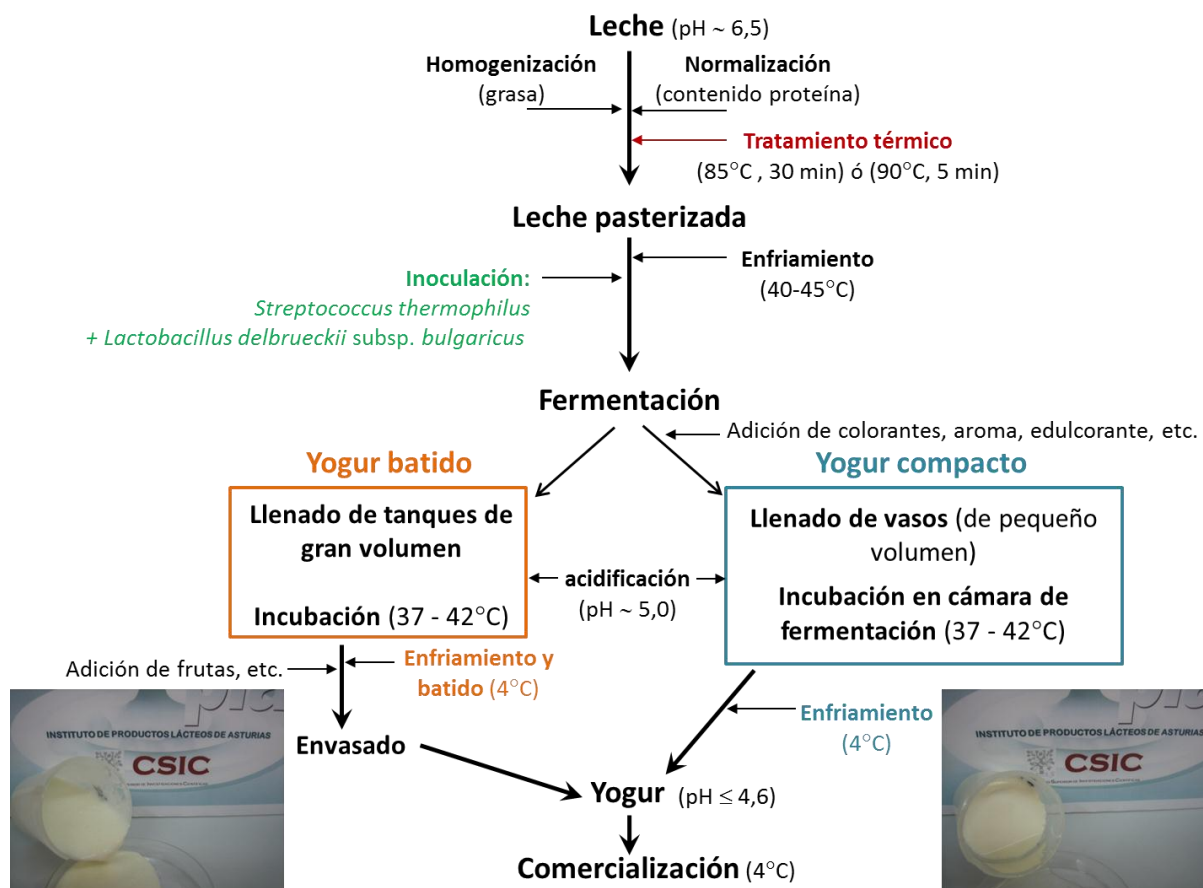


Figura 1. Tecnología básica de fabricación de yogur (reproducido de Ruas-Madiedo y cols., 2014)

Aunque muchos consumidores prefieren los “yogures naturales” sin aditivos, se suelen añadir estabilizantes a los yogures batidos para mejorar su viscosidad y consistencia y evitar la sinéresis (separación del lactosuero). Estos estabilizantes mejoran la textura del yogur y permiten la reducción de calorías al eliminar el contenido graso manteniendo la calidad organoléptica y consiguiendo productos cardio-saludables. Una alternativa al uso de estos aditivos es la utilización de cultivos iniciadores capaces de producir EPS durante la fermentación. Estos polímeros de origen bacteriano actúan como espesantes naturales y sustitutivos de la grasa, generando un producto fermentado con una textura cremosa y sensación en boca lisa, sin grumos (Ruas-Madiedo y cols. 2014).

Los edulcorantes, colorantes y aromatizantes normalmente se añaden después de la pasteurización, para evitar su degradación térmica, y la adición puede efectuarse antes o después de la fermentación. Hace algún tiempo, los yogures se edulcoraban con sacarosa pero este producto no responde a la imagen sana que se da incluso a los yogures aromatizados y edulcorados artificialmente, tan diferentes del yogur tradicional. Se ha propuesto la utilización de muchos edulcorantes alternativos como el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, la sacarina, el sorbitol y el aspartamo. Cuando se desea

una imagen “natural”, se emplean el azúcar de caña y la miel. Finalmente, las frutas, y algunas veces también los frutos secos se añaden como purés, tratados térmicamente por separado, antes de proceder al envasado.

Además de este yogur “tradicional” en el mercado aparecen otros productos que utilizan como base el yogur para su elaboración, aunque no pueden ser denominados como tal si no cumplen con los requisitos de la Norma de Calidad 271/2014 (Real Decreto BOE, 2014). Por ejemplo, el producto más líquido denominado “yogur para beber” es esencialmente un yogur batido que ha sido sometido a una homogeneización para conseguir una mayor reducción de la viscosidad y con un contenido en sólidos totales inferior al 11%, aunque hay que tener en cuenta que la Norma establece que el contenido seco magro del yogurt tiene que ser como mínimo del 8,5%. El producto a base de “yogur concentrado” puede considerarse como un producto intermedio entre las leches fermentadas tradicionales y los quesos blandos no madurados con alto contenido en humedad como el Quark. El proceso tradicional para la elaboración del yogur concentrado, el escurrido en sacos de tela, se aplica todavía a pequeña escala pero es un proceso muy laborioso y en el que es fácil que se produzca una contaminación microbiana. El procedimiento comercial más utilizado consiste en una separación centrífuga del yogur elaborado con leche desnatada para obtener una base concentrada que a continuación se recombina con aceite de mantequilla o nata hasta el contenido graso final deseado. Este procedimiento se utiliza para producir yogures espesos y cremosos de “estilo Griego”, con un contenido en sólidos totales del 24% y un contenido graso aproximado del 10%. El “yogur pasteurizado” (tratado térmicamente después de la fermentación), se elabora para obtener un producto estable a temperatura ambiente durante un periodo de almacenamiento mayor (hasta 3 meses). El yogur puede calentarse en un intercambiador de calor a 75-80°C durante 15 s o mediante un “shock” térmico en el envase a 58°C durante 5 minutos (Tamime y Robinson, 1991). Este tratamiento térmico no se lleva a cabo en algunos países para la denominación yogur, donde es obligatorio que este producto contenga microorganismos viables. En nuestra normativa el yogur pasteurizado se define como “el producto obtenido a partir del yogur que, como consecuencia de la aplicación de un tratamiento térmico posterior a la fermentación equivalente a una pasteurización, ha perdido la viabilidad de las bacterias lácticas específicas y cumple todos los requisitos establecidos para el yogur en esta norma, salvo las excepciones indicadas en ella” (BOE, 2014).

2.2. Alimentos funcionales: Probióticos

En las últimas décadas se han producido importantes avances en el campo de la nutrición debido, en parte, a su expansión hacia otras áreas científicas como la inmunología, la ecología microbiana y la genómica. Los esfuerzos coordinados en estas disciplinas han permitido profundizar en las bases que

explican la estrecha relación entre la dieta y el estado de salud de modo que, actualmente, a la dieta no sólo se atribuye un valor nutritivo sino también efectos beneficiosos para la salud derivados de sus complejas interacciones con el huésped y la microbiota intestinal. En este contexto han surgido los llamados “alimentos funcionales” considerados como aquellos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo, fomentando la salud y reduciendo el riesgo de enfermedad. Japón fue el país pionero en introducir en el etiquetado de sus productos el término de “alimento funcional”, a finales de la década de 1980, y en estos momentos sus productos representan el 50% del mercado (Stanton y cols, 2001). Este concepto ha ido popularizándose y expandiéndose hacia otros continentes como Europa, fundamentalmente debido a la preocupación por la nutrición, dieta y salud de la sociedad actual. Los probióticos representan un gran grupo dentro de los alimentos funcionales y se ha intensificado la investigación para desarrollar nuevos alimentos probióticos y estudiar su efecto sobre la salud. Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de los probióticos para consumo humano son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Streptococcus* y *Bacillus*, y levaduras como *Saccharomyces*.

2.2.1. Historia y definición

El término probiótico, derivado de *bios* palabra griega que significa vida, nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la microbiota intestinal. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles". Al mismo tiempo el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. Las obras de Metchnikoff y Tissier fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" no se acuñó hasta 1960 por Lilly y Stillwell, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Al final de la década de los 80, Fuller, con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo el término como "un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal". Años más tarde Havenaar y Huis in 't Veld propusieron una definición

muy similar: "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona" (FAO-WHO, 2006; WGO, 2011). Una de las definiciones de probióticos más utilizadas en la actualidad es la propuesta por un grupo de expertos reunidos en 2001 por la "Organización de la Agricultura y Alimentación" (FAO) y la "Organización Mundial de la Salud" (WHO) y serían "microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped" (FAO-WHO, 2006). Recientemente, en octubre de 2013, se ha revisado el concepto de probiótico en una reunión promovida por la "Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos" (ISAPP), donde se ha consensuado que la definición de la FAO-WHO es suficientemente válida para las actuales y futuras aplicaciones, y propone una descripción de productos probióticos (Hill y cols., 2014). Es evidente que estas definiciones han circunscrito la utilización del término probiótico a los productos que contienen microorganismos vivos e indican, por tanto, la necesidad de proporcionar una dosis apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados.

Teniendo en cuenta que como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, especie de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de origen intestinal y que la diana de acción inicial es la microbiota intestinal, para comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana son necesarias algunas consideraciones ecológicas acerca de esta comunidad microbiana. Las bacterias, y otros microorganismos, viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen numerosas especies bacterianas (Bäckhed y cols, 2005). Se estima que más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células de microorganismos cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g. La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los recién nacidos permanecen en un medio estéril hasta que comienza el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad. Se ha demostrado que algunos de los microorganismos residentes en nuestra microbiota son necesarios para mantener el bienestar y la salud del hospedador (Sommer y Bäckhed, 2013). Por consiguiente, cabe suponer que una estrategia de intervención dietética encaminada a modular la microbiota intestinal con objeto de aumentar el número relativo de "bacterias beneficiosas" podría contribuir al bienestar del huésped. Esta es la base de la utilización de alimentos probióticos.

2.2.2. Efectos beneficiosos de los probióticos

Los probióticos afectan a la composición de la microbiota intestinal y son capaces de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud (Mattila-Sandholm y cols, 1999). Son varios los efectos beneficiosos asignados a los probióticos, pero el grado de evidencia científica de su actividad está bien establecido únicamente en unos pocos casos, y son muchos los que aún están siendo estudiados y, dada la relación de la microbiota con ciertas enfermedades, se atisba que en un futuro estas podrían ser también dianas para la acción de probióticos (Mayo y cols, 2008).

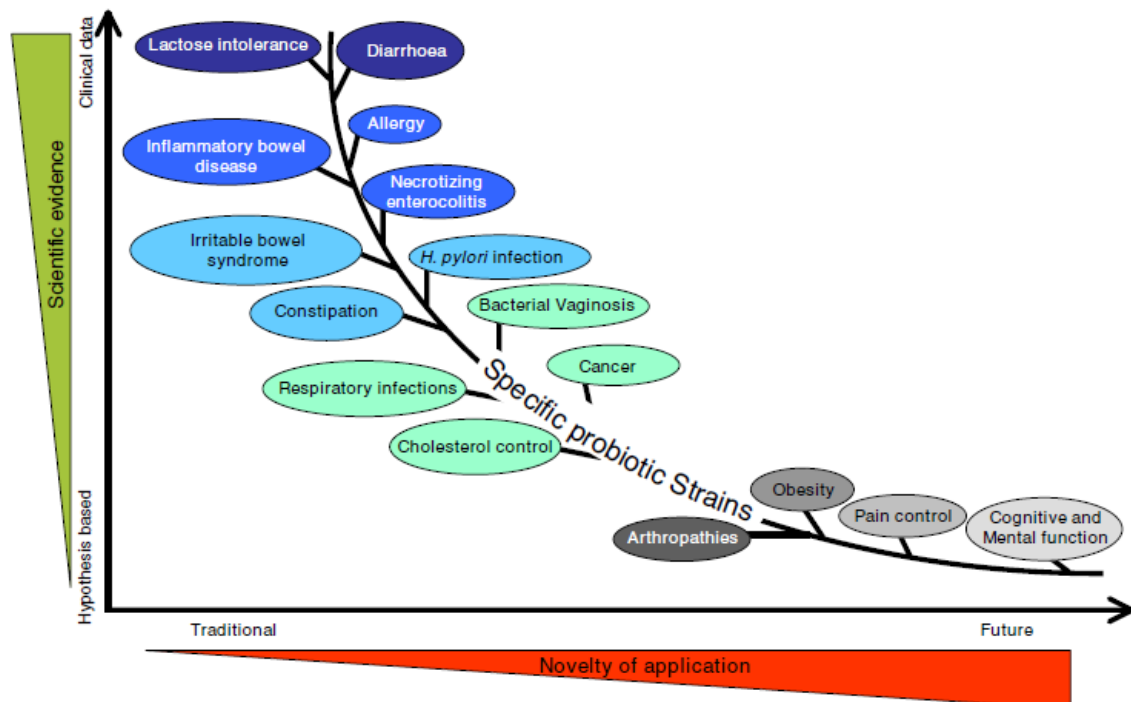


Figura 2. Aplicaciones tradicionales y novedosas de cepas probióticas basadas en el nivel de evidencia científica (recopilado de Mayo y cols, 2008)

_ Atenuación de la **intolerancia a la lactosa** y consiguiente mejora de su digestibilidad ya que las bacterias productoras de ácido láctico presentes en productos como el yogur aumentan la actividad β -galactosidasa (lactasa) en el intestino delgado.

_ Mantenimiento y restauración de la microbiota intestinal “normal”: los microorganismos vivos presentes en los productos probióticos ayuda a repoblar el intestino humano en los casos de alteración de la microbiota propia como consecuencia de **infecciones intestinales**. Su consumo se recomienda en la prevención y tratamiento de la diarrea, enteritis o colitis (Lee y Salminen, 1995).

_ Reducción de las **alergias**: la intervención de los probióticos puede ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias atópicas, sobre todo en niños, mediante la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la microbiota intestinal (Mattila-Sandholm y cols, 1999).

_ Efectos sobre el **sistema inmunológico**: algunas cepas muestran una actividad inmunoestimulante en humanos, pudiendo actuar bien como adyuvantes de respuestas inmunes específicas (por intervención de los linfocitos T4), bien aumentando los mecanismos defensivos no específicos contra las infecciones o tumores (por fenómenos fagocitarios). Existen resultados que sugieren que la presencia de bacterias probióticas puede contrarrestar los efectos mutagénicos y genotóxicos en el colon y en otros lugares (Salminen y cols, 1999).

