



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado en Biotecnología Alimentaria

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del medio ambiente

**AISLAMIENTO Y DESARROLLO DE BACTERIAS
LÁCTICAS CAPACES DE HIDROLIZAR LOS
PEPTIDOS INMUNOTÓXICOS DEL GLUTEN**

Patricia Álvarez Sieiro

IPLA-CSIC

Tesis Doctoral

Oviedo, 2014





RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: AISLAMIENTO Y DESARROLLO DE BACTERIAS LÁCTICAS CAPACES DE HIDROLIZAR LOS PÉPTIDOS INMUNOTÓXICOS DEL GLUTEN 	Inglés: ISOLATION AND DEVELOPMENT OF LACTIC ACID BACTERIA THAT HYDROLYZE THE IMMUNOTOXIC PEPTIDES OF GLUTEN
2.- Autor	
Nombre: PATRICIA ÁLVAREZ SIEIRO 	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA 	
Órgano responsable: UNIVERSIDAD DE OVIEDO 	

RESUMEN (en español)

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inflamatoria de carácter autoinmune, que se produce tras la ingestión de gluten en individuos genéticamente predispuestos. Actualmente representa una de las enfermedades genéticas más comunes a nivel mundial, con una prevalencia de 1:100 personas en todo el mundo. Actualmente se conocen los principales péptidos del gluten responsables de la EC, son péptidos con un elevado porcentaje de residuos de prolina que les confieren una elevada resistencia a la proteólisis gastrointestinal, por lo que se acumulan en el lumen intestinal desencadenando la respuesta inmune. Entre ellos destaca un péptido de 33 aminoácidos (33-mer) proveniente de la α/β -gliadina, conocido por ser el péptido más inmunotóxico del gluten.

El único tratamiento disponible es seguir una estricta dieta libre de gluten durante toda la vida del paciente, por lo que es necesario y urgente el desarrollo de nuevas terapias alternativas o complementarias que mejoren la calidad de vida de los pacientes celíacos. Durante los últimos años, se han propuesto distintos tratamientos que se encuentran en diferentes fases de investigación. Entre estos se encuentra la terapia enzimática oral, que se basa en la administración de enzimas específicos capaces de degradar los péptidos del gluten en el tracto gastrointestinal (TGI). Se propuso el enzima protil endopeptidasa de *Myxococcus xanthus* (PEP *Mx*) y la de *Sphingomonas capsulata* (PEP *Sc*) como candidatas para la hidrólisis de los péptidos, sin embargo estos microorganismos no pueden ser incluidos en alimentos. Dado que las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos reconocidos como seguros, que forman parte de nuestra alimentación y de nuestra microbiota intestinal, junto al hecho de que poseen un sistema proteolítico muy extenso y variado, en la presente Tesis Doctoral propusimos utilizar BAL que sean capaces de hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten en el TGI, como terapia alternativa de la EC. Con el fin de alcanzar dicho objetivo se han seguido dos estrategias



diferentes, por un lado la búsqueda en nichos ecológicos variados de BAL silvestres capaces de hidrolizar el péptido 33-mer y por otro lado, la generación de BAL recombinantes que sinteticen enzimas específicos con capacidad demostrada de hidrolizar los péptidos del gluten.

I. Búsqueda de BAL capaces de degradar la gliadina y el péptido 33-mer

En primer lugar, se desarrolló un medio de cultivo que contiene gliadina como única fuente de nitrógeno (AHG-M), que permitió seleccionar en muestras complejas bacterias capaces de hidrolizar la gliadina. A continuación, con el objetivo de obtener BAL con actividad gliadinasa, se realizaron cribados en 12 muestras diferentes: 10 muestras de masas de harina fermentada y 2 muestras de contenido ruminal bovino. Las muestras se homogeneizaron y se sembraron en medio AHG-M, obteniendo un total de 325 colonias capaces de crecer en un medio que contiene gliadina como única fuente de nitrógeno, de las cuales 65 producían un halo claro alrededor de la colonia debido a la degradación de la gliadina. Estos 65 aislados se identificaron y se tipificaron molecularmente obteniendo 29 cepas de BAL diferentes capaces de crecer y formar halo en AHG-M, siendo 24 *Lactobacillus casei*, 1 *Lactobacillus plantarum* y 4 *Leuconostoc mesenteroides*. Se analizó la resistencia de las 29 cepas seleccionadas a varios antibióticos mediante la técnica de microdilución en caldo, obteniendo que la cepa de *L. plantarum* y 4 *L. casei* eran sensibles a todos los antibióticos ensayados. De las 4 cepas de *Ln. mesenteroides*, 2 fueron resistentes a clindamicina y otros 2 mostraron resistencia a ampicilina. Los 20 *L. casei* restantes fueron resistentes a cloranfenicol.

Con el objetivo identificar las posibles actividades enzimáticas implicadas en la hidrólisis de la gliadina, se cuantificaron seis actividades peptidasa: prolil endopeptidasa, prolidasa, endoproteasa, prolil iminopeptidasa y dipeptidil aminopeptidasa IV que son específicas para la hidrólisis de residuos de prolina, junto con la aminopeptidasa N. Todas las cepas analizadas presentaron actividad prolidasa, prolil iminopeptidasa y dipeptidil aminopeptidasa IV. Toda las cepas excepto un *Ln. mesenteroides* presentaron actividad aminopeptidasa N y en ninguna de las cepas se detectaron las actividades prolil endopeptidasa ni prolidasa. A continuación, se evaluó la capacidad de las cepas seleccionadas para hidrolizar el péptido 33-mer, obteniendo que 5 de las 29 cepas seleccionadas fueron capaces de degradar completamente el péptido en las condiciones ensayadas. Las cepas *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* IPLA12046 degradaron, tras 8 horas de incubación, el 80% y el 70% del péptido respectivamente, y además, fueron capaces de sobrevivir al paso por las condiciones del TGI simuladas *in vitro*.

Con el fin de identificar aquellas actividades que pudieran estar implicadas en la hidrólisis se secuenció el genoma de la cepa *L. casei* IPLA12038. A partir del análisis del genoma se identificaron 25 secuencias codificadoras para ADN (CDS)



que codifican peptidasas y 22 que codifican proteasas. Además, se identificaron 366 CDS que no se encuentran en el genoma de la cepa de referencia *L. casei* BL23, 284 de las cuales están anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida.

II. Generación de BAL recombinantes productoras de proil endopeptidasa

La segunda estrategia se basó en el desarrollo de BAL recombinantes que sinteticen PEP para hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten. A partir de la secuencia aminoacídica de la PEP *Mx* y de la PEP *Sc* se diseñaron genes sintéticos con el uso de codones adaptado al género *Lactobacillus*.

En primer lugar se construyeron dos cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*, *Lc. lactis* IPLA1509 y *Lc. lactis* IPLA1510, que expresan bajo el control del promotor inducible de la nisina los genes que codifican la PEP *Mx* y la PEP *Sc*, respectivamente. La cepa *Lc. lactis* IPLA1510 presentó una actividad PEP 4,4 veces más elevada que *Lc. lactis* IPLA1509, y fue capaz de hidrolizar, tras 24 horas de incubación, el 80% péptido 33-mer.

Por otro lado, mediante el uso de un sistema de integración de grado alimentario, se construyeron 4 cepas recombinantes de *L. casei* que poseen el gen que codifica la PEP integrado establemente en el cromosoma, bajo el control del promotor constitutivo del gen *apf* de *Lactobacillus crispatus*. Además, la fusión traduccional del péptido señal del gen *apf* en el extremo amino permitió la secreción de las proteínas al exterior celular. Mediante un proceso de depuración se eliminaron las marcas de resistencia y el ADN de grado no alimentario del plásmido, manteniendo el estatus de grado alimentario de todas las cepas.

Dos de las cepas *L. casei* construidas sintetizan la PEP de *S. capsulata*. *L. casei* IPLA1504 la produce en el interior celular mientras que *L. casei* IPLA1507 la secreta al sobrenadante. Se ha descrito que PEP *Sc* es muy activa frente a los péptidos más pequeños del gluten, pero es incapaz de hidrolizar el péptido inmunotóxico 33-mer. La acción sinérgica de las actividades metabólicas del *L. casei* junto con el enzima PEP *Sc* permitió degradar el péptido 33-mer en las condiciones ensayadas. Además, la cepa *L. casei* IPLA1507 sobrevivió al paso por las condiciones del TGI simuladas *in vitro* y fue capaz de continuar secretando el enzima de manera activa.

Otras dos cepas de *L. casei* sintetizan la PEP de *M. xantus*. *L. casei* IPLA1503 la produce intracelularmente y *L. casei* IPLA1506 la secreta al exterior celular. Ambas cepas fueron capaces de hidrolizar el péptido 33-mer. En concreto, la cepa *L. casei* IPLA1506 degradó completamente el péptido 33-mer tras 12 horas de incubación sin generar productos de hidrólisis. Además, *L. casei* IPLA1506 sobrevivió al paso por el TGI simulado *in vitro* y fue capaz de continuar secretando el enzima de manera activa. Por lo tanto, el *L. casei* actuó como vector, protegiendo al enzima de las condiciones gástricas que afectan a la estabilidad enzimática (pH bajo y pepsina) y asegurando su producción en el lugar de acción, el duodeno.



RESUMEN (en Inglés)

Celiac disease (CD) is an autoimmune inflammatory enteropathy caused by the ingestion of gluten proteins in genetically predisposed individuals. Nowadays, CD is one of the most common genetic diseases worldwide and its prevalence has been estimated to be approximate 1%. The gluten proline-rich peptides are resistant to gastrointestinal digestion and they persist in the gut lumen, where they can trigger the immune response. The 33-residue gluten peptide (33-mer) derived from α/β -gliadin is the most immunotoxic peptide of the gluten.

The only treatment currently available for CD is a strict long-life gluten-free diet, therefore alternative treatments for CD are urgently needed to increase the quality of life of these patients. In the last years, novel non-dietary therapies have been proposed and they are in different stages of development. For instance, the oral gluten detoxification aims to degrade the immunotoxic gluten peptides during the digestive process by oral administration of specific enzymes. The prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus* (PEP *Mx*) and the PEP from *Sphingomonas capsulata* (PEP *Sc*) have been proposed as candidates to hydrolyze the gluten peptides, however those bacteria cannot be included in food. Since lactic acid bacteria (LAB) are safe microorganisms, they are part of the human intestinal microbiota and they have a broad and diverse proteolytic system, in this Thesis we have proposed to use LAB that hydrolyze the immunotoxic gluten peptides into the gastrointestinal tract, as an alternative therapy for CD. In order to achieve this goal two different approaches have been followed: the screening of LAB strains able to degrade the 33-mer peptide from diverse environments and the construction of LAB strains harboring genes encoding enzymes, which are known to hydrolyze these immunotoxic peptides.