_ **Salud gástrica**: la habilidad de las bacterias probióticas para influenciar la colonización y actividad de *Helicobacter pylori*, bacteria asociada a gastritis crónicas, ulcera péptica y un factor de riesgo para el cáncer gastrointestinal, ha sido evaluada por diferentes autores. Los resultados de estudios animales y humanos sugieren que algunos probióticos o sus productos metabólicos pueden inhibir las infecciones por *H.pylori* (Salminen y cols, 1999; Sgouras y cols, 2004; Wang y cols, 2004).

_ **Prevención del cáncer**: estudios epidemiológicos aportan evidencias de que el consumo probióticos pueden reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Salminen y cols, 1999)

_ **Reducción del colesterol**: el efecto de los probióticos en la reducción de los niveles de colesterol y los mecanismos de acción de estos efectos son desconocidos pero algunas hipótesis sugieren que ciertas cepas pueden asimilar la molécula de colesterol (Salminen y cols, 1999) que es un factor de riesgo para problemas cardiovasculares.

_ **Enfermedad cardiovascular**: el uso de probióticos/prebióticos para la medicina preventiva y para disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular está aún por probarse (WGO, 2011).

2.2.3. Guía de evaluación de probióticos en alimentos

Existe un interés creciente la industria del sector de la alimentación por la búsqueda de nuevas cepas con potencial probiótico. Ciertas revisiones describen cuales son los criterios que deben de poseer estos microorganismos para poder ser consideradas como probióticos. Los más utilizados en la actualidad son los propuestos por un grupo de expertos reunidos en 2002 por la FAO y WHO que han sugerido unas “guías para la evaluación de probióticos en alimentos” (FAO-WHO, 2006). Este grupo ha identificado una serie de pasos clave que tienen que ser considerados para la aplicación de las cepas con potencial probiótico en un alimento (Figura 3).

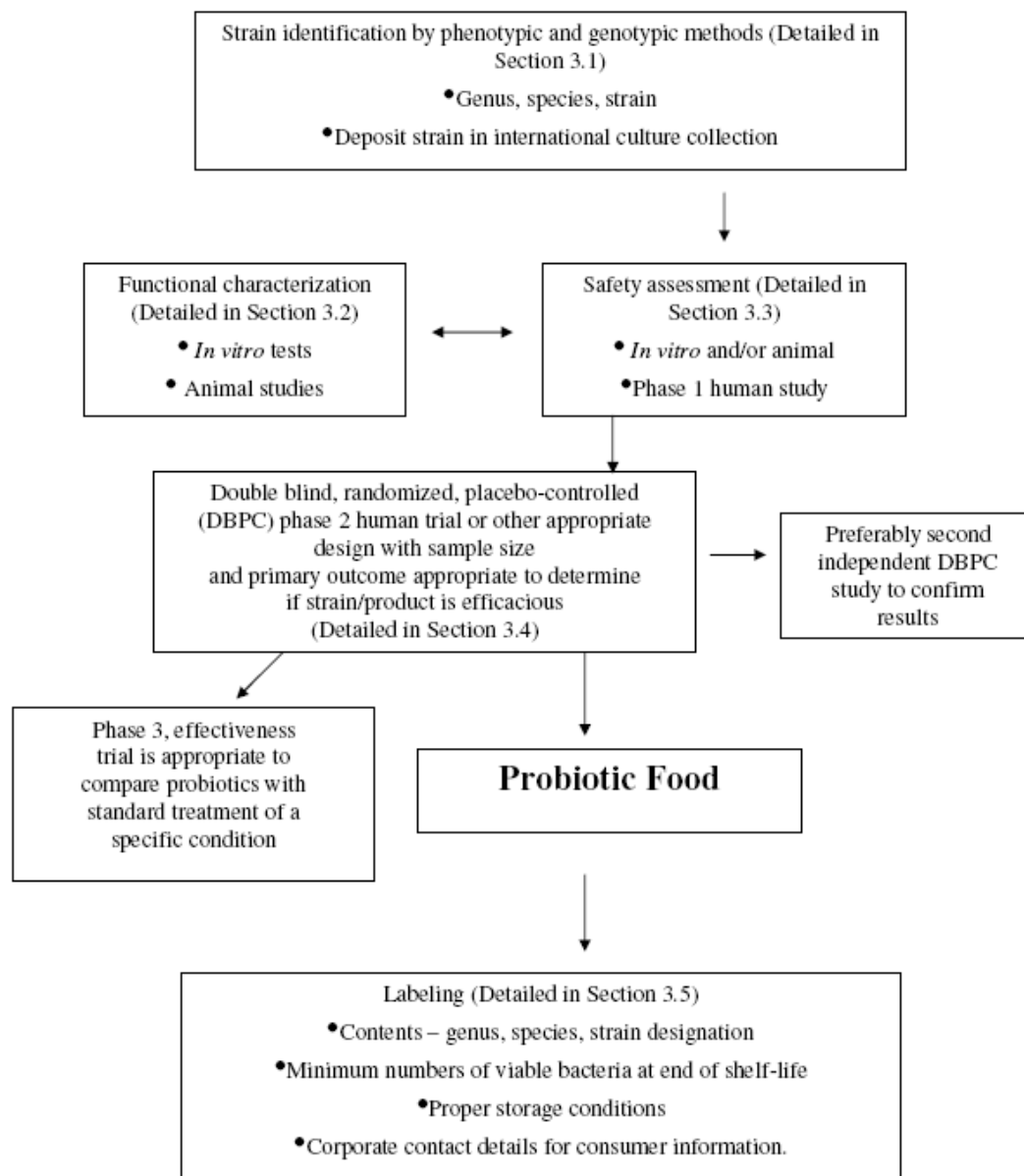


Figura 3. Guía para la evaluación de probióticos en alimentos (recopilado de FAO-WHO, 2006)

Respecto a la **idoneidad** del candidato a probiótico, éste tiene que estar identificado taxonómicamente de forma precisa (género y especie) y ser posible su distinción a nivel de cepa. En general es deseable que sean especies habitantes del hospedador objetivo, por ejemplo, de origen humano para los alimentos probióticos de consumo humano. Respecto a los criterios de **seguridad**, los candidatos probióticos tiene que ser cepas GRAS (“Generally Recognized as Safe”) otorgado por la FDA (“Food and Drug Administration”) Norteamericana o con el estatus QPS (“Qualified Presumption of Safety”) según la EFSA (“European Food Safety Authority”) por la que se rige la norma en Europa. Las cepas no tienen que producir compuestos tóxicos, no deben transmitir resistencias a antibióticos, entre otras características de seguridad, y su uso seguro tiene que estar apoyado en evidencias mediante estudios *in vitro*, *in vivo* y/o de

intervención en humanos (estudios de fase I). En relación a la **caracterización funcional** de los potenciales probióticos, se recomienda la utilización de una serie de estudios *in vitro* que permitan la selección de buenos candidatos, y, a ser posible, una validación mediante modelos animales *in vivo*. Entre estos criterios de selección estarían:

- capacidad para sobrevivir y mantener su actividad metabólica en el lugar diana (generalmente el colon) para lo que es interesante estudiar su resistencia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal superior (pH ácido, bilis, enzimas gástricos y pancreáticos,
- capacidad para colonizar transitoriamente el colon mediante la adhesión al epitelio intestinal,
- capacidad para competir con la microbiota intestinal mediante por ejemplo, la producción de ácidos orgánicos bacteriocinas y otros antimicrobianos. Preferentemente con potencial de adherencia y colonización

Aunque no se ha recogido en el esquema de la FAO-WHO, es altamente deseable que los candidatos probióticos presenten una **aptitud tecnológica** que facilite su aplicación en la matriz del alimento que será utilizado como vehículo de administración: adecuada producción de biomasa y alta viabilidad durante el procesado de obtención de la misma (buen crecimiento, recuperación, concentración, congelación, deshidratación y almacenamiento para la distribución); alta viabilidad en el alimento (preferentemente 10^6 - 10^8 ufc por unidad de peso o volumen); capacidad de proporcionar cualidades organolépticas deseables cuando se incluyan en los alimentos o procesos de fermentación o, al menos, de no modificar negativamente sus propiedades sensoriales; ser genéticamente estable, etc.

Finalmente, la **funcionalidad del alimento probiótico** debe ser demostrada en estudios de intervención en humanos (fase II) bien diseñados (doble-ciego, aleatorizados, con placebo) y con un “*outcome*” primario bien definido, es decir, cuál sería el efecto beneficioso (medible) para el que se propone el alimento probiótico. En general, dado que los alimentos probióticos no se proponen como alternativa a un tratamiento terapéutico, no sería necesarios estudios de intervención de fase III. Finalmente, pero no menos importante, el alimento funcional tiene que tener un **correcto etiquetado** para que el consumidor pueda acceder fácilmente a la información sobre los beneficios para la salud de dicho alimento.

2.2.4. *Bifidobacterium* spp. como probiótico

2.2.4.1. Propiedades funcionales

El género *Bifidobacterium* se encuentra en el tracto gastrointestinal humano y animal constituyendo una de las poblaciones predominantes del mismo en los niños alimentados con leche materna (Biavati y cols, 2000). La contribución de las bifidobacterias a la salud humana ha sido reconocida

por numerosos estudios y ha dado lugar a la explotación comercial de algunas de las cepas como probióticos para mantener y/o mejorar la salud humana y animal (Gomes y cols, 1999; Stanton y cols, 2001). Entre las funciones de las bifidobacterias que producen efectos beneficiosos para la salud del hospedador se encuentran:

- (i) Funciones metabólicas, interviniendo asimilación de nutrientes de la dieta y produciendo metabolitos (principalmente ácidos grasos de cadena corta) beneficiosos,
- (ii) Funciones protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos,
- (iii) Funciones tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular (Guarner y Malagelada, 2003).

Como se ha indicado anteriormente, es necesario que las bacterias probióticas sean capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal para poder ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud. La habilidad de las bifidobacterias para sobrevivir al tránsito gastrointestinal varía considerablemente entre especies y entre cepas, dado que las condiciones ácidas del medio estomacal y los efectos inhibitorios de las sales biliares secretadas en el duodeno son los mayores impedimentos para su supervivencia. El porcentaje estimado de supervivencia de las bifidobacterias a través del tracto gastrointestinal se ha estimado en torno al 30% (Charteris y cols, 1998) y son varios los mecanismos de resistencia y adaptación de este género al ambiente intestinal (Sánchez y cols, 2013).

2.2.4.2. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

El género *Bifidobacterium* pertenece al filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Bifidobacteriales*, y familia *Bifidobacteriaceae*. Está compuesto por microorganismos de morfología variada, generalmente bacilos cortos, irregulares y con ramificaciones. Esos bacilos, con una pared externa irregular, son usualmente cóncavos y sus extremidades pueden adquirir diversas morfologías con extremos en forma de espátula. En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen (Figura 4). Se trata de bacterias Gram-positivas, inmóviles, no esporuladas, con contenido en G+C (guanina + citosina) mayor del 50%. Son anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (Biavati y Mattarelli, 2006).

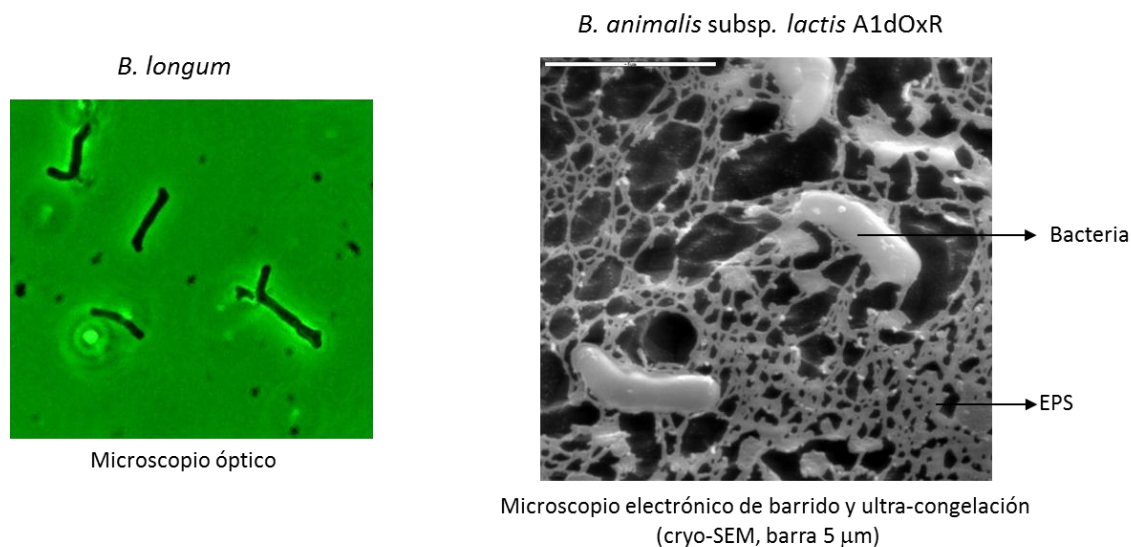


Figura 4. Morfología genero *Bifidobacterium* en distintos tipos de microscopio.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten bien temperaturas mayores de 46°C. El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6,5-7,0 y a valores menores el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello es importante elegir cepas capaces de sobrevivir en productos lácteos, generalmente ácidos, que contienen este microorganismo. La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable; aunque en algunos casos (*B. bifidum*) se pueden observar tipos diferente de colonias: algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas y con bordes desiguales. El hábitat natural de las bifidobacterias son los intestinos de animales e insectos. Además también han sido encontradas en aguas fecales e incluso han llegado a multiplicarse en ellas, por ello, se pueden emplear como indicador de contaminación fecal de las aguas (Margolles y cols, 2009).

Las bifidobacterias no pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (que son del filo *Firmicutes*) y en este género las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa descrita por (Scardovi y Trovatelli 1965). Como productos finales de la glucólisis, además de ácido láctico, producen ácido acético como uno de sus principales productos de fermentación y en menor proporción ácido fórmico y etanol. No producen CO₂ ni los ácidos grasos de cadena corta butírico y propiónico. Generalmente son microorganismos catalasa negativos, no reducen los nitratos y emplean amonio como fuente de nitrógeno.

2.3. Exopolisacáridos (EPS) de BAL y Bifidobacterias

La capacidad de sintetizar una capa extracelular de hidratos de carbono, o exopolisacáridos (EPS), es un rasgo común en las bacterias, tales como los miembros de la microbiota que habitan en el intestino incluyendo *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Hidalgo-Cantabrana y cols, 2014). En la industria del sector lácteo se utilizan cultivos iniciadores de BAL que producen EPS *in situ* durante las fermentaciones lácteas, lo que permite obtener productos naturales con propiedades de viscosidad y texturas mejoradas, así como una estabilidad y capacidad de retención de agua mayor (Ruas-Madiedo y cols, 2008).

De acuerdo con el tipo de unión a la superficie bacteriana podemos distinguir dos clases de polímeros exocelulares: polisacáridos capsulares (CPS) y polisacáridos extracelulares o EPS propiamente dichos (Cerning, 1995). El primer grupo lo constituyen polímeros que forman una capa adherente a menudo unida de forma covalente. El segundo grupo está formado por polisacáridos con una unión a la célula muy débil o inexistente ya que estos polímeros se pueden liberar al medio extracelular (Laws y Marshall, 2001). En adelante utilizaremos el término EPS para referirnos a cualquier tipo de polisacárido, producido por BAL y bifidobacterias. Fenotípicamente, la producción de EPS se distingue por una colonia lisa brillante y mucosa (fenotipo mucoide) que puede ir acompañada, o no, por la formación de hilos al ser tocadas con un palillo, lo que se conoce como fenotipo “ropy”. Dependiendo de la composición química y el modo de síntesis los EPS pueden dividirse en dos clases: homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS).