I. Screening of LAB strains that degrade the gliadin and the 33-mer peptide

First, a minimal medium containing gliadin as nitrogenous source has been developed (AHG-M). Then, in order to obtain LAB with gliadinase activity, ten sourdough samples and two ruminal content samples were screened. A total of 325 colonies able to grow in a medium which contains gliadin as the only nitrogenous source were obtained. Sixty five of them produced a clear halo around the colony due to the gliadin degradation. Identification and typification of those 65 isolates were carried out resulting in 29 different LAB strains: 24 *Lactobacillus casei*, 1 *Lactobacillus plantarum* and 4 *Leuconostoc mesenteroides*. The antibiotic resistance of these 29 LAB strains was tested using 8 different antibiotics. The broth microdilution technic showed that the *L. plantarum* and the 4 *L. casei* strains were sensitive to all the antibiotics tested. Two *Ln. mesenteroides* were clindamycin resistant and the other two were ampicillin resistant. The 20 remaining *L. casei* were chloramphenicol



resistant.

In order to identify the enzymatic activities involved in the gliadin hydrolysis, six peptidase activities were quantified: prolyl endopeptidase, prolidase, endoprotease, prolyl iminopeptidase, dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N. All the 29 assayed strains presented prolidase, prolyl iminopeptidase and dipeptidyl aminopeptidase IV activities. All the strains showed aminopeptidase N activity with the exception of one *Ln. mesenteroides* strain, and none of them showed prolyl endopeptidase or prolidase activities. Then the ability to degrade the 33-mer peptide was tested in the 29 selected strains. Five of them were able to fully hydrolyze the peptide under the assayed conditions. The strains *L. casei* IPLA12038 and *L. casei* IPLA12046 degraded, after 8 hours of incubation, 80% and 70% of the peptide respectively, and they were able to survive the *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions.

With the aim of identifying the potential activities involved in the peptide hydrolysis, the genome of the *L. casei* IPLA12038 strain was sequenced. The genome analysis revealed 25 coding DNA sequences (CDS) encoding peptidases and 22 CDS encoding proteases. In addition 366 CDS non present in the reference genome *L. casei* BL23 were identified. Among them, 284 CDS are annotated as hypothetical protein of unknown function.

II. Generation of PEP producing recombinant LAB strains

The second approach to obtain LAB strains able to degrade the immunotoxic gluten peptides was based on the use of synthetic biology techniques to obtain recombinant strains. The genes encoding the PEP *Mx* and PEP *Sc* proteins were synthesized based on the preferred codon usage of *Lactobacillus*. First, two *Lactococcus lactis* strains were constructed, *Lc. lactis* IPLA1509 and *Lc. lactis* IPLA1510, expressing the genes codifying PEP *Sc* and PEP *Mx* respectively, under the control of the inducible nisin promoter. The *Lc. lactis* IPLA1510 strain showed 4.4 times more PEP activity than *Lc. lactis* IPLA1509, and was able to hydrolyze 80% of the 33-mer peptide after 24 hours of incubation.

Another way to obtain recombinant strains was using a food-grade integration system. Four recombinant *L. casei* strains were built carrying a chromosome stable gene codifying the PEP protein, under the control of the constitutive promoter of *apf* gene from *Lactobacillus crispatus*. Besides, the translational fusion of the signal peptide of the *apf* gene allowed the secretion of the proteins outside the cells. Through a depuration process the antibiotic resistance marks and the non-food grade DNA of the vector were eliminated, maintaining the food-grade status of the strains.

From these four *Lactobacillus* recombinant strains, two *L. casei* synthesize the PEP *Sc*. *L. casei* IPLA1504 produces intracellular PEP *Sc* whereas *L. casei* IPLA1507



secretes PEP *Sc* outside the cell. PEP *Sc* degrades the small gluten peptides but is unable to hydrolyze the immunotoxic 33-mer peptide. The synergic action of several *L. casei* metabolic activities and PEP *Sc* enzyme were able to degrade the 33-mer peptide under the experimental conditions. Moreover, the *L. casei* IPLA1507 strain survived the *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions and continued secreting the active enzyme.

Two strains of *L. casei* that synthesize the PEP *Mx* were constructed. *L. casei* IPLA1503 produces intracellular PEP *Mx* whereas *L. casei* IPLA1506 secretes PEP *Mx* outside the cell. *L. casei* IPLA1506 degraded the whole 33-mer after 12 hours of incubation, and no degradation intermediates products were detectable. *L. casei* IPLA1506 survived the *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions and continued secreting the active enzyme. Therefore, *L. casei* worked as a vector, protecting the enzyme from the gastric conditions that affect its stability (low pH and pepsin) and assuring its production into the duodenum.

**SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE/
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

ÍNDICE

ÍNDICE

Lista de Figuras	i
Lista de Tablas	v
Lista de Abreviaturas	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. EL GLUTEN	1
1.1 Breve historia del trigo	1
1.2. ¿Qué es el gluten?	2
1.3 Las proteínas del trigo	2
1.3.1. <i>Las prolaminas</i>	3
1.3.1.1. <i>Las gliadinas</i>	4
1.3.1.2. <i>Las gluteninas</i>	5
1.4. Importancia y presencia del gluten en alimentos	6
1.5. Toxicidad del gluten	7
2. ENFERMEDAD CELÍACA (EC)	8
2.1. Definición: ¿Qué es la EC?	8
2.2. Historia de la EC	9
2.3. Epidemiología de la EC	9
2.4. Clínica de la EC	11
2.5. Etiología	12
2.5.1. <i>Factores genéticos</i>	12
2.5.2. <i>Factor ambiental desencadenante: El gluten</i>	13
2.5.3. <i>Otros factores ambientales</i>	15
2.5.4. <i>Bases moleculares de la EC</i>	16
2.6. Diagnóstico de la EC	18
2.7. Tratamiento de la EC	19
2.7.1. <i>Tratamiento actual</i>	19
2.7.2. <i>Terapias alternativas en desarrollo</i>	20

3. PROLIL ENDOPEPTIDASAS	23
3.1. Definición y concepto	23
3.2. Características generales	24
3.3. Distribución	25
3.4. Aplicación terapéutica en la EC	25
4. BATERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL)	27
4.1 Características generales y clasificación taxonómica	27
4.2 Sistema proteolítico	29
4.2.1. <i>Proteinasas</i>	29
4.2.2. <i>Sistemas de transporte de péptidos</i>	30
4.2.3. <i>Peptidasas</i>	31
4.3. Secuenciación masiva de genomas	33
4.4. Aplicaciones de las BAL	34
4.4.1. <i>Uso en alimentos fermentados</i>	34
4.4.1.1. <i>Los probióticos</i>	35
4.4.2. <i>Uso como factorías celulares</i>	36
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. MUESTRAS	41
2. CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	42
3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	46
3.1. Cultivo en fermentador	49
3.2. Inducción del promotor de la nisina A	49
4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS	50
5. RESISTENCIA AL PASO POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL	51
6. RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS	52
7. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)	53
7.1. Extracción de ADN plasmídico	53
7.2. Extracción de ADN genómico	53
7.3. Visualización de fragmentos en gel de agarosa	54
7.4. Purificación de fragmentos de ADN	54
7.5. Tratamientos enzimáticos del ADN	55
7.6. Transferencia de ADN a membranas e hibridación	55
7.6.1. <i>Transferencia de ADN a membranas o "Southern</i>	55

<i>blotting</i>	
7.6.2. <i>Marcaje de sondas</i>	55
7.6.3. <i>Hibridación</i>	56
7.7. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)	56
7.8. Análisis cluster	57
7.9. Electrotransformación	57
7.10. Reacción en cadena de la polimerasa	57
7.11. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias	58
7.12. Ensamblaje y análisis del genoma	59
7.13. Optimización del uso de codones	59
8. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	60
8.1. Ensayos enzimáticos	60
8.1.1. <i>Obtención de extractos celulares</i>	60
8.1.2. <i>Medida de actividad enzimática</i>	60
8.1.3. <i>Ensayos enzimáticos para determinar la actividad prolii endopeptidasa (PEP)</i>	61
8.1.4. <i>Ensayo de las actividades PepX, PepI, PepN y PepO</i>	62
8.1.5. <i>Ensayo de la actividad prolidasa Q (PepQ)</i>	62
8.1.6. <i>Ensayo de la actividad Pronasa</i>	62
8.2. Medida del contenido total de proteína	63
8.3. Precipitación de proteínas	63
8.4. Visualización de proteínas en gel de acrilamida	64
8.4.1. <i>Preparación de las muestras</i>	64
8.4.2. <i>Gel de acrilamida SDS-PAGE</i>	64
8.4.3. <i>Gel de acrilamida de Tricina (Tricina-SDS-PAGE)</i>	65
8.4.4. <i>Zimograma</i>	65
8.5. Técnicas cromatográficas	65
8.5.1. <i>Preparación de las muestras</i>	65
8.5.2. <i>Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)</i>	66
8.5.3. <i>Cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS)</i>	66
8.5.4. <i>Cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC)</i>	68

RESULTADOS

CAPÍTULO I: DESARROLLO DE UN MEDIO SELECTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD GLIADINASA	69
1. SOLUBILIZACIÓN DE LA GLIADINA	69
2. DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO, CON AHG COMO ÚNICA FUENTE DE NITRÓGENO	70
3. VALIDACIÓN DEL MEDIO AHG-M	71

3.1. Evaluación de AHG como sustrato enzimático	71
3.2. Evaluación del crecimiento de bacterias en AHG-M	73
3.3. Evaluación de AHG-M como medio de cultivo selectivo	74
3.1.3. Identificación y tipificación molecular de los aislados	75
3.2.3. Caracterización de las actividades gliadinasa mediante zimografía	76
CAPÍTULO II: BÚSQUEDA DE BAL CAPACES DE DEGRADAR LA GLIADINA	79
1. CRIBADO	79
1.1. Selección de las muestras	79
1.2. Recuento del número de viables	79
1.3. Selección de aislados	82
2. IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS SELECCIONADOS DURANTE EL CRIBADO	83
CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	89
1. TEST DE RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS	89
2. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA ACTIVIDAD GLIADINASA Y FENOTIPO DE CRECIMIENTO Y HALO EN AHG-M	91
3. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO	92
3.1. Hidrólisis del péptido 33-mer	93
4. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL DE <i>L. casei</i> IPLA12038 y <i>L. casei</i> IPLA12046	95
CAPÍTULO IV. SECUENCIACIÓN, ENSAMBLAJE Y ANÁLISIS DEL GENOMA DE LA CEPA <i>L. casei</i> IPLA12038	97
1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA	97
2. ANOTACIÓN	100
3. ANÁLISIS COMPARATIVO CON EL GENOMA DE LA CEPA <i>L. casei</i> BL23	103
CAPÍTULO V. GENERACIÓN DE <i>Lc. lactis</i> RECOMBINANTES CON ACTIVIDAD PEP	105
1. CONSTRUCCIÓN DE DOS PLÁSMIDOS BASADOS EN EL SISTEMA NICE PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PEP <i>Sc</i> Y PEP <i>Mx</i>	105
2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE <i>pepMx</i> EN LA CEPA <i>Lc. lactis</i> IPLA1510	108
2.1 Influencia de la concentración de nisina en la actividad PEP	108
2.2. Influencia del tiempo de inducción en la actividad PEP	108
3. VISUALIZACIÓN EN SDS-PAGE DE PEP <i>Mx</i>	109
4. CAPACIDAD DE <i>Lc. lactis</i> IPLA1510 PARA HIDROLIZAR EL PÉPTIDO 33-mer	110
CAPÍTULO VI. GENERACIÓN DE UN <i>L. casei</i> RECOMBINANTE DE GRADO	113

ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP <i>Mx</i> EXTRACELULARMENTE	
1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN <i>pepMx</i> EXTRACELULARMENTE	113
2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1506 EN EL CROMOSOMA DE <i>L. casei</i> BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO	116
3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE PEP <i>Mx</i>	117
4. EFECTO DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD PEP <i>Mx</i> EXTRACELULAR	118
5. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer	120
6. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL	122
CAPÍTULO VII. GENERACIÓN DE UN <i>L. casei</i> RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP <i>Mx</i> INTRACELULARMENTE	125
1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN <i>pepMx</i> INTRACELULARMENTE	125
2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1503 EN EL CROMOSOMA DE <i>L. casei</i> BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO	127
3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE PEP <i>Mx</i>	128
4. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer	129
CAPÍTULO VIII. GENERACIÓN DE UN <i>L. casei</i> RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP <i>Sc</i> EXTRACELULARMENTE	131
1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN <i>pepSc</i> EXTRACELULARMENTE	132
2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1507 EN EL CROMOSOMA DE <i>L. casei</i> BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO	133
3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE PEP <i>Sc</i>	134
4. EFECTO DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD PEP <i>Mx</i> EXTRACELULAR	134
5. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer	135
6. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL	136
CAPÍTULO IX. GENERACIÓN DE UN <i>L. casei</i> RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP <i>Sc</i> INTRACELULARMENTE	139
1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN <i>pepSc</i> INTRACELULARMENTE	139
2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1504 EN EL CROMOSOMA DE <i>L. casei</i> BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO	139
3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE PEP <i>Sc</i>	140
4. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer	141

DISCUSIÓN	143
1. BÚSQUEDA DE BAL SILVESTRES	144
1.1. Desarrollo de un medio de cultivo adecuado para seleccionar bacterias con actividad gliadinasas	144
1.2. Selección de muestras para la obtención de BAL capaces de hidrolizar la gliadina	147
1.2.1. <i>Masas fermentadas</i>	147
1.2.2. <i>Contenido ruminal bovino</i>	149
1.3. Caracterización de las cepas silvestres	150
1.3.1. <i>Seguridad de las cepas: Comprobando su resistencia a antibióticos</i>	150
1.3.2. <i>Sistema proteolítico: gliadinasas, peptidasas y degradación del 33-mer</i>	151
1.3.3. <i>Capacidad de las cepas L. casei IPLA12038 y L. casei IPLA12046 de sobrevivir bajo las condiciones simuladas del TGI</i>	153
1.3.4. <i>Análisis del genoma de L. casei IPLA12038</i>	154
2. GENERACIÓN DE BAL RECOMBINANTES	156
2.1 Sistemas de clonación	157
2.1.1. <i>Sistema NICE</i>	157
2.1.2. <i>Sistema de integración de grado alimentario</i>	158
3. PERSPECTIVAS DE FUTURO	163
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169
MATERIAL SUPLEMENTARIO	193

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1	Representación esquemática de la semilla de trigo.	2
Figura 2	Clasificación de los trastornos relacionados con el gluten.	7
Figura 3	Prevalencia mundial de la EC.	10
Figura 4	Modelo del iceberg de la EC.	12
Figura 5	El péptido inmunogénico 33-mer.	15
Figura 6	Representación esquemática de los mecanismos moleculares de la EC.	17
Figura 7	Representación esquemática de nuevas terapias alternativas para la EC.	22
Figura 8	Distribución de los principales géneros de BAL basada en el análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S.	28
Figura 9	Representación esquemática del sistema proteolítico de las BAL.	29
Figura 10	Representación esquemática de las proteinasas asociadas a la envoltura celular (PEC) de diferentes especies de BAL.	30

RESULTADOS

Figura 11	Análisis de las soluciones de gliadina.	70
Figura 12	Medio de cultivo con gliadina tratada con HCl (a) y sin tratar (b).	71
Figura 13	Análisis de la actividad pronasa con diferentes sustratos.	72
Figura 14	Comportamiento de diferentes cepas bacterianas en el medio AHG-M.	73
Figura 15	Dendrograma derivado del análisis PFGE de todos los aislados de <i>Bacillus</i> obtenidos en el cribado de la muestra de ensilado de trigo.	75
Figura 16	Zimograma SDS-PAGE con AHG como matriz.	77
Figura 17	Dendrograma derivado del análisis PFGE de las cepas obtenidas en el cribado de las 10 muestras de masas fermentadas.	85