2.3.1. Homopolisacáridos (HoPS)

Son polímeros compuestos por repeticiones de unidades de glucosa (α - y β -glucanos) o fructosa (β -fructanos). Los HoPS se sintetizan extracelularmente por la acción de glicosil hidrolasas (glicansacarasas). Estos enzimas utilizan sacarosa como donador de glucosa o fructosa los cuales, por actividad de estos enzimas, se unen a un α -D-glucano o a un β -D-fructano en formación, respectivamente. Además del tipo de enlace, según el carbono implicado los α -D-glucanos y β -D-fructanos se subdividen en diversos tipos: dextrano, mutano, alternano, tipo inulina, tipo levano, etc. El tamaño (masa molar) de los HoPS habitualmente es superior a 10^6 Da y el rendimiento de producción, aunque depende de la cepa, no es muy alto generalmente oscila en torno a 0,6 g/L, llegando en algunos casos a 10 g/L. Este último rendimiento es comparable a la producción de polímeros tipo gelano o xantano, de uso industrial como aditivos alimentarios, que son sintetizados por bacterias no pertenecientes a las BAL. Los β -glucanos se sintetizan por la actividad de otro tipo de enzimas (glicosiltransferasas) que se localizan en la membrana celular (Ruas-Madiedo y cols, 2009).

2.3.2. Heteropolisacáridos (HePS)

2.3.2.1 Consideraciones generales

Los HePS son polímeros constituidos por diferentes monosacáridos, siendo glucosa, galactosa y ramnosa los más comunes. También se ha descrito la presencia en menor cantidad de residuos de *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, manosa, fucosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico o grupos fosfato y acetilo (Cerning, 1995; Degeest y De Vuyst, 1999). Los HePS están constituidos por unidades estructurales que se repiten formando el polímero, originándose una gran diversidad de moléculas debido a las múltiples combinaciones de los distintos componentes, al tipo de enlace (α o β) y a la posición que ocupa el carbono involucrado en el enlace glicosídico, así como la presencia de sustituyentes (fosfato, glicerol, grupos acilo, etc.). El modo de síntesis de estos polímeros es complejo y en el mismo están involucrados varios enzimas, cuyos genes codificantes se encuentran próximos entre sí organizados en grupos denominados “*clusters*” *eps*. En general, la masa molar y el rendimiento de la producción de HePS es menor que el de los HoPS, lo cual limitaría su aplicación como aditivos alimentarios, siendo factible el uso de cepas productoras de HePS para la producción *in situ* del polímero durante la fermentación de la leche (Ruas-Madiedo y cols, 2009). La producción de HePS, y EPS en general, por BAL está muy influenciada por la composición del medio (fuentes de carbono y nitrógeno, factores de crecimiento, etc.) y las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, oxígeno o tiempo de incubación). El uso de unas determinadas condiciones afecta a la velocidad de crecimiento celular, lo que en función del tipo de microorganismo influye en la producción de EPS. Así, mientras que los HePS producidos por especies mesófilas parecen sintetizarse en mayor cantidad bajo condiciones de crecimiento subóptimas, por ejemplo a bajas temperaturas, la producción de HePS por parte de bacterias termófilas es máxima en condiciones óptimas de crecimiento (Degeest y cols, 2001).

2.3.2.2. Síntesis de HePS y clusters *eps*

La organización genética para la síntesis de HePS es compleja dado que combina rutas intracelulares (síntesis de las unidades repetidas) y extracelulares (translocación de las unidades, polimerización y determinación de la longitud de cadena). Por ello son numerosos los enzimas que están involucrados en la síntesis de las unidades de repetición, en la secreción y polimerización de las mismas, así como en la regulación del proceso. Los genes para la síntesis de HePS en BAL pueden estar localizados en plásmidos o en el ADN cromosómico, organizándose estos en grupos, denominados “*clusters*” *eps*, los cuales están altamente conservados en lo que a organización estructura-función se refiere, pero son muy variables en la secuencia de nucleótidos.

En general, los “*clusters*” *eps* de BAL tienen una estructura de operón en la que la gran mayoría de los genes están orientados en la misma dirección y se suele transcribir en un solo ARN mensajero (ARNm).

Aunque la función de la mayoría de los genes implicados en la síntesis de HePS solo se ha deducido, también se ha demostrado la funcionalidad de algunos mediante estudios de expresión. Uno de los genes cuya funcionalidad ha sido más estudiada es el que codifica la “*priming*”-GTF (Nierop-Groot et al., 2008) ya que se considera que éste es el enzima que inicia el proceso de ensamblaje de las unidades repetidas de los HePS al catalizar la transferencia de un azúcar-1-fosfato al lípido “*carrier*” C55, una molécula anclada en la membrana celular, mientras que el resto de GTF transfieren un nucleótido-azúcar y llevan a cabo el enlace glicosídico entre dos monosacáridos.

En el caso de las bifidobacterias no se ha observado una estructura funcional común, como el caso de las BAL, aunque si se han detectado la mayoría de los enzimas descritos para esta ruta de síntesis. En la Figura 5 se muestra el mapa genético del “*cluster*” *eps* detectado en *B. animalis* subsp. *lactis* (Hidalgo-Cantabrana y cols, 2014).

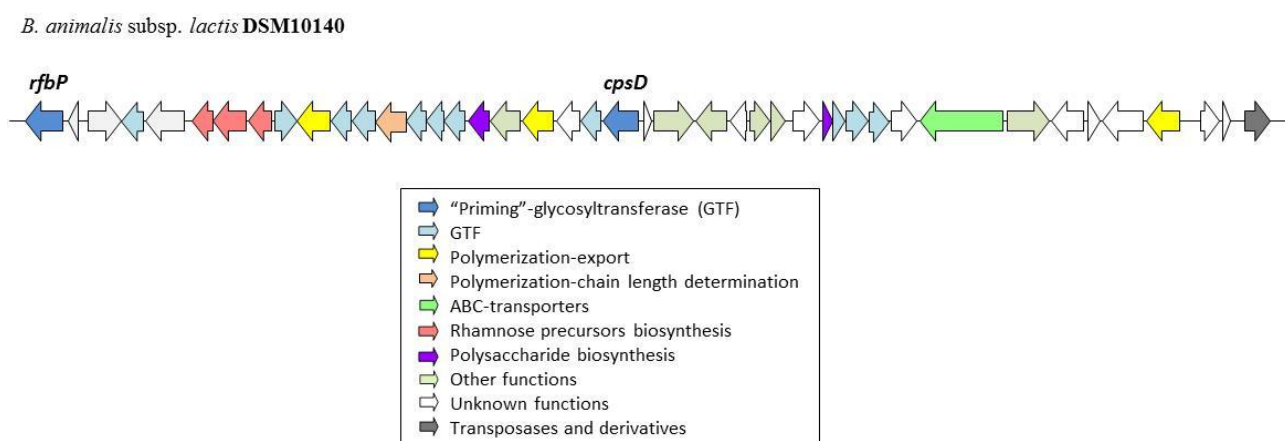


Figura 5. Mapa físico del “*cluster*” *eps* de la cepa tipo *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (recopilado de Hidalgo-Cantabrana y cols, 2014).

2.3.3. Aplicaciones de los EPS

Como se ha indicado anteriormente, las cepas de BAL productoras de EPS se utilizan en la industria láctea para mejorar de la viscosidad, textura y sensación bucal o “*mouthfeel*” de productos lácteos fermentados como el yogur, leches fermentadas o queso. Sin embargo, estas cepas no son deseables en otros alimentos fermentados, como bebidas alcohólicas fermentadas (vino, sidra, etc.) o productos cárnicos procesados (lonchados, etc.), puesto que generan defectos sensoriales (Aznar y cols, 2012). Aunque los EPS carecen de sabor por sí mismos, aumentan el tiempo que el producto permanece en la boca, incrementando la sensación de gusto (Duboc y Mollet, 2001), lo cual es especialmente interesante en productos desnatados con el fin de simular la textura y sabor originales. Además de sus posibles aplicaciones tecnológicas, se han descrito que alguna de las propiedades beneficiosas para la salud de las

cepas productoras con potencial probiótico puede estar relacionadas con los EPS, como favorecer la colonización del tracto gastrointestinal, efecto prebiótico (al tratarse de sustratos que favorecen/estimulan el crecimiento de microorganismos beneficiosos) o presentar actividad inmuno-estimuladora, entre otros (Degeest y De Vuyst, 1999; Hidalgo-Cantabrana y cols, 2014).

El conocimiento de la estructura de los HePS es importante para determinar el posible uso tecnológico de las cepas productoras. El tipo de uniones presentes en la cadena de los EPS, así como la presencia y tipo de grupos laterales tienen especial interés dado que confieren distinta rigidez a la cadena principal de EPS y pueden afectar a la capacidad para conferir viscosidad, tanto en solución acuosa como en productos lácteos fermentados (Ruas-Madiedo y cols, 2002). Respecto a la capacidad de los EPS para conferir viscosidad a las leches fermentadas cabe reseñar que, además de la concentración y de las características fisicoquímicas de los polímeros, hay que tener en cuenta las interacciones que estos establecen con otros componentes de la matriz alimentaria. En el caso de leches fermentadas, la interacción de los EPS con la matriz de caseínas (la proteína mayoritaria de la leche) tienen un papel relevante en las propiedades reológicas, la microestructura y la textura final del producto fermentado (Ruas-Madiedo y cols, 2008).

2.4. Técnicas para el estudio de la expresión génica

La expresión génica de un determinado gen en una célula puede ser cuantificada por la cantidad de proteína producida por la célula o, por la cantidad de ARN mensajero (ARNm) del gen en estudio producido. La cuantificación de la expresión génica mediante los métodos clásicos requiere de cantidades de ARNm difíciles de obtener cuando el número de muestras experimentales es limitado. Es por ello que la amplificación de este material genético mediante el uso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el análisis en tiempo real ha resuelto estos inconvenientes reduciendo en gran medida la cantidad de ARNm utilizado.

2.4.1. PCR cuantitativa a tiempo real

El empleo de la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión génica (qPCR) se encuentra ampliamente extendido en la investigación dentro del área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. El uso de qPCR en esta área, la base de la técnica, los requisitos que se deben cumplir para los ensayos de qPCR sean óptimos, y las ventajas que ofrece respecto a otras técnicas intentaran exponerse a continuación.

La técnica de qPCR es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (ARNm) de una muestra. Utilizando cebadores específicos, es posible determinar el número

de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN. Las plataformas de qPCR permiten que el progreso de la reacción de PCR pueda ser monitorizado en tiempo real. Los datos se recogen a lo largo de la reacción, no sólo en el punto final como en las técnicas de PCR estándares, y las reacciones se caracterizan por el ciclo en el que se detecta la amplificación de un ADN diana durante el desarrollo de la reacción, en lugar de caracterizarse por la cantidad de producto de ADN generado al final de un número de ciclos determinado como sucede en la PCR convencional (Martinez y cols, 2011).

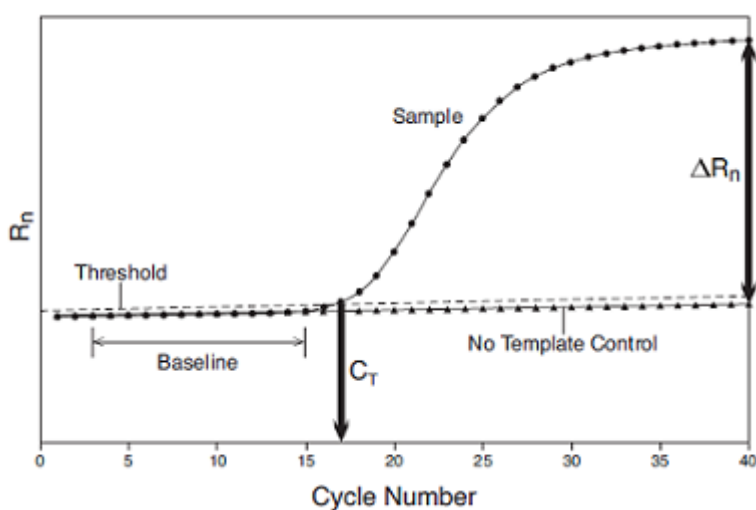


Figura 6. Grafica de amplificación de PCR a tiempo real. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia basal. "Threshold" es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el corte entre el "Threshold" y la curva de amplificación determina el C_t o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del C_t siempre se realiza en la fase exponencial de la curva (<http://cgs.hku.hk/portal/index.php/realtime-pcr/faq>).

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el software de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos empleados. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor presencia/expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores, tal y como se refleja en el gráfico de la Figura 7. La precisión es de gran importancia en los análisis microbiológicos, una cuantificación fiable depende del proceso de optimización y debe ser interpretada cuidadosamente en las distintas reacciones de qPCR. La exactitud de este análisis se ve influida por el diseño del cebador, la calidad del ADN (o del ADNc y su ARNm de partida), la presencia de inhibidores, la manipulación y el almacenamiento de las muestras, las sondas fluorescentes y los enzimas utilizados en el proceso (retro-transcriptasa inversa y ADN-polimerasa para la expresión génica). Por tanto, las sondas, cebadores y condiciones de PCR deben ser optimizados no sólo para conseguir un bajo límite de detección (sensibilidad), sino también para un tener amplio rango dinámico (eficiencia) (Martinez y cols, 2011).

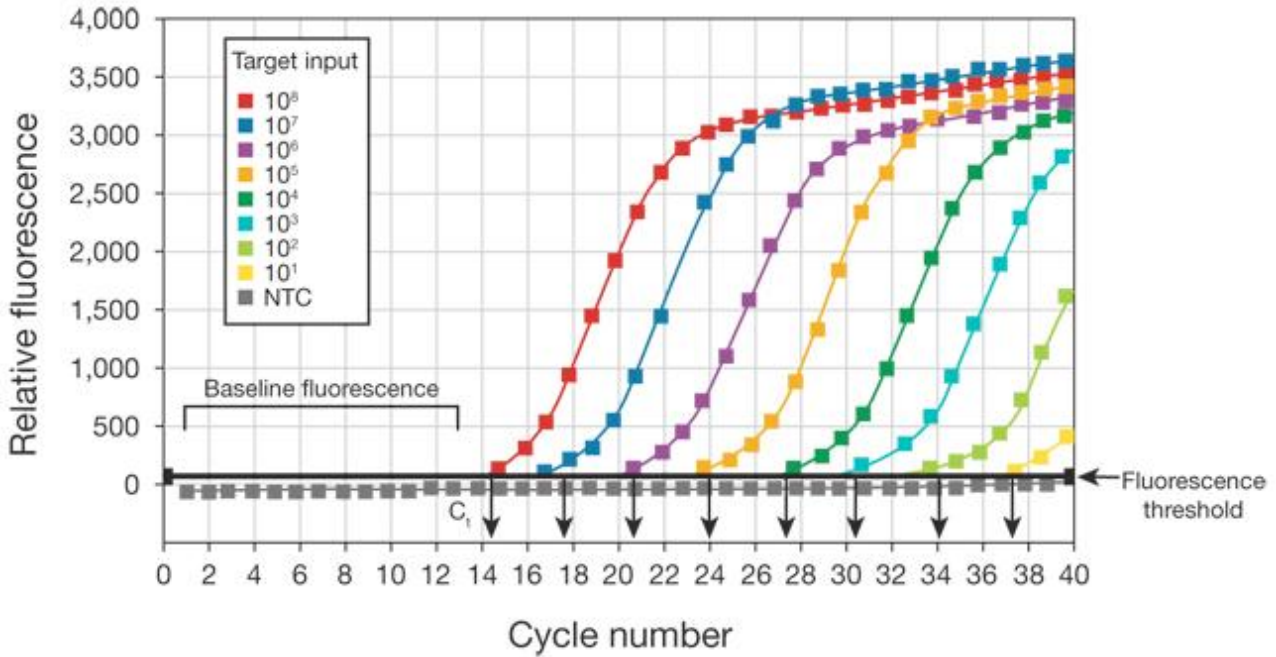


Figura 7. Gráfica de amplificación por PCR a tiempo real en escala logarítmica, muestras con diluciones seriadas de la cantidad inicial de ADNc (reproducido de <http://www.gene-quantification.info/>).

2.4.1.1. Tipos de fluoróforos

Existen fundamentalmente dos métodos de detección usados en qPCR: primeramente aquellos basados en el empleo de fluoróforos que se unen a ADN de doble cadena, como SYBR Green, entre otros, de gran utilización debido a su bajo coste, y un segundo tipo basado en uniones secuencia-específicas de sondas marcadas fluorescentemente al amplicón generado durante la qPCR. A continuación se comentaran brevemente.

- El SYBR Green se une inespecíficamente al ADN de doble cadena y produce fluorescencia. Estos fluoróforos no son específicos ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros que se puedan producir entre los cebadores. Por ello, el uso de SYBR Green implica un diseño muy cuidadoso de los cebadores con el fin de evitar dichos dímeros, así como la amplificación de ADN genómico que aparezca como contaminante en la muestra de ADNc.
- Otra alternativa, más cara pero recomendada cuando hay problemas de especificidad, es el uso de sondas específicas fluorescentes, como las sonda TaqMan. Esta técnica permite la cuantificación específica del ADNc de interés incluso en la presencia de amplificación inespecífica (dímeros de primer, ADN genómico, etc.) al tratarse de una técnica que incluye un tercer oligonucleótido marcado fluorescentemente de secuencia cien por cien homologa al amplicón a detectar. De forma que una vez unidos los cebadores en los extremos y producida la

amplificación esta sonda marcada se une específicamente a los amplicones generados liberándose la fluorescencia (Martinez y cols, 2011).

2.4.1.2. Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

Cuando la qPCR se combina con una reacción de retro-transcripción (RT-qPCR), es decir se obtiene el ADN complementario o ADN copia (ADNc) a partir del molde de ARNm, se pueden llevar a cabo estudios de expresión génica relativa. La medida de la expresión génica por medio de qPCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras (tejidos, tratamientos, puntos de muestreo, etc.) la expresión del gen objeto de estudio respecto a la de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (gen de referencia). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico. Con ello se eliminan variaciones debidas al error de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferente eficiencia de la retrotranscripción entre muestras. Una vez normalizada la expresión del gen problema para cada muestra se comparan estas expresiones y se puede establecer la expresión relativa del gen entre dos condiciones de estudio.

El método de cuantificación más utilizado es el **método del $\Delta\Delta Ct$** en el cual se comparan directamente los Cts del gen problema y del gen de referencia (ΔCt) en cada muestra; posteriormente se comparan los ΔCt de la muestra experimental con respecto a la muestra control. Para aplicar este método es necesario que las eficiencias de ambos genes, problema y referencia, sean similares (Livak y Schmittgen, 2001).

$$\Delta Ct = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ condición problema} - \Delta Ct \text{ condición control})$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.4.1.3. Requisitos de las muestras para cuantificación génica

Para llevar a cabo la reacción de la RT-qPCR se requiere de ARNm de gran pureza e integridad, así como libre de contaminación de ADN genómico para que nos permita la obtención de ADNc de calidad. Los requisitos específicos del ARN total son: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ (absorbancia de ácidos nucleicos a 260 nm respecto absorbancia de proteínas a 280 nm). Generalmente se requiere obtener una concentración de ADNc entre 10-100 ng/ml para llevar a cabo la RT-qPCR.

Cuando se trabaja con ARN de menor calidad se disminuye la eficiencia, sensibilidad y precisión de los resultados. Si están presentes restos de ADN genómico, esto afectaría a la sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-qPCR, se recomienda el tratamiento de la muestra con enzimas (DNasa), bien durante el proceso de extracción del ARN, o bien tras finalizar el mismo. Finalmente, es importante inactivar de la

muestra de ARN purificado la DNasa empleada tras el tratamiento de hidrolisis del ADN genómico, ya que la presencia de estas enzimas inhibiría la síntesis de ADNc (Real-time PCR Handbook, (http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf)).

2.4.1.4. Otras Aplicaciones

Las aplicaciones de la qPCR en la industria alimentaria se pueden circunscribir a tres sectores: 1) detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG), 2) detección y enumeración de microorganismos y 3) determinación de la autenticidad de los alimentos. La detección de OMG en materias primas, ingredientes o productos procesados tiene una importancia creciente para que el consumidor conozca que el producto que está consumiendo. El constante desarrollo de nuevas plantas, microorganismos y animales modificados genéticamente ha generado la necesidad de disponer de métodos de análisis apropiados para detectar, identificar y cuantificar los OMG, con el fin de detectar y evitar posibles riesgos para la salud humana o el medio ambiente que pudieran derivarse de su producción o consumo (Haslberger, 2000). En el análisis microbiológico de los alimentos, el empleo de métodos rápidos de qPCR presenta importantes ventajas frente a los métodos tradicionales de aislamiento e identificación de patógenos, que requieren días o semanas para establecer el diagnóstico. El ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real es más sensible y específico que las técnicas convencionales de detección de patógenos (Desjardin y cols, 1998), y se ha empleado para detectar y cuantificar en los alimentos diferentes bacterias, parásitos, hongos y virus. En la identificación de especies, esta técnica se ha empleado para detectar diferentes especies animales en alimentos destinados al consumo humano o animal.

3. Material y Métodos

3.1. Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio utilizaron dos cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*: **A1**, aislada de un producto lácteo fermentado, y **A1dOxR**, derivada de A1, adaptada en el laboratorio a bilis por la exposición de la cepa A1 a concentraciones crecientes de sales biliares. Tras sucesivas generaciones de crecimiento en ausencia de bilis, esta cepa adquirió de forma espontánea un fenotipo “Ropy”, indicativo de la producción de un EPS “filante”. Ambas cepas se crecieron en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Difco®; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) suplementado con L-cisteína al 0,25% (p/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) (MRSC), a 37°C en una cabina de anaerobiosis modelo MG500 (Don Whitley Scientific, Yorkshire, Reino Unido) con una atmósfera de 10% (v/v) de H₂, 10% de CO₂ y 80% de N₂. En estas condiciones las dos cepas son capaces de sintetizar EPS, pero sólo la cepa A1dOxR tiene un fenotipo ropy.

De forma rutinaria se partió de stocks de las cepas, congeladas en MRSC + 20% glicerol a -80°C, de la colección IPLA que se crecieron por agotamiento en placas de MRSC con 2% de agar (agar-MRSC; Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia) durante tres días a 37°C y en atmósfera anaerobia. A partir de una colonia aislada se realizaron precultivos en MRSC (10mL) durante 18±1 h en las condiciones antes descritas. A partir de estos cultivos se inoculó (2% v/v) un total de 50 mL de MRSC que nuevamente se incubó 18±1 h.

Estos cultivos se centrifugaron a 10.000 r.p.m [~ 15.880xg centrifuga Kobota (Kubota Co., Tokio, Japón) en rotor AG-6512C] durante 30 min a 20°C descartándose el sobrenadante. Los pellets obtenidos fueron lavados y resuspendidos en tampón PBS (50 ml), centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones. Los pellets se resuspendieron en 40mL de leche pasteurizada, (ver apartado 3.2.1), ajustando la concentración bacteriana entre 10⁷-10⁸ ufc/ml.

3.2. Elaboración de leches fermentadas

3.2.1. Preparación y tratamiento térmico de la leche

Para la preparación de la leche se utilizó como base 1 L de leche desnatada [Difco™, Becton Dickinson (BD), Bioscience, San Diego, CA, EEUU] reconstituida al 11% (p/v). Una vez homogeneizada la leche se repartió en volúmenes iguales (200 ml) en recipientes estériles, cada uno de los cuales se suplementó con una fuente nitrogenada diferente: extracto de levadura (0,4% p/v, Bacto™, BD), hidrolizado enzimático de caseína (= casitona) (2% p/v, Sigma-Aldrich-Fluka, Sigma-Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) e hidrolizado ácido de caseína (2% p/v, Sigma-Aldrich-Fluka). Se utilizó una leche sin suplementar como control de la pasterización. Todas las muestras de leches se sometieron al mismo tratamiento térmico de doble pasterización consistente en un calentamiento hasta 90°C y mantenimiento

de esta temperatura durante 5 minutos; posteriormente se dejaron atemperar y se almacenaron a 4°C hasta el día siguiente, y finalmente se sometieron a un segundo ciclo de pasteurización.

3.2.2. Fermentación y curvas de acidificación de la leche

Cada tipo de leche, suplementada y esterilizada de la forma antes expuesta, se inoculó al 5% (v/v) con las suspensiones celulares de las dos cepas en estudio, *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR, preparadas en leche según se indicó en el apartado 3.1..

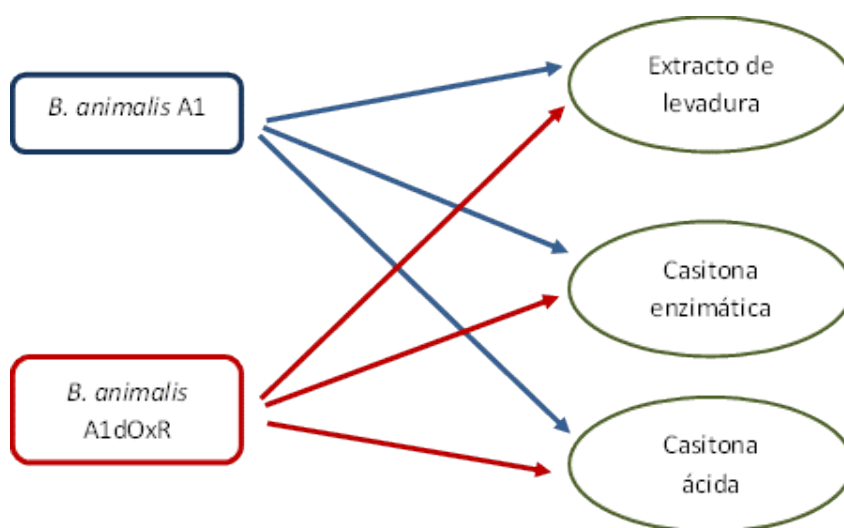


Figura 8. Condiciones (medios de cultivo) ensayadas en el presente estudio

Una vez realizado el inóculo se introducen las diferentes muestras de leches en un baño a 37°C realizando el seguimiento en tiempo real de la fermentación a través de electrodos de pH del equipo pHmeter ORION™ Versa Star™ (Thermo Scientific Inc., USA) que nos permite recoger datos de medida del pH a intervalos de tiempo predeterminados (en este caso 30 min) durante todo el proceso de fermentación. De esta forma se obtienen las curvas de acidificación para las variables en estudio (cepas y fuentes de nitrógeno). Las fermentaciones lácteas se llevaron a cabo por triplicado en experimentos independientes.

3.2.3. Recuentos microbianos

Con el fin de controlar la viabilidad y posible crecimiento de las dos cepas ensayadas a lo largo de la fermentación, se llevaron a cabo recuentos al inicio y al final de la misma (18 h) en los mismos puntos en que se tomó muestra para análisis de expresión génica. Para ello, a partir de las diferentes muestras se realizaron diluciones seriadas (en base diez) en solución Ringer (Merck, Darmstadt, Alemania) agitando

cada muestra en un vortex para conseguir una buena homogenización. Se sembraron en profundidad diluciones lo suficientemente altas, para permitir la correcta cuantificación de los viables presentes en las muestras, en placas de agar-MRSC que se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 48-72h.

3.3. Optimización de la extracción de ARN

Para la puesta a punto del protocolo de extracción de ARN a partir de leches fermentadas se procedió a optimizar la ruptura de la matriz de caseína del producto fermentado, liberándose así los microorganismos lo que facilitaría la obtención de un ARN de gran calidad. Las muestras de partida consistieron en la leche recién inoculada y leche fermentada (después de 18 h de fermentación). Para la ruptura de la matriz de caseína se probaron dos soluciones de citrato de sodio, adicionándose 600 µL de una solución 50% (p/v) en 15 ml o 7,5 ml de una solución 4% (p/v) a 7,5 ml de leche, respectivamente, hasta tener una concentración final de citrato de sodio 2% en ambos casos. Por otro lado, también se probó a adicionar 400 µl ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.5 M a 15 ml de los distintos tipos de leche, para tener una concentración final 0,01 M que nos permitiera desestabilizar la matriz de caseína mediante la acción quelante del EDTA sobre el Ca²⁺.

Todas muestras, con los diferentes reactivos y concentraciones empleados, se sometieron a varios ciclos de homogenización en tiempos variables (desde 30 s a 1 min) de duración en un homogeneizador de paletas Stomacher® (Seward Ltd. Sussex, Reino Unido) hasta obtener una buena homogenización de las mismas. El homogeneizado (1 ml) se pasó a tubos eppendorf de 2 ml para proceder a la extracción del ARN manteniéndose en hielo durante el proceso de extracción. Las muestras se centrifugaron [11.000 rpm (= 11.200 xg), 3 min a 4°C], decantando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 900 µl de solución TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH = 8). Para la lisis mecánica de las bacterias presentes en la suspensión anterior se prepararon tubos conteniendo 500 mg perlas de zirconio/sílice (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, EEUU), SDS (dodecilsulfato sódico 50 µl), cloroformo (250 µl) y fenol a pH ácido (250 µl) a los que se añadió la muestra resuspendida en TE. Los tubos se mezclaron por inversión y se sometieron a 4 ciclos de 30 segundos, a velocidad 6.0, en el homogeneizador FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Francia) manteniéndose las muestras en hielo durante un minuto entre cada ciclo. Posteriormente, se centrifugaron (11.000 rpm, 30 min, 4°C) y se transfirió la fase superior a un nuevo tubo eppendorf enfriado en hielo que contenía 500 µl de cloroformo. La muestra se homogeneizó en el vortex y se sometió a una posterior centrifugación (11.000 rpm, 5 min, 4°C) tras la cual se transfirió la fase superior a un tubo limpio. A partir de este paso, las siguientes etapas del protocolo tuvieron lugar a temperatura ambiente.