Figura 18	Dendrograma derivado del análisis PFGE de las cepas de <i>L. casei</i> obtenidas en el cribado del contenido ruminal.	87
Figura 19	Niveles de actividad específica de PepN, PepQ, PepX y PepI para las 29 cepas de BAL seleccionadas.	93
Figura 20	Determinación del porcentaje de hidrólisis del péptido 33-mer.	94
Figura 21	Hidrólisis del péptido 33-mer por las cepas <i>L. casei</i> IPLA12038 (a) y <i>L. casei</i> IPLA12046 (b).	95
Figura 22	Supervivencia celular al estrés gástrico y gastrointestinal de las cepas <i>L. casei</i> IPLA12038 (A) y <i>L. casei</i> IPLA12046 (B).	96
Figura 23	Distribución de calidad a lo largo de las lecturas.	98
Figura 24	Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los plásmidos de <i>L. casei</i> IPLA12038 obtenidos mediante lisis alcalina.	98
Figura 25	Comparación de los genoma de <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. casei</i> IPLA12038 utilizando el software CONTIGuator y el ACT (Artemis Comparison Tool).	99
Figura 26	Alineamiento de los genomas de <i>L. casei</i> .	100
Figura 27	Clasificación por subsistemas del servidor RAST para la cepa <i>L. casei</i> IPLA12038.	101
Figura 28	Análisis BRIG de las cepas <i>L. casei</i> IPLA12038 y <i>L. casei</i> BL23.	104
Figura 29	Mapa génico de los plásmidos pUC57, pUC57- <i>pepSc</i> , pUC57- <i>pepMx</i> , pNZ8048, pIPLA1509 y pIPLA1510.	106
Figura 30	Actividad PEP de las cepas <i>Lc. lactis</i> IPLA1509 y <i>Lc. lactis</i> IPLA1510.	107
Figura 31	Efecto de la concentración de nisina en la expresión de PEP en la cepa <i>Lc. lactis</i> IPLA1510.	108
Figura 32	Influencia del tiempo de inducción en la expresión de PEP <i>Mx</i> en la cepa <i>Lc. lactis</i> IPLA1510.	109
Figura 33	Análisis Tricina-SDS-PAGE.	110
Figura 34	Hidrólisis del péptido 33-mer por <i>Lc. lactis</i> IPLA1510.	111
Figura 35	Esquema de los pasos realizados en la construcción del vector integrativo de expresión extracelular pIPLA1265.	115
Figura 36	Mapa genético del plásmido integrativo pIPLA1506.	116
Figura 37	Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y en la producción de PEP <i>Mx</i> en la cepa <i>L. casei</i> IPLA1506.	118
Figura 38	Producción de PEP por la cepa <i>L. casei</i> IPLA1506 a diferentes valores de pH.	119
Figura 39	Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas por <i>L. casei</i> BL23 y <i>L. casei</i> IPLA1506.	120

Figura 40	Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer.	121
Figura 41	Análisis LC-MS de los productos de la degradación del 33-mer.	122
Figura 42	Supervivencia celular (A) y producción de PEP (B) de <i>L. casei</i> IPLA1506 en condiciones gastrointestinales.	124
Figura 43	Esquema de los pasos realizados en la construcción del vector integrativo de expresión extracelular pIPLA1265.	126
Figura 44	Mapa genético del plásmido integrativo pIPLA1503.	127
Figura 45	Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de PEP <i>Mx</i> en la cepa <i>L. casei</i> IPLA1503.	128
Figura 46	Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer.	129
Figura 47	Mapa genético del plásmido integrativo pIPLA1507.	132
Figura 48	Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y en la producción de PEP <i>Sc</i> de la cepa <i>L. casei</i> IPLA1507.	134
Figura 49	Producción de PEP <i>Sc</i> en la cepa <i>L. casei</i> IPLA1507 a diferentes pH.	135
Figura 50	Hidrólisis del péptido 33-mer.	136
Figura 51	Supervivencia celular (A) y producción de PEP (B) de <i>L. casei</i> IPLA1507 en condiciones gastrointestinales.	137
Figura 52	Mapa genético del plásmido integrativo pIPLA1504.	140
Figura 53	Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de PEP <i>Mx</i> en la cepa <i>L. casei</i> IPLA1504.	141
Figura 54	Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer.	142

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura 55	Secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen sintético <i>pepMx</i> .	193
Figura 56	Secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen sintético <i>pepSc</i> .	194

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1	Clasificación de las proteínas de trigo según la teoría de Osborne (1924).	3
Tabla 2	Clasificación de las gliadinas.	5
Tabla 3	Clasificación de las gluteninas.	6
Tabla 4	Principales péptidos tóxicos e inmunogénicos de la gliadina.	15

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 5	Características principales de las 13 muestras utilizadas en el presente trabajo.	42
Tabla 6	Cepas usadas en el presente estudio.	43
Tabla 7	Plásmidos utilizados en el presente estudio.	45
Tabla 8	Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.	46
Tabla 9	Composición del medio base químicamente definido.	48
Tabla 10	Representación esquemática de una microplaca utilizada para determinar la CIM de ocho agentes antimicrobianos.	53

RESULTADOS

Tabla 11	Recuento bacteriano total (\log ufc g^{-1}) y del número de bacterias formadoras de halo (%) en la muestra de ensilado de trigo.	74
Tabla 12	Principales características y recuentos microbiológicos de las 10 muestras de masas fermentadas utilizadas.	81
Tabla 13	Recuentos microbianos totales de las dos muestras de contenido ruminal bovino.	82

Tabla 14	Selección, identificación y tipificación de BAL procedentes de las muestras de masas fermentadas.	84
Tabla 15	Selección, identificación y tipificación de BAL en las muestras de contenido ruminal bovino.	86
Tabla 16	Distribución de la CIM de 8 antibióticos para las 29 cepas de BAL seleccionadas.	90
Tabla 17	Lista de todos los CDS que codifican peptidasas en el genoma de <i>L. casei</i> IPLA12038 según la anotación realizada por el RAST.	102
Tabla 18	Lista de todos los CDS que codifican proteasas en el genoma de <i>L. casei</i> IPLA12038 según la anotación realizada por el RAST.	103