Para extracción final del ARN se utilizó el kit comercial “RNeasy mini kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Se preparó una mezcla con 1000 μ l del buffer RLT y 20 μ l DTT 2 M. Se añadieron 350 μ l de esta mezcla al sobrenadante tratado con cloroformo y se agitó en el vortex. Se añadieron 250 μ l de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Toda la mezcla se pasó por una RNeasy minicolumn y que se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se descartó el filtrado y a la columna se añadieron 350 μ l del buffer de lavado RW1 centrifugándose y descartándose de nuevo el filtrado. Posteriormente, para cada muestra se preparó una mezcla con 70 μ l de buffer RDD y 10 μ l DNasa (Qiagen) que se añadió (80 μ l) a la misma columna, dejándose actuar 60 minutos. Seguidamente, se realizó un lavado con 350 μ l del buffer RW1, y tras centrifugar se descartó el filtrado. Se añadieron 500 μ l del segundo buffer de lavado (RPE) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 segundos. Se llevó a cabo un último lavado con 500 μ l del buffer RPE, se centrifugó de nuevo durante 2 minutos descartándose el filtrado. Para eliminar los posibles restos de etanol retenidos por la columna se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto. La columna se transfirió entonces a un tubo limpio al que se añadieron 40 μ l de agua libre de RNasas, se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto. Finalmente, se recogió el filtrado que contiene el ARN en solución. Estas preparaciones de ARN se sometieron a un segundo tratamiento para la eliminación de restos de ADN con la enzima *DNasaI*, *RNase-free* (Fermentas, Thermo-Scientific, Madrid) empleando el siguiente protocolo para un volumen final de 10 μ l: 1 μ l del buffer de reacción 10x, 5 μ l de ARN, 3 μ l de agua tratada para ARN y 1 μ l de *Dnasal*. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 90 min, posteriormente se añadió 1 μ l adicional de *DNasaI* y se incubó de nuevo 90 min. Finalmente, se paró la reacción con 1 μ l de EDTA 50 mM que se dejó actuar 10 min a 65°C.

Una vez optimizado el protocolo y para llevar a cabo el estudio de expresión de genes *eps*, se procedió a la purificación (por duplicado) de dos fermentaciones lácteas independientes.

3.4. Cuantificación y calidad del ARN extraído

La concentración y ratio (260/280) del ARN extraído se midieron por espectrometría mediante el sistema Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EEUU) antes de congelar las muestras a -80°C hasta su utilización. La calidad de los ARNs extraídos se valoró mediante geles de agarosa con lejía (doméstica) que permite de una forma barata y rápida ver la integridad del ARN (comprobándose que las bandas 16S y 23S del ARN ribosomal estaban bien definidas y sin degradar). Para ello, se preparó agarosa al 1% (p/v), en buffer TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH=8) y una vez llevada la mezcla a ebullición se añadió lejía al 2% (v/v). La lejía permite desnaturalizar la estructura secundaria de ARN e inhibir posibles RNasas presentes en el gel. Después de la preparación del gel y tras su inmersión en la cubeta de electroforesis, se cargó la muestra de ARN (1 μ l) mezclada con 2 μ l de una dilución 1:1000 del colorante GelRed Nucleic acid

gel stain (Biotium Inc., Hayward, CA, EUU). Los geles se corrieron durante 50 minutos a 100 V. La visualización se llevó a cabo en el transiluminador Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad Laboratories, S.A, Alcobendas) bajo luz UV. Por otro lado ausencia de ADN residual, así como la validación de los distintos métodos de extracción, se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR) empleando oligonucleótidos para los genes *recA* y *tuf* (ver apartado 3.6).

3.5. Obtención de ADNc (transcripción inversa)

Se obtuvo ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN mediante transcripción inversa usando el Kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Life Technologies, Alcobendas, Madrid). Para ello se utilizó el termociclador UnoCycler (VWR International Eurolab S.L., Barcelona) y se retro-transcribió 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µl reacción, de los cuales 2 µl correspondieron al buffer de reacción, 2 µl a los cebadores, 0,8 µl a los dNTPs y 1 µl a la transcriptasa reversa MultiScribe™ MuLV (Life Technologies). La retro-transcripción tuvo lugar a 37°C durante 2 horas.

3.6. Técnica de PCR cuantitativa

3.6.1. Cebadores empleados

La expresión génica relativa de genes de interés se comprobó mediante qPCR precedida por transcripción reversa del ARN total (RT-qPCR). Se emplearon oligonucleótidos específicos diseñados para los genes *rfbP* y *cpsD*, que codifican para las dos “priming-GTF” del “cluster” *eps* en *B. animalis* subsp. *lactis* descritos previamente por Hidalgo-Cantabrana y colaboradores (2013). Los genes *recA* (recombinasa A) y *tuf* (factor de elongación TU) se usaron como calibradores o genes de referencia (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores empleados en este trabajo para el estudio de la expresión génica relativa

Nombre	locus-tag	Función potencial	Secuencia 5'→3'	Referencia
RecA	Balat_1114	Recombinase A	F: GGTGGGAATCACCTCGATGT R: GCTCTGCCATGCGTTTGG	Hidalgo-Cantabrana y cols, 2013
TUF	Balat_0620	Elongation factor Tu	F: GGTTCAGCCTGGCGATCA R: CCATAGCGATCGGCTGGAT	Este trabajo
Gtf01207	Balat_1371	Undecaprenyl-phosphate sugar phosphotransferase (RfbP)	F: CGTGCTGAGTCGAAAGAATCG R: TTGTAGAACGTGATCGGCTCA	Hidalgo-Cantabrana y cols, 2013
Gtf00468	Balat_1392	Galactosyltransferase (CpsD)	F: TGACGACTGTTTGCAACTGA R: GCGCAGGCAGCGGAATAC	Hidalgo-Cantabrana y cols, 2013

En la Tabla 4, se muestra también la localización en el genoma de estos genes, de acuerdo con la anotación de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 (Numero de acceso GenBank: NC_012815), así

como la secuencia de los iniciadores empleados en este trabajo. Se analizaron las dos extracciones de ARN de cada fermentación láctea (4 muestras) y la reacción de qPCR de cada muestra se llevó a cabo por triplicado (empleando tres diluciones del ADNc).

3.6.2. Condiciones de PCR

El análisis de RT-qPCR de expresión génica se realizó empleando el “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y el equipo “ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems). Todas las reacciones se llevaron a cabo mediante la adición de 1 µl de ADNc (probándose distintas diluciones: 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) a 19 µl de la mezcla de qPCR [10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix, 0,5 µl de cada cebador, obteniéndose una concentración final de 250 nM, y 8 µl de H₂O de biología molecular (Sigma)]. La amplificación se realizó utilizando el protocolo estándar, con un paso inicial a 95°C durante 10 min y 35 ciclos con dos pasos: el primero a 95°C durante 15 s y el segundo a 60°C durante 1 min. Los resultados se analizaron en base a los valores de Ct, considerándose positivos aquellos valores de amplificación menores que los obtenidos para el negativo con al menos cinco Cts de diferencia. Se usó como “*threshold*” los valores por defecto del “Sequence Detection Software” (v1.4, Applied Biosystem) para el equipo de qPCR utilizado.

3.6.3. Análisis de datos

Para el análisis de la expresión relativa se empleó el método de la $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Analizándose los resultados en base a la diferencia de Cts entre los dos genes problema y los dos calibradores para cada condición. De forma que: ΔCt es la diferencia entre la Ct obtenida para el gen problema (*rfbP* y *cpsD*) respecto la obtenida para cada calibrador (*recA* y *tuf*) y $\Delta\Delta\text{Ct}$ es la diferencia entre ΔCt de la condición problema (leche fermentada de 20 horas) y la ΔCt de la condición control (tiempo cero de la fermentación). Finalmente la expresión relativa de cada gen se calculó como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante pruebas independientes de ANOVA de una vía con el fin de evaluar las diferencias entre las dos cepas dentro de cada tipo de suplemento (fuentes nitrogenadas), o entre los distintos suplementos dentro de cada cepa. Cuando fue necesario, se aplicó el test de comparación de medias DMS (diferencia menos significativa) con el nivel de significación $p < 0,05$. Para este análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS / PC 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

4. Resultados y Discusión

4.1. Fermentación de la leche por *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR

El seguimiento del pH de las fermentaciones lácteas llevadas a cabo con las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR muestra que no se detectaron grandes diferencias en los valores de pH finales que fueron semejantes entre las dos cepas para los tres sustratos (Figura 9). Por el contrario, si se apreció una clara diferencia en la pendiente de acidificación para las dos cepas cuando fueron crecidas en distintas fuentes nitrogenadas; se detectó un descenso de pH más rápido, llegando también a un rango de pH inferior, en las leches suplementadas con extracto de levadura en las dos cepas. Por tanto, en relación con la velocidad de acidificación de leche suplementada las bifidobacterias utilizaron preferentemente extracto de levadura, seguido de casitona ácida y en último término la casitona enzimática. En este sentido, en la literatura se ha descrito que tanto el crecimiento como la actividad metabólica de las bifidobacterias, al igual que cualquier bacteria, varían en función del medio de cultivo. Los sustratos nitrogenados suministran la fuente de nitrógeno fácilmente disponible de la que carece la leche fermentada, dado que esta especie tiene poca capacidad proteolítica dado que sus genomas muestran una alta especialización en el consumo de carbohidratos complejos (Botaccini y cols, 2010). La preferencia por extracto de levadura muestra que es un sustrato con mejor disponibilidad y/o mayor variedad de aminoácidos y, posiblemente, otros micronutrientes que no son suministrados por la caseína de leche (casitona).

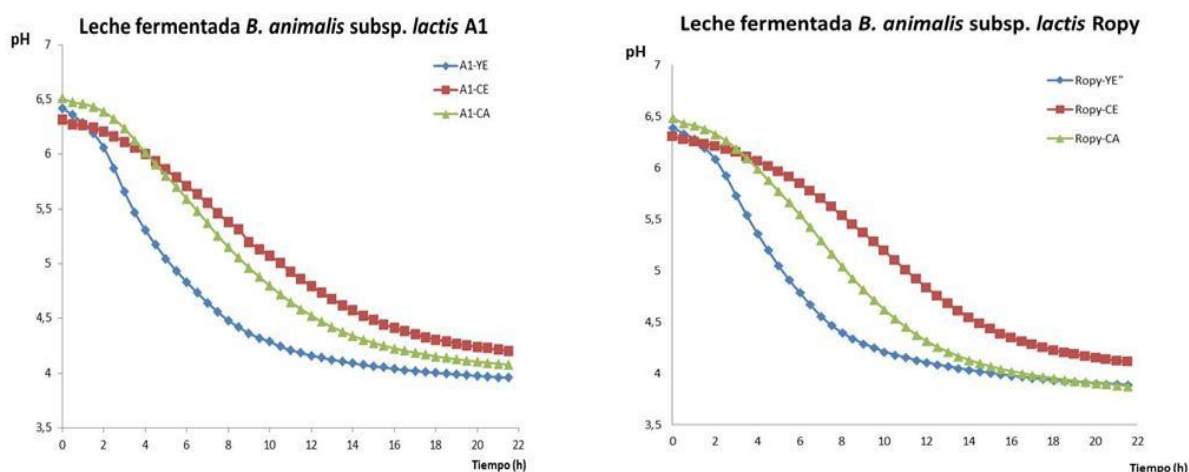


Figura 9. Curvas de pH obtenidas tras la fermentación de leche suplementada con distintos sustratos nitrogenados por las cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR (cepa Ropy). YE: extracto de levadura, CE: casitona enzimática, CA: casitona ácida.

Como sugieren la curvas de acidificación anteriores, las dos bifidobacterias fueron capaces de crecer en leche lo cual queda reflejado en el incremento de recuentos, entorno a una unidad logarítmica, observados entre el tiempo inicial (0 h leche recién inoculada) y tras 18 h de fermentación (Figura 10A).

Además, a las 18 h se observó que la cepa A1dOxR alcanzó mayores recuentos ($p < 0,05$) cuando creció en leche suplementada con extracto de levadura. Las diferencias observadas entre las cepas fueron aproximadamente de una media unidad logarítmica siendo los recuentos significativamente ($p < 0,05$) más altos para la cepa A1dOxR respecto a la A1 en todos los sustratos analizados (Figura 10B).

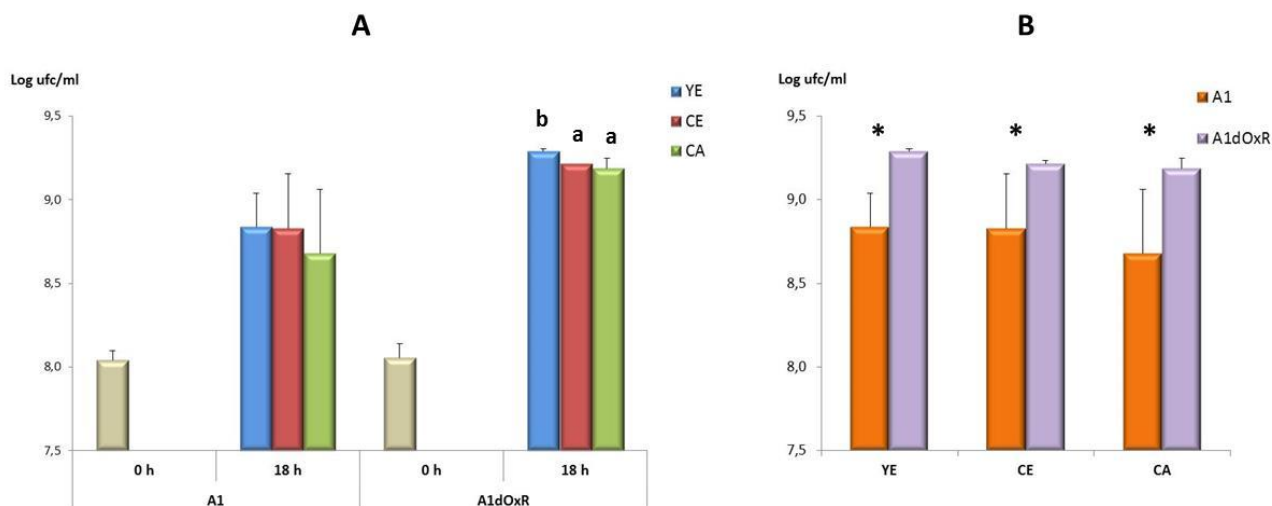


Figura 10. Recuentos del número de viables (Log UFC/mL), de las cepas *B. animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR crecidas en leche con diferentes sustratos nitrogenados. YE: extracto de levadura, CE: casitona enzimática, CA: casitona ácida. (A) Los recuentos de las columnas que llevan distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) según el análisis ANOVA y el test de comparación de medias MDS. (B) Los recuentos de las columnas que llevan un asterisco son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) según el análisis ANOVA.

Los resultados mostrados en este apartado indican que *B. animalis* subsp. *lactis* es capaz de crecer y fermentar la leche cuando se ésta se suplementa con una fuente de nitrógeno con alta biodisponibilidad de nutrientes. Se ha descrito en la literatura que esta especie es capaz de fermentar la leche con distinta eficiencia dependiendo de la presencia de cultivos iniciadores, como *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que pueden incrementar la proteólisis de la leche y poner a disposición los nutrientes necesarios para el crecimiento de *B. animalis* subsp. *lactis* (Casarotti y cols, 2014).

Por otro lado, se ha observado que la cepa A1dOxR, productora de un EPS con fenotipo ropy, ha conferido una viscosidad y textura adecuadas al producto fermentado (datos no mostrados), que podría ser comparable a las obtenidas con cepas productoras de EPS del cultivo iniciador del yogur (Mende y cols, 2012).

4.2. Optimización del método de extracción de ARN

En los primeros ensayos para optimizar la extracción de ARN se probaron las dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* crecidas en leche suplementadas con extracto de levadura. Como se indicó

anteriormente, se utilizaron 15 ml de leche fermentada y se probaron dos condiciones para la extracción: citrato de sodio (2% concentración final empleando un volumen de 600 µl de 50% citrato de sodio) y EDTA (0,01 M concentración final empleando un volumen de 400 µl de EDTA 0,5 M) y también una purificación adicional mediante segundo tratamiento con *DNAsal*. Se realizaron duplicados de cada condición y se comprobó la calidad de la extracción del ARN total por espectrofotometría, midiendo la concentración y el ratio de absorbancia 260/280 que indica la pureza de la muestra (Tabla 5). Además, se determinó la integridad del ARN total mediante un gel de agarosa con lejía al 2% (Figura 11).

Tabla 5. Concentraciones y ratios de material genético extraído de leches fermentadas con las cepas en estudio.

Cepa	Duplicado	Extracción	Concentración		Ratio	
			ng/µl	ng/µl*	260/280	260/280*
A1	1	Citrato de sodio	459,02	99,70	1,92	1,97
	2	Citrato de sodio	755,73	156,97	2,01	2,05
	1	EDTA	468,26	101,34	1,94	2,01
	2	EDTA	586,12	126,05	1,98	2,08
A1dOxR	1	Citrato de sodio	950,33	223,95	2,08	2,07
	2	Citrato de sodio	1.172,23	293,13	2,08	2,10
	1	EDTA	19,20	-	0,83	-
	2	EDTA	54,04	-	1,36	-

* tratamiento adicional con *DNAsal*

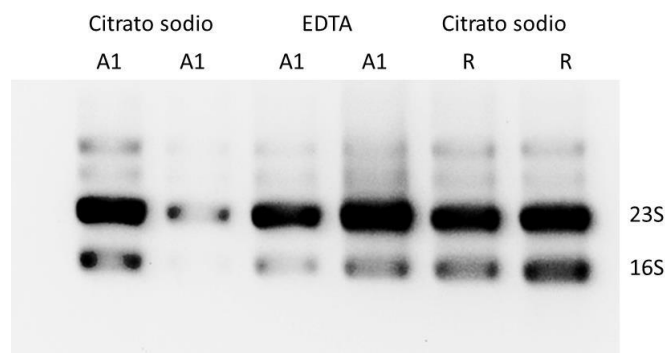


Figura 11. Gel de 1% de agarosa con lejía (al 2%) para la comprobación de la integridad del ARN extraído (después del segundo tratamiento con *DNAsal*). Calles 1 y 2: ARN de la cepa A1 usando citrato de sodio para su extracción. Calle 3 y 4: ARN de la cepa A1 usando EDTA para su extracción. Calle 5 y 6: ARN de la cepa A1dOxR usando citrato de sodio para su extracción.

Comprobamos que en el tratamiento con EDTA de la muestra de leche fermentada con la cepa A1dOxR no se obtuvo suficiente material genético y, además, este tenía una calidad muy pobre (ratio 260/280 < 1.8). Por el contrario, el tratamiento con citrato de sodio (2% concentración final) nos permitió obtener unos rendimientos de extracción de ácidos nucleicos totales satisfactorios y, tras el segundo tratamiento con *DNAsal*, una cantidad de ARN suficiente que nos permitiría llevar a cabo estudios de

expresión. Además, como muestra la Figura 11 éste es un ARN de muy buena calidad ya que se aprecian claramente las dos bandas del ARN ribosomal 16S y 23S intactas.

Con el fin de descartar la presencia de ADN genómico, se llevó a cabo un qPCR para el gen *recA* directamente a partir de las muestra de ARN. Las Cts obtenidas para todos los ARN fueron iguales o superiores a las obtenidas para el negativo (Ct ~ 30), descartándose la presencia de ADN residual (datos no mostrados). Posteriormente, se realizó la retro-transcripción del ARN, a ADNc, y se realizó una qPCR para los genes *recA* y *tuf* (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de las Cts obtenidas para las muestras de ARN obtenidas de leches fermentadas con las cepas A1 y A1dOxR en función del método de extracción del ARN empleado.

Cepa	Duplicado qPCR	Dilución ADNc	Cts			
			Citrato de sodio		EDTA	
			<i>recA</i>	<i>tuf</i>	<i>recA</i>	<i>tuf</i>
A1	1	0	22,5	19,2	22,6	18,5
		1/2	23,4	20,2	23,5	20,3
		1/4	24,3	21,5	25,1	21,6
		1/8	25,2	22,6	26,3	22,7
	2	0	21,7	18,5	22,7	18,5
		1/2	22,6	20,3	23,6	19,6
		1/4	23,6	21,1	24,5	21,1
		1/8	24,5	22,6	25,7	22,4
A1dOXR	1	0	20,9	20,9	-	-
		1/2	21,7	21	-	-
		1/4	22,7	22,4	-	-
		1/8	23,7	23,8	-	-
	2	0	21,1	20,3	-	-
		1/2	21,8	21,5	-	-
		1/4	22,8	22,9	-	-
		1/8	23,9	24,1	-	-

Las amplificaciones obtenidas para ambas cepas con los dos genes de referencia y con el tratamiento con citrato de sodio tuvieron una eficiencia similar puesto que las Cts variaron menos de una unidad en todos los casos, lo que implica diferencias muy pequeñas a la hora de cuantificar los transcritos. Además, los resultados de las diluciones seriadas de la misma muestra fueron reproducibles observándose una concordancia entre las Cts y el factor de dilución. En definitiva, los resultados obtenidos muestran que ruptura de la matriz de caseína de la leche fermentada con la A1dOxR usando EDTA no fue eficaz, probablemente debido a que la producción de EPS por parte de esta cepa favorece la formación de una matriz de agregados de caseína muy estable. En cambio con el citrato de sodio se obtuvo una buena concentración de ARN (entre 0,1 a 0,3 µg/µl) y de buena calidad (ratio 260/280 ~ 2). En este caso, el citrato

de sodio fue capaz de desestabilizar las micelas de caseína de las leches fermentadas tanto en presencia de un EPS ropy (cepa A1dOxR) como en su ausencia (cepa A1), permitiendo la liberación de las bifidobacterias y por tanto la extracción del material genético. Por ello, debido a la imposibilidad de obtener ARN en cantidad y calidad adecuada a partir de la cepa A1dOxR con el tratamiento de EDTA, seleccionamos el tratamiento con citrato de sodio para posteriores ensayos.

En sucesivos experimentos se observó que el uso de un volumen pequeño (600 µl) de citrato de sodio al 50% hacía que en algunos casos la homogenización de la leche fermentada (volumen 15 ml) no fuera completa ni reproducible, obteniéndose por lo tanto ARNs de concentraciones y calidades no aptos para los experimentos de expresión (datos no mostrados). Por ello, se decidió probar una solución de citrato de sodio menos concentrada (4% p/v), de forma que se añadieron 7,5 ml al mismo volumen de leche fermentada con lo que obtenemos una mezcla final de 15 ml, manteniendo la misma concentración final del citrato (2%) analizada en el apartado anterior. Al diluir más la muestra nos aseguraríamos una mejor homogenización entre el citrato de sodio y la leche fermentada lo que, en principio, facilitaría la ruptura de la matriz láctea. Para validar este cambio en el protocolo se empleó leche fermentada con la cepa A1dOxR, dado que era la que presentaba más problemas de cara a la extracción. Los resultados obtenidos de concentración y calidad de ARN se resumen en la Tabla 7 y en la Figura 12.

Tabla 7. Concentraciones y ratios de ARN extraído de leche fermentada con la cepa A1dOxR

Duplicado	ng/µl	ng/µl*	260/280	260/280*
1	1949,52	1123,40	2,11	2,06
2	2013,89	1070,51	2,07	2,06
3	1709,30	967,98	2,10	2,04
4	1587,19	973,076	2,09	2,02

* tratamiento adicional con DNAsa I

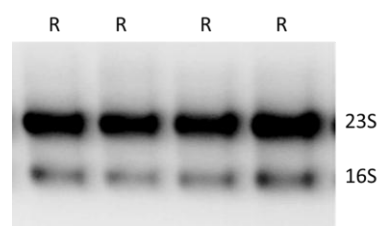


Figura 12. Gel de 1% de agarosa con lejía (2%) para comprobar la integridad del ARN extraído de leche fermentada con la cepa A1dOxR.

Los rendimientos observados con citrato de sodio de menor concentración (4%) añadido en mayor volumen (7,5 ml) fueron mejores que los alcanzados con citrato de sodio más concentrado (50%) pero añadido en menor volumen (0,6 ml). De nuevo la calidad del ARN obtenido fue óptima y también se comprobó por qPCR la ausencia de ADN residual. Parece por tanto, que la dilución de la leche fermentada a la mitad con una solución de citrato sódico al 4% permite la correcta homogenización de la muestra, la liberación de las bifidobacterias y un buen rendimiento, en cantidad y calidad, de extracción de ARN para llevar a cabo estudios de expresión génica.

4.2.1. Propuesta de Protocolo

A lo largo del estudio de optimización se compararon diferentes parámetros con el objetivo de describir un método por el cual el ARN se pueda extraer de la leche fermentada, independientemente de su consistencia y sin aislamiento previo de las células microbianas. Los resultados expuestos nos llevan a proponer el protocolo descrito a continuación como el óptimo para la extracción de ARN a partir de fermentaciones lácticas (Figura 13).

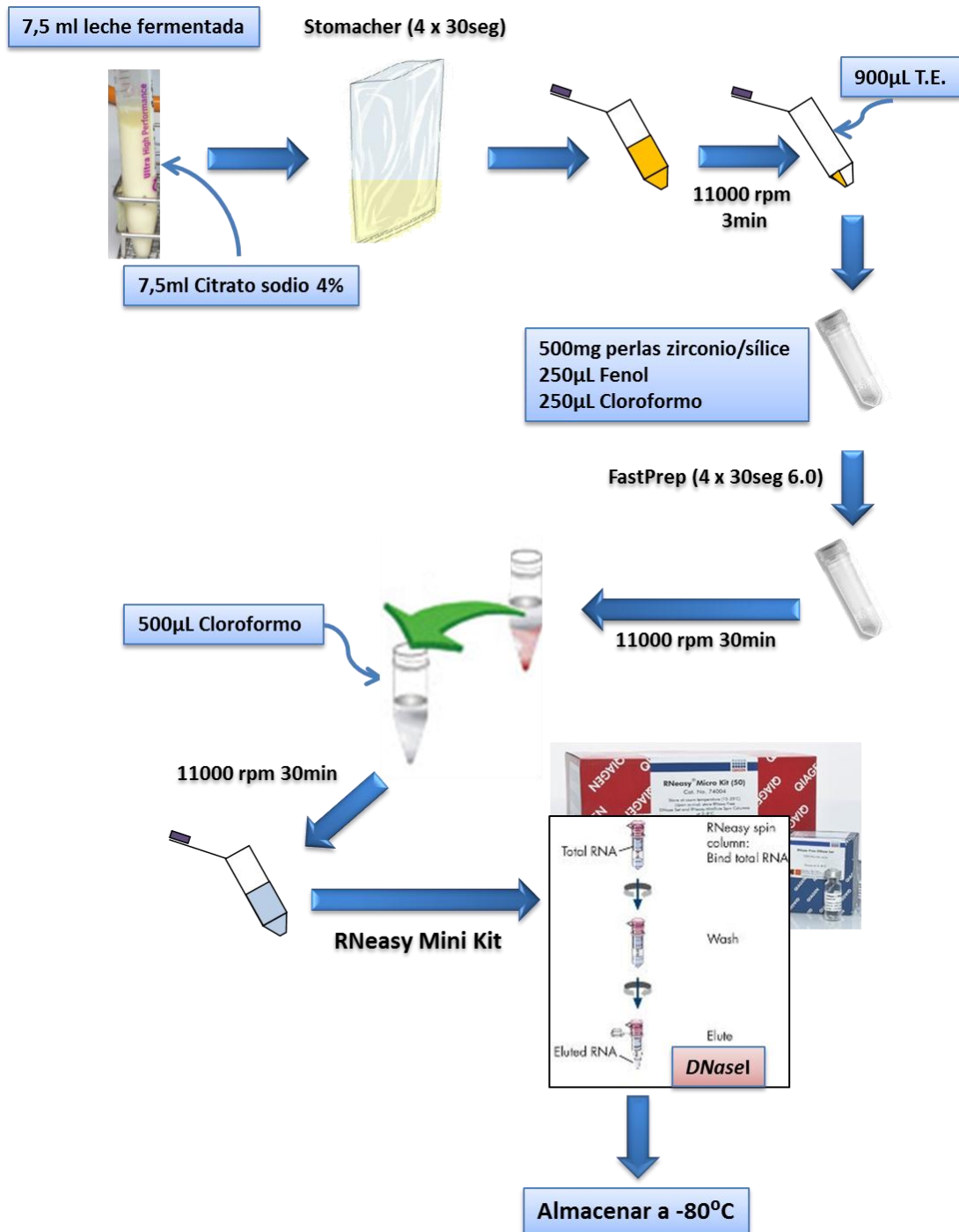


Figura 13. Protocolo optimizado propuesto para la extracción de ARN en leches fermentadas con bifidobacteria.

En este procedimiento la primera, e importante, etapa es la adición de un volumen de citrato de sodio (4% p/v) a un volumen de leche fermentada con lo que se consigue una buena homogenización inicial y ruptura de la matriz de agregados de caseína de la muestra. Después de una correcta homogenización (4 ciclos de 30 s en homogeneizador de placas), y tras recuperar el pellet celular después de un paso de centrifugación, se procede a la ruptura de las células bacterianas mediante lisis mecánica (sistema FastPrep) con una mezcla de fenol-cloroformo, SDS y perlas de zirconio-sílice. Se favorece la limpieza de la muestra con un segundo paso de extracción con cloroformo. A partir de este punto, para conseguir una buena calidad e integridad en el ARN se acopla al protocolo un paso de purificación de ARN bacteriano mediante un kit de extracción en columna ("RNase mini-kit", Qiagen) al que se añade un tratamiento adicional (al propio del kit) con *DNaseI* para eliminar posible restos de ADN genómico. Tras este protocolo en material genético asilado (ARN total) se puede almacenar a -80°C hasta su uso para estudios de expresión génica basados en qPCR.

En el presente trabajo la idoneidad del método se constató en muestras de leches fermentadas con dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis*, una de las cuales produce EPS que generan una textura y viscosidad en el producto fermentado que dificulta el proceso de extracción. El ARN se extrajo con éxito de ambos tipos de muestras, de forma reproducible, así como en cantidad y calidad suficientes para llevar a cabo estudios de expresión de los genes de referencia *recA* y *tuf*. Este método de extracción es probablemente extrapolable (previa adaptación) para la obtención de material genético de origen bacteriano (Gram-positivos) de leche fermentada con otro tipo de fermentos.

No hay muchos protocolos descritos en la bibliografía para la extracción de ARN a partir de productos lácteos. La mayoría están enfocados en el estudio de expresión génica microbiana en quesos para lo que, en general, se requiere la separación previa de la células microbianas (Ulve y cols, 2008; De Jong y cols, 2013). A diferencia de los métodos anteriores, nuestro protocolo no requiere purificación previa de las bacterias; uno de los pasos clave es utilizar un volumen suficiente de producto para conseguir una correcta destrucción y homogeneización de los agregados de caseína que faciliten la liberación de las bacterias atrapadas a esta matriz. Posteriormente, se utiliza un volumen pequeño del homogeneizado (1 ml) para la extracción tal y como han descrito otros autores (Calles y cols, 2010). La ventaja de nuestro protocolo es que se puede extraer ARN, en concentración suficiente, de muy buena calidad y libre de contaminaciones, a partir de leches fermentadas con mayor viscosidad y textura que las leches más fluidas utilizadas por estos autores (Calles y cols, 2010).