DISCUSIÓN

Tabla 19	Características principales de 18 genomas de <i>L. casei</i> .	156
-----------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

33-mer.	Péptido de 33 aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>apf</i>	<i>Aggregation promoter factor</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
BAL	Bacterias del ácido láctico
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
DO	Densidad óptica
DSG	Dieta sin gluten
EC	Enfermedad celíaca
ELC	Extracto libre de células
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELC	Extracto libre de células
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PEC	Proteinasa asociada a la envoltura celular
PEP	Prolil endopeptidasa
PEP <i>Mx</i>	Prolil endopeptidasa de <i>Myxococcus xanthus</i>
PEP <i>Sc</i>	Prolil endopeptidasa de <i>Sphingomonas capsulata</i>
Ppm	Partes por millón

QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TG2	Transglutaminasa tisular 2
TGI	Tracto gastrointestinal
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL GLUTEN

1.1. Breve historia del trigo

Los primeros cultivos de trigo datan de hace 10.000 años, durante la revolución neolítica, periodo en el que el hombre abandonó su estado nómada para formarse en las artes de la ganadería y la agricultura. Las formas primitivas de trigo eran especies diploides y tetraploides, y 1.000 años después apareció el primer cultivo hexaploide de trigo (Feldman 2001). Mutaciones espontáneas, cruzamientos y la selección empírica realizada por el hombre a lo largo de los años nos transportan hacia la especie de trigo más popular que consumimos hoy en día, *Triticum aestivum* (Belderok, 2000).

En la actualidad, junto al arroz y al maíz, el trigo es uno de tres cultivos de cereales más importantes a nivel mundial. Anualmente se cosechan unos 600 millones de toneladas y se ha convertido en la base de la alimentación de millones de personas, calando en la cultura tradicional e incluso en la religión (Shewry, 2009). El éxito de este alimento radica principalmente en la consistencia viscoelástica que poseen las masas elaboradas con harina de trigo, debida a las estructuras que forma la fracción proteica del grano de trigo, que comúnmente denominamos gluten (Shewry, 2009). Dicha consistencia permite elaborar multitud de alimentos horneados.

1.2. ¿Qué es el gluten?

El gluten es un conjunto de proteínas que constituye la principal reserva nutritiva que se encuentra en las células del endospermo del grano de trigo (**Figura 1**). Sin embargo, rigurosamente hablando, el gluten se define como la matriz de componentes insolubles que permanece tras lavar con agua la masa de harina de trigo. Durante el lavado se eliminan los restos de almidón y otros constituyentes hidrosolubles. Dependiendo de la intensidad del lavado, la materia seca que permanece está constituida principalmente por proteínas (75–85%) y lípidos (5–10%). El resto está constituido principalmente por almidón y otros carbohidratos (Wieser, 2007).

Su papel biológico es servir como reserva de carbono, nitrógeno y azufre para sustentar el proceso de germinación y el crecimiento de la planta. Hasta el momento no se ha descrito otro papel biológico para las proteínas del gluten. Parece ser que sus propiedades viscoelásticas son totalmente fortuitas, fruto de la secuencia de aminoácidos de sus proteínas (Shewry y cols., 2002).

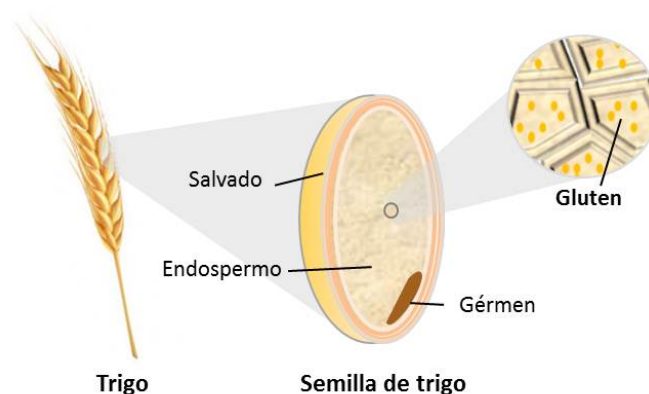


Figura 1. Representación esquemática de la semilla de trigo. Se muestran las partes principales que la componen, haciendo hincapié en las células del endospermo donde se almacena el gluten.

1.3. Las proteínas del trigo

Las proteínas del trigo se clasifican en albúminas, globulinas y prolaminas según su solubilidad, basándose en una serie de extracciones consecutivas en agua,

solución salina, solución de alcohol y solución de ácidos y bases diluidos (Osborne, 1924) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de trigo según la teoría de Osborne (1924).

Fracción	Solubilidad	Composición	Papel biológico	Función
Albúminas	Agua	Proteínas monoméricas, no pertenecientes al gluten	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Globulinas	Sales diluidas	Proteínas monoméricas, no pertenecientes al gluten	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Prolaminas	Soluciones de alcohol o de ácido acético	Gliadinas monoméricas y polímeros de glutenina pertenecientes al gluten	Proteínas de reserva de la semilla	Viscosidad, extensibilidad, resistencia y elasticidad

Las prolaminas son las proteínas del trigo que pertenecen al gluten. Representan entre un 80-85% del total de las proteínas del trigo y se encuentran en el endospermo del grano de trigo. Las albúminas y las globulinas no pertenecen al gluten y por lo tanto no se profundizará en su estudio. Representan entre un 15 y un 20% del contenido de proteína total y se encuentran principalmente en las capas externas del grano de trigo.