4.3. Expresión de genes eps de *B. animalis* subsp. *lactis* en leche fermentada

Para validar el método anteriormente descrito llevamos a cabo un estudio de expresión de genes implicados en la síntesis de EPS en *B. animalis* subsp. *lactis* mediante la técnica qPCR. Como genes diana elegimos *cpsD* y *rfbP* que codifican sendas “priming-GTF”, las glicosiltransferasas (“galactosyltransferase” y “undecapreyl-phosphate sugar phosphotransferase”, respectivamente) que llevarían a cabo la primera reacción en la síntesis de EPS en esta especie (ver Figura 5). Otro de los parámetros que se barajó para este estudio fue la fuente nitrogenada con la que se suplementó la leche para favorecer el crecimiento y actividad metabólica de las dos bifidobacterias en estudio. El objetivo fue determinar si esta fuente de nitrógeno podría influir en la expresión de estos dos genes en las cepas.

Se llevaron a cabo dos fermentaciones independientes por cepa (sección 3.2.) a partir de leche pasteurizada suplementada con extracto de levadura, o casitona (hidrolizado de caseína) ácida o casitona enzimática. Se procedió a la extracción del material genético (por duplicado) de la leche recién inoculada (tiempo fermentación 0 h) y de la leche fermentada (tras 18 h de incubación) siguiendo el protocolo optimizado descrito en el apartado anterior. En la Tabla 8 y Figura 14 se muestran tanto la cantidad como la calidad de ARN extraído.

Tabla 8. Concentración y ratio 260/280 del ARN extraído de dos puntos de muestreo (0 h y 18 h) a partir de dos fermentaciones independientes de leche, suplementada con tres fuentes de nitrógeno distintas, llevadas a cabo con las cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* en estudio.

Cepa	Tiempo (h)	Fuente nitrogenada	F*	Concentración		Ratio	
				ng/μl	ng/μl**	260/280	260/280**
A1	0	-	1	658,9	286,6	2,03	2,08
			2	1463	616,4	2,06	2,02
A1dOxR	0	-	1	683,6	269,6	1,9	1,97
			2	1199,7	494	2,03	2,01
A1	18	Extracto de levadura	1	427,3	177,8	1,73	1,83
			2	948,2	324,6	1,996	2,03
	18	Casitona enzimática	1	370,3	169,9	1,73	1,853
			2				
	18	Casitona ácida	1	323	139,2	1,74	1,78
			2	845	337,4	1,97	2,01
A1dOxR	18	Extracto de levadura	1	415,1	154,7	1,73	1,82
			2	284,5	109,1	1,8	1,92
	18	Casitona enzimática	1	356,7	150,9	1,70	1,82
			2	351,6	124	1,70	1,82
	18	Casitona ácida	1	356,6	147,8	1,71	1,83
			2	524,1	301	1,89	2,02

* F= fermentación; ** cambios en concentración de ARN y ratio 260/280 debidos al tratamiento con DNAsI

Alimentos probióticos: expresión génica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en leche fermentada

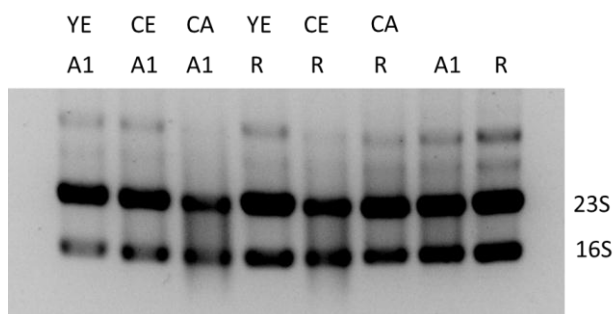


Figura 14. Gel de 1% agarosa con lejía (2%) para la comprobación de la integridad de los ARN extraídos de muestras correspondientes a la Fermentación 1. Calles 1 a 6: muestras de 18 h; Calles 7 y 8: muestras de 0 h. Cepas A1 y R (= A1dOxR). YE: leche suplementada con extracto de levadura; CE: leche suplementada con casitona enzimática; CA: leche suplementada con casitona ácida.

Tras llevar a cabo la transcripción reversa (a partir de 1 µg de ARN) se procedió al estudio de la expresión relativa de los genes *cpsD* y *rfbP*, usando el gen *recA* como calibrador (gen de referencia). La expresión relativa se calculó usando el protocolo $2^{-\Delta\Delta ct}$ en el que, para cada cepa y sustrato nitrogenado, los datos de expresión de los genes *eps* se relativizó a la expresión del gen *recA* (Δct) para las muestras obtenidas a 0 h y a 18h y, finalmente, los datos relativos de 18 h se refirieron a los obtenidos a las 0 h ($\Delta\Delta ct$). Se llevó a cabo un análisis estadístico (ANOVA de una vía y, cuando fue necesario, el test MDS de comparación de medias) para analizar los datos de expresión relativa realizándose diversas comparaciones cuyos resultados se muestran a continuación.

Para cada cepa se compararon los resultados de expresión relativa de los genes obtenidos en leches suplementadas con tres sustratos nitrogenados (Tabla 9).

Tabla 9. Datos (media \pm desviación estándar) de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta ct}$) de los genes de las “*priming-glycosyltransferasas*” *CpsD* y *RfbP* en dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* crecidas durante 18 h en leche pasteurizada. Los datos se relativizaron a la expresión constitutiva del gen de referencia *recA* y se refirieron a los niveles de expresión obtenidos al tiempo 0 de inicio de fermentación. Para cada cepa se compararon los resultados obtenidos en leches suplementadas con tres fuentes de nitrógeno distintas, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un vía (en negrita se muestra el p-valor y en azul el valor que resultó significativo).

Cepas	Fuentes nitrogenadas	Media \pm DE (n \leq 8) [#]	
		Gen <i>cpsD</i>	Gen <i>rfbP</i>
A1	Extracto levadura	3,21 \pm 1,37	1,78 \pm 1,53
	Casitona enzimática	2,33 \pm 0,57	0,45 \pm 0,04
	Casitona ácida	2,68 \pm 0,83	1,61 \pm 1,23
		p=0,369	p=0,231
A1dOxR	Extracto levadura	8,97 \pm 5,19	1,64 \pm 1,28 ^b
	Casitona enzimática	5,74 \pm 2,12	0,98 \pm 0,46 ^{ab}
	Casitona ácida	5,73 \pm 2,74	0,43 \pm 0,09 ^a
		p=0,141	p=0,021

[#] Para los datos en los que se detectaron diferencias significativas en el ANOVA, se llevó a cabo una comparación de medias mediante el test DMS (diferencia menor significativa) con un nivel de confianza $p < 0,05$. En este caso, las medias que no comparten el mismo subíndice son estadísticamente significativas.

El resultado del análisis de varianza no mostró evidencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) debidas al tipo de leche empleada, salvo en el caso de la cepa A1dOxR para el gen *rfbP* cuya expresión fue

significativamente diferente en los tres sustratos. El test de comparación de medias MDS (a un nivel de significación $p < 0,05$) mostró que el nivel de expresión de este gen fue mayor en leche suplementada con extracto de levadura que el observado en leche con casitona ácida, mientras que en leche suplementada con digerido enzimático de caseína los niveles fueron intermedios entre ambos sustratos.

Por otro lado, dentro de cada tipo de leche se comparó la posible expresión diferencial de los genes en estudio entre las cepas A1 y A1dOxR (Tabla 10). En general, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas cepas en los tres tipos de sustrato analizados, con excepción del gen *rfbP* en leche suplementada con extracto de levadura para el que no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas. Además se observó que cuando las diferencias fueron significativas la expresión del gen *cpsD* genes fue superior en la cepa A1dOxR, productora del EPS ropy, que en la cepa A1. En el caso del gen *rfbP* no se detectaron diferencias entre las cepas en leche con extracto de levadura, mientras que se obtuvieron resultados opuestos cuando se utilizó digerido de caseína ácido o enzimático. Estos resultados sugieren que la cepa A1dOxR podría ser capaz de sintetizar EPS en leche o, al menos, producir mayor cantidad de EPS que la cepa A1, siendo el gen *cpsD* el que se estaría expresando mayoritariamente. Esta hipótesis debería de ser confirmada con estudios adicionales de expresión y también demostrando la producción de EPS en el producto lácteo, procediendo para ello al aislamiento y caracterización físico-química de los polímeros en las leches fermentadas con las dos cepas en estudio.

Tabla 10. Datos (media \pm desviación estándar) de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los genes de las “*priming-glycosyltransferases*” CpsD y RfbP en dos cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* crecidas durante 18 h en leche pasteurizada. Los datos se relativizaron a la expresión constitutiva del gen de referencia *recA* y se refirieron a los niveles de expresión obtenidos al tiempo 0 de inicio de fermentación. Para cada tipo de leche, suplementada con fuentes de nitrógeno distintas, se compararon los resultados obtenidos en cada cepa mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un vía (en negrita se muestra el p-valor y en azul el valor que resultó significativo).

Fuentes nitrogenadas	Cepas	Media \pm DE (n \leq 8)	
		Gen <i>cpsD</i>	Gen <i>rfbP</i>
Extracto levadura	A1	3,21 \pm 1,37	1,78 \pm 1,53
	A1dOxR	8,97 \pm 5,19 p= 0,009	1,64 \pm 1,28 p=0,845
Casitona enzimática	A1	2,33 \pm 0,57	0,45 \pm 0,04
	A1dOxR	5,74 \pm 2,12 p=0,011	0,98 \pm 0,46 p=0,048
Casitona ácida	A1	2,68 \pm 0,83	1,61 \pm 1,23
	A1dOxR	5,73 \pm 2,74 p=0,010	0,43 \pm 0,10 p=0,017

Son escasos los trabajos que referencian la expresión de genes *eps* en el género *Bifidobacterium* y, hasta el momento, no se encuentran datos en la literatura sobre dicha expresión de cepas en fermentaciones lácteas. Respecto a la expresión de los genes *cpsD* y *rfbP* de las cepas estudio, hay algunas referencias que indican que ambos genes se expresan, en condiciones de laboratorio, cuando las cepas crecen en MRSC (Hidalgo-Cantabrana y cols, 2013). Además, se sabe que en presencia de concentraciones crecientes de bilis el gen *rfbP* aumenta su expresión, aunque no está tan clara esta relación para el gen *cpsD* (Ruas-Madiedo y cols, 2009). Estos resultados indican que la bilis promueve la síntesis de EPS por *B. animalis* subsp en. *lactis* probablemente como un mecanismo de protección frente a un compuesto tóxico y esta es una característica de especial interés para que estas cepas pudieran sobrevivir al tránsito gastrointestinal.

Finalmente, respecto a las características físico-químicas de los EPS sintetizados por estas cepas en medio MRSC, se ha descrito en artículos previos que la masa molar del EPS sintetizado por la cepa A1dOxR es considerablemente mayor que el de la cepa A1 (Ruas-Madiedo y cols, 2010). Además, el polímero de la cepa A1dOxR presenta fracciones de distinta masa molar y se ha determinado la estructura de la unidad repetida del polímero de alto peso molecular ($\sim 1 \times 10^6$ Da). Esta fracción tiene un alto contenido en ramnosa (50%) y representa más del 50% del polímero total sintetizado por A1dOxR (Leivers y cols, 2011). En nuestro estudio no hemos demostrado que estas cepas son capaces de producir EPS durante la fermentación láctea. Sin embargo, la consistencia y textura visual de la leche fermentada con la cepa "ropy", así como la dificultad para centrifugar el homogeneizado en citrato sódico, sugieren que al menos la cepa A1dOxR está sintetizando EPS en leche. Por tanto, en estudios futuros sería interesante determinar esta capacidad, bien midiendo la viscosidad de las leches fermentadas y/o aislando directamente el EPS tras la fermentación, lo que nos permitiría estudiar su composición química y su masa molar.

5. Conclusiones

- [1] Las cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A1 y A1dOxR fueron capaces de crecer en leche pasteurizada suplementada con distintas fuentes de nitrógeno produciéndose un incremento en los recuentos, tras 18 horas de fermentación, de aproximadamente una unidad logarítmica. La cepa A1dOxR alcanzó recuentos significativamente más altos que la cepa A1 en los tres tipos de leches fermentadas.
- [2] Las curvas de acidificación de la leche, independientemente del sustrato nitrogenado considerado, fueron similares para las dos cepas alcanzándose al mismo tiempo de fermentación valores de pH finales en torno a 4,1. Sin embargo las curvas de acidificación de la leche en relación a los sustratos nitrogenados, independientemente de la cepa de bifidobacteria considerada, fueron diferentes. Ambas cepas acidificaron más rápidamente la leche en presencia de extracto de levadura, seguido de casitona ácida y en último término de casitona enzimática.
- [3] Hemos optimizado un protocolo para la extracción de ARN de cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* crecidas en leche suplementada con extracto de levadura. El primer paso de homogenización con un volumen de citrato sódico al 4%, así como un paso adicional de tratamiento con *DNasaI*, han permitido obtener rendimientos de extracción de ARN entre 0,1 a 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con una calidad óptima (ratio 260/280 aproximadamente 2). Este protocolo nos ha permitido extraer ARN de leches fermentadas inicialmente suplementadas con otras fuentes nitrogenadas.
- [4] La expresión relativa de los genes *cpsD* y *rfbP*, implicados en la síntesis de exopolisacáridos en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, fue similar en los tres tipos de leches fermentadas para las tres cepas, aunque el extracto de levadura favoreció la expresión del gen *rfbP* en la cepa A1dOxR.
- [5] La expresión relativa del gen *cpsD* en leches fermentadas, independientemente del sustrato nitrogenado utilizado, fue significativamente mayor en la cepa A1dOxR que en la cepa A1 lo que sugiere que este gen podría ser funcional en el ambiente lácteo, hecho que quedaría por confirmar en estudios posteriores de aislamiento y caracterización del polímero.
- [6] El método de extracción a ARN que hemos optimizado en este estudio podría ser extrapolado para el estudio de expresión génica de otras especies de bifidobacterias capaces de fermentar leche suplementada con distintos sustratos nitrogenados.

6. Bibliografía

- AZNAR, R., DUEÑAS, T., JIMÉNEZ, R., LÓPEZ, P. y RUAS-MADIEDO, P., 2012. Exopolisacáridos de bacterias lácticas, ¿me quieren o no me quieren? (http://redbal.iata.csic.es/sabias_que.php)
- BÄCKHED, F., LEY, R.E., SONNENBURG, J.L., PETERSON, D.A. and GORDON, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, **307**(5717), pp. 1915-1920.
- BIAVATI, B., VESCOVO, M., TORRIANI, S. and BOTTAZZI, V., 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, **50**(2), pp. 117-131.
- BIAVATI, B. and MATTARELLI, P., 2006. The family *Bifidobacteriaceae*. *Prokaryotes* **3**, pp. 322–382 (doi: 10.1007/0-387-30743-5_17)
- CALLES-ENRÍQUEZ, M., LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M.C. and ALVAREZ, M.A., 2010. Extraction of RNA from fermented milk products for in situ gene expression analysis. *Analytical Biochemistry*, **400**(2), pp. 307-309.
- CASAROTTI, S.N., MONTEIRO, D.A., MORETTI, M.M.S. and PENNA, A.L.B., 2014. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, **59**, pp. 67-75.
- CERNING, J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le Lait*, **75**(4-5), pp. 463-472.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L. and COLLINS, J.K., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, **26**(5), pp. 333-337.
- DEGEEST, B. and DE VUYST, L., 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(7), pp. 2863-2870.
- DEGEEST, B., VANINGELGEM, F. and DE VUYST, L., 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**(9), pp. 747-757.
- DESJARDIN, L.E., CHEN, Y., PERKINS, M.D., TEIXEIRA, L., CAVE, M.D. and EISENACH, K.D., 1998. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(7), pp. 1964-1968.
- DE JONG, A., HANSEN, M.E., KUIPERS, O.P., KILSTRUP, M. and KOK, J., 2013. The Transcriptional and Gene Regulatory Network of *Lactococcus lactis* MG1363 during Growth in Milk. *PLoS ONE*, **8**(1), e53085 (doi:10.1371/journal.pone.0053085).
- DOCUMENTOS Técnicos de Salud Pública nº 106. Composición de vitaminas en la leche de vaca y sus variantes fermentadas. *Sistema de Información para la Sanidad Ambiental e Higiene Alimentaria de la Comunidad de Madrid* (www.publicaciones-isp.org).
- DUBOC, P. and MOLLET, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, **11**(9), pp. 759-768.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Nutrition Paper No .85* (ISSN 0254-4725).

- FESNAD, *Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética*, 2013. Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. (http://www.fesnad.org/pdf/consenso_cientifico_FESNAD_2013.pdf).
- GOMES, A.M.P. and MALCATA, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, **10**(4-5), pp. 139-157.
- GUARNER, F. and MALAGELADA, J., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**(9356), pp. 512-519.
- HASLBERGER, A.G., 2000. Monitoring and labeling for genetically modified products. *Science*, **287**(5452), pp. 431-432.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., SÁNCHEZ, B., MILANI, C., VENTURA, M., MARGOLLES, A. and RUAS-MADIEDO, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**(1), pp. 9-18.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., SÁNCHEZ, B., MOINE, D., BERGER, B., REYES-GAVILÁN, C.G., GUEIMONDE, M., MARGOLLES, A. and RUAS-MADIEDO, P., 2013. Insights into the ropy phenotype of the exopolysaccharide-producing strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A1dOxR. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(12), pp. 3870-3874.
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G.R., MERENSTEIN, D.J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R.B., FLINT, H.J., SALMINEN, S., CALDER, P.C. and SANDERS, M.E., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (advance online publication 10 June 2014; doi:10.1038/nrgastro.2014.66).
- LAWS, A.P. and MARSHALL, V.M., 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**(9), pp. 709-721.
- LEE, Y. and SALMINEN, S., 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, **6**(7), pp. 241-245.
- LEIVERS, S., HIDALGO-CANTABRANA, C., ROBINSON, G., MARGOLLES, A., RUAS-MADIEDO, P. and LAWS, A.P., 2011. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative *eps* cluster. *Carbohydrate Research*, **346**(17), pp. 2710-2717.
- LEROY, F. and DE VUYST, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, **15**(2), pp. 67-78.
- LIVAK, K.J. and SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**, pp. 402-408.
- MARTÍNEZ, N., MARTÍN, M.C., HERRERO, A., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A. and LADERO, V., 2011. QPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science and Technology*, **22**(7), pp. 367-376.
- MATTILA-SANDHOLM, T., BLUM, S., COLLINS, J.K., CRITTENDEN, R., DE VOS, W., DUNNE, C., FONDÉN, R., GRENOV, G., ISOLAURI, E., KIELY, B., MARTEAU, P., MORELLI, L., OUWEHAND, A., RENIERO, R., SAARELA, M., SALMINEN, S., SAXELIN, M., SCHIFFRIN, E., SHANAHAN, F., VAUGHAN, E. and VON WRIGHT, A., 1999. Probiotics: Towards demonstrating efficacy. *Trends in Food Science and Technology*, **10**(12), pp. 393-399.

- MAYO, B., DELGADO, S., RODRÍGUEZ, J.M. and GUEIMONDE, M., 2008. Old and new facts of probiotics: Where we are and where we are going. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, **3**, No. 055 (doi: 10.1079/PAVSNNR20083055).
- MARGOLLES, A., MAYYO, P., and RUAS-MADIEDO, P., 2009. "Screening, identification and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains" EN: *Handbook of probiotics and prebiotics*. Y.E. Lee & S. Salminen (eds.) *John Wiley & Sons, Inc.* (ISBN: 978-0-470-13544-0) Pp. 4-24.
- NORMA del CODEX para leches fermentadas: CODEX STAN 243-2003. *CODEX ALIMENTARIUS: Leche y Productos lácteos*. 2ª Edición. FAO y OMS, Roma 2011. ISBN 978-92-5-305837-2.
- REAL Decreto 179/2003 de 14 de febrero por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado No. 42 de 18 de febrero de 2003* (Pp. 6448- 6450).
- REAL Decreto 271/2014 de 11 de abril por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado No. 102 de 28 de abril de 2014* (Pp. 33154- 33157).
- REAL-TIME PCR Handbook, Life Technologies™.
http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf.
- RUAS-MADIEDO, P., HUGENHOLTZ, J. and ZOON, P., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **12**(2-3), pp. 163-171.
- RUAS-MADIEDO, P., ABRAHAM, A., MOZZI, F. and de los REYES-GAVILÁN, C.G. 2008 "Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria" EN: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. B. Mayo, P. López and G. Pérez-Martínez, (eds.) *Research Signpost Publishers, India*. (ISBN: 978-81-308-0250-3), Pp. 137-166.
- RUAS-MADIEDO, P., GUEIMONDE, M., ARIGONI, F., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. and MARGOLLES, A., 2009. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(4), pp. 1204-1207.
- RUAS-MADIEDO, P., SALAZAR N., and de los REYES-GAVILÁN, G.C. 2009. "Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria" EN: *Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends*. M. Ullrich (ed.) *Caister Academic Press, Norfolk, UK*. (ISBN: 978-1-904455-45-5) Pp. 279-310.
- RUAS-MADIEDO, P., MEDRANO, M., SALAZAR, N., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G., PÉREZ, P.F. and ABRAHAM, A.G., 2010. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of applied microbiology*, **109**(6), pp. 2079-2086.
- RUAS-MADIEDO, P., GUEIMONDE, M., MARGOLLES, A. and G. DE LOS REYES, C. 2014. Leches fermentadas, aspectos de seguridad y salud. Grupo "Probióticos y Prebióticos". *Tecnifood*, **Junio**, pp. 49-51.
- SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y. and LEE, Y.K., 1999. Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, **10**(3), pp. 107-110.
- SÁNCHEZ, B., RUIZ, L., GUEIMONDE, M., RUAS-MADIEDO, P. and MARGOLLES, A., 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research*, **69**(1), pp. 127-136.
- SCARDOVI, V. and TROVATELLI, L.D., 1965. Fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annals of Microbiology*, **15**, pp. 19-29.
- SGOURAS, D., MARAGKOUKAKIS, P., PETRAKI, K., MARTINEZ-GONZALEZ, B., ERIOTOU, E., MICHPOULOS, S., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. and MENTIS, A., 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of

Helicobacter pylori by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1), pp. 518-526.

SOMMER, F. and BÄCKHED, F., 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, **11**(4), pp. 227-238.

STANTON, C., GARDINER, G., MEEHAN, H., COLLINS, K., FITZGERALD, G., LYNCH, P.B. and ROSS, R.P., 2001. Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**(2), pp. 476S-483S.

TAMIME, A.Y., y ROBINSON R.K.,. 1991. *Yogur: ciencia y tecnología*. Ed. Acribia, Zaragoza.

TECNIFOOD, 2014 "Derivados lácteos, el futuro, a la baja, se debate entre el placer y la salud (Nota Editorial) *Tecnifood*, **Junio**, pp. 37-41.

ULVE, V.M., MONNET, C., VALENCE, F., FAUQUANT, J., FALENTIN, H. and LORTAL, S., 2008. RNA extraction from cheese for analysis of in situ gene expression of *Lactococcus lactis*. *Journal of applied microbiology*, **105**(5), pp. 1327-1333.

WANG, K., LI, S., LIU, C., PERNG, D., SU, Y., WU, D., JAN, C., LAI, C., WANG, T. and WANG, W., 2004. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, **80**(3), pp. 737-741.

WGO 2011. World Gastroenterology Organization practice guideline: Probiotics and Prebiotics (<http://www.worldgastroenterology.org/>).

Símbolos y Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico *complementario*

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico *mensajero*

BAL: Bacterias Lácticas

CpsD: “Galactosyl transferase”

Ct: Ciclo umbral

EDTA: Etilendiaminotetraacético

EPS: Exopolisacáridos

FESNAD: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética

FAO: “Food and Agriculture Organization”

GTF: Glicosiltransferasa

HePS: Heteropolisacáridos

HoPS: Homopolisacáridos

ISAPP: Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos

MRSC: medio “Mean, Rogosa and Sharpe” con Cisteína

OMG: Organismo modificado genéticamente

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RfbP: “Undecaprenyl-phosphate sugar phosphotransferase”

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real con retro-transcripción

WHO: “World Health Organization”

APÉNDICE

Datos de expresión relativa de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* A1 para el gen *cpsD* utilizando como gen de referencia *recA*

Fermentación	Fuente nitrogenada	dilución	0 h		18 h	
			Δct (<i>recA</i>)	Δct (<i>recA</i>)	$\Delta\Delta ct$ (<i>recA</i> / 0h)	$2^{-\Delta\Delta ct}$
1	Extracto de levadura	1/2	3,3	2,6	-0,7	1,62
		1/4	4,2	2,6	-1,55	2,94
		1/8	3,7	2,6	-1,05	2,07
		1/16	3,8	2,7	-1,03	2,04
2		1/2	3,1	1,1	-1,97	3,91
		1/4	3,2	0,9	-2,31	4,97
		1/8	3,3	0,0	-2,38	5,23
		1/16	2,7	1,1	-1,53	2,89
1	Casitona enzimática	1/2	3,3	2,5	-0,74	1,68
		1/4	4,2	2,6	-1,59	3,01
		1/8	3,7	2,5	-1,06	2,09
		1/16	3,8	2,4	-1,32	2,50
2		1/2	3,1			
		1/4	3,2			
		1/8	3,3			
		1/16	2,7			
1	Casitona ácida	1/2	3,3	2,5	-0,79	1,73
		1/4	4,2	2,5	-1,60	3,05
		1/8	3,7	2,8	-0,81	1,76
		1/16	3,8	2,4	-1,27	2,41
2		1/2	3,1	1,5	-1,56	2,91
		1/4	3,2	1,2	-2,02	4,07
		1/8	3,3	1,6	-1,76	3,41
		1/16	2,7	1,6	-1,04	2,05

Datos de expresión relativa de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* A1dOxR para el gen *cpsD* utilizando como gen de referencia *recA*

Fermentación	Fuente nitrogenada	dilución	0 h		18 h	
			$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\Delta\text{ct} (recA/ 0h)$	$2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$
1	Levadura	1/2	4,8	2,5	-2,33	5,04
		1/4	4,5	2,4	-2,13	4,40
		1/8	4,4	2,4	-1,95	3,88
		1/16	4,2	2,4	-1,80	3,50
2	Levadura	1/2	4,6	0,6	-3,94	15,42
		1/4	4,8	1,0	-3,83	14,27
		1/8	4,7	1,0	-3,67	12,75
		1/16	4,7	1,0	-3,64	12,48
1	Enzimática	1/2	4,8	2,7	-2,15	4,44
		1/4	4,5	2,6	-1,90	3,73
		1/8	4,4	1,4	-2,98	7,91
		1/16	4,2	3,2	-1,03	2,05
2	Enzimática	1/2	4,6	1,6	-2,91	7,52
		1/4	4,8	1,9	-2,87	7,32
		1/8	4,7	2,1	-2,57	5,96
		1/16	4,7	1,9	-2,81	7,01
1	Ácida	1/2	4,8	2,8	-2,01	4,05
		1/4	4,5	3,1	-1,36	2,57
		1/8	4,4	3,1	-1,22	2,33
		1/16	4,2	2,2	-2,09	4,26
2	Ácida	1/2	4,6	1,8	-2,78	6,89
		1/4	4,8	1,6	-3,22	9,32
		1/8	4,7	1,7	-3,01	8,10
		1/16	4,7	1,6	-3,04	8,23

Datos de expresión relativa de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* A1 para el gen *rfbP* utilizando como gen de referencia *recA*

Fermentación	Fuente nitrogenada	dilución	0 h		18 h	
			$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\Delta\text{ct} (recA/ 0h)$	$2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$
1	Extracto de levadura	1/2	1,9	3,4	1,47	0,35
		1/4	2,1	3,5	1,43	0,36
		1/8	2,0	3,5	1,48	0,35
		1/16	2,1	3,4	1,22	0,42
2		1/2	2,8	1,4	-1,38	2,60
		1/4	2,8	1,2	-1,58	3,00
		1/8	3,0	1,2	-1,85	3,61
		1/16	2,7	0,9	-1,80	3,48
1	Casitona enzimática	1/2	1,9	3,3	1,34	0,39
		1/4	2,1	3,2	1,15	0,44
		1/8	2,0	3,1	1,15	0,45
		1/16	2,1	3,1	0,99	0,50
2		1/2	2,8			
		1/4	2,8			
		1/8	3,0			
		1/16	2,7			
1	Casitona ácida	1/2	1,9	2,0	0,12	0,91
		1/4	2,1	2,0	-0,04	1,02
		1/8	2,0	2,1	0,07	0,94
		1/16	2,1	2,1	-0,08	1,05
2		1/2	2,8	2,4	-0,44	1,36
		1/4	2,8	2,1	-0,65	1,57
		1/8	3,0	0,8	-2,20	4,6
		1/16	2,7	2,2	-0,49	1,40

Datos de expresión relativa de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* A1dOxR para el gen *rfbP* utilizando como gen de referencia *recA*

Fermentación	Fuente nitrogenada	dilución	0 h		18 h	
			$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\text{ct} (recA)$	$\Delta\Delta\text{ct} (recA/ 0h)$	$2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$
1	Levadura	1/2	2,2	3,1	0,86	0,54
		1/4	2,2	3,5	1,25	0,42
		1/8	2,0	3,3	1,33	0,39
		1/16	2,1	3,2	1,12	0,45
2	Levadura	1/2	1,5	-0,1	-1,69	3,24
		1/4	1,5	0,1	-1,45	2,73
		1/8	1,5	0,1	-1,44	2,71
		1/16	1,6	0,2	-1,36	2,58
1	Enzimática	1/2	2,2	3,1	0,90	0,53
		1/4	2,2	3,0	0,73	0,60
		1/8	2,0	2,9	0,88	0,54
		1/16	2,1	3,0	0,86	0,54
2	Enzimática	1/2	1,5	1,0	-0,50	1,4
		1/4	1,5	0,9	-0,55	1,46
		1/8	1,5	1,2	-0,27	1,21
		1/16	1,6	1,0	-0,58	1,49
1	Ácida	1/2	2,2	3,6	1,35	0,38
		1/4	2,2	3,7	1,44	0,36
		1/8	2,0	3,8	1,87	0,27
		1/16	2,1	3,3	1,24	0,42
2	Ácida	1/2	1,5	2,4	0,93	0,52
		1/4	1,5	2,6	1,11	0,462
		1/8	1,5	2,6	1,12	0,45
		1/16	1,6	2,4	0,78	0,58