1.3.1. Las prolaminas

Las prolaminas, que como ya se ha indicado son las proteínas del trigo pertenecientes al gluten, deben su nombre a la composición aminoacídica tan inusual que poseen, con un elevado contenido en residuos de prolina y glutamina. Las prolaminas se dividen en dos grupos dependiendo de su solubilidad en etanol al 60%: Las gliadinas (solubles) y las gluteninas (insolubles). Ambos tipos de proteínas se unen entre sí mediante enlaces covalentes y no covalentes, formando una matriz proteica que constituye el gluten. Normalmente se encuentra en una relación 50/50, siendo imprescindible obtener una mezcla adecuada de ambas para conseguir las preciadas características viscoelásticas de la masa de pan (Wieser, 2007; Shewry y cols., 2002; Shewry y Halford, 2002).

Las prolaminas no son exclusivas del trigo, se encuentran presentes en otros cereales y reciben diferentes nombres según el cereal de origen: Secalinas en el centeno, hordeínas en la cebada y aveninas en la avena. Otras variedades de trigo como la espelta o el kamut y los cereales híbridos como el triticale, también contienen prolaminas (Shewry y Halford, 2002). Sin embargo, al ser el trigo el cereal más consumido por el hombre y con un mayor contenido en prolaminas, es frecuente hablar de gliadinas al referirse a las prolaminas de otros cereales, aunque estrictamente hablando sólo se encuentran gliadinas en el trigo.

1.3.1.1. *Las gliadinas*

Como ya se ha indicado previamente, las gliadinas constituyen la fracción proteica soluble en etanol al 60%. Cuando se encuentran hidratadas son las responsables de proporcionar viscosidad y extensibilidad a la masa. Están formadas principalmente por monómeros con masas moleculares (MM) entre los 22 y los 55 kDa. Se clasifican en cuatro grupos diferentes en base al análisis de la composición y la secuencia de aminoácidos y de su MM: ω 5-, ω 1,2-, α/β - y γ -gliadinas (Wieser, 2007) (**Tabla 2**).

Las ω -gliadinas se caracterizan por tener un mayor contenido en residuos de glutamina, prolina y fenilalanina, que juntos forman el 80% de la proteína. Estos aminoácidos forman secuencias, como por ejemplo PQQPFPQQ, que se repiten a lo largo de la proteína. Apenas poseen cisteínas, por lo que no pueden formar puentes disulfuro internos. Las ω 5 tienen una MM de aproximadamente 50 kDa, mientras que las ω 1,2 son más pequeñas, con una MM de 40 kDa. Las α/β - y γ -gliadinas tiene MM más bajas, de 28–35 kDa y una proporción de prolinas y glutaminas menor. Contienen secuencias repetidas ricas en glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina en el dominio N-terminal (aproximadamente el 40-50% del total de la proteína). Se diferencian principalmente en el tipo de repetición, puesto que las α/β -gliadinas suelen ser dodecapéptidos (QPQPFPQQPYP) repetidos cinco veces mientras que las γ -gliadinas son heptapéptidos (QPQQPFP) repetidos hasta dieciséis veces (Wieser, 1996). La distribución de las gliadinas depende tanto de la variedad del trigo como de las condiciones de crecimiento del mismo, aunque

generalmente las α/β - y γ -gliadinas son los componentes principales, mientras que las ω -gliadinas se encuentran en menor proporción (Wieser, 2007).

Tabla 2. Clasificación de las gliadinas. El porcentaje de gliadina se representa de acuerdo al contenido proteico total del gluten. MM, masa molecular; kDa, kilodaltons; Gln, glutamina; Pro, prolina; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Gly, glicina. Modificado de Wieser (2007).

Tipo	MM (kDa)	Porcentaje (%)	Composición parcial de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω 5-Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1	1
ω 1,2-Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1	1
α/β -Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ -Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3

1.3.1.2. Las gluteninas

Las gluteninas son agregaciones proteicas complejas insolubles en etanol al 60%, que están unidas por puentes disulfuro y son responsables de la resistencia y la elasticidad de la masa. Poseen tamaños muy variables, con MM que varían desde los 50 hasta los 10 millones de kDa (Wieser, 2007). Por lo tanto, algunas gluteninas están entre las proteínas más grandes de la naturaleza. Se clasifican según su MM en AMM (alta MM) y BMM (baja MM) (**Tabla 3**). Las BMM son las gluteninas predominantes (20% del contenido total de gluten) y son muy similares a las α/β - y γ -gliadinas en su MM y composición aminoacídica. En el extremo N-terminal contienen repeticiones de secuencias tales como QQQPPFS (Wellner y cols., 2006). Las AMM son las proteínas minoritarias del gluten, se dividen en dos tipos: α -gluteninas de 83-88 kDa e γ -gluteninas de 67-74 kDa. Las gluteninas han sido ampliamente estudiadas puesto que son las principales responsables de la calidad de la masa, debido a la distribución de los puentes disulfuro y de las interacciones de los dominios repetidos (Wieser, 2007).

Tabla 3. Clasificación de las gluteninas. El porcentaje de glutenina se representa de acuerdo al contenido proteico total del gluten. MM, masa molecular; kDa, kilodaltons; Gln, glutamina; Pro, prolina; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Gly, glicina. Modificado de Wieser (2007).

Tipo	MM (kDa)	Porcentaje (%)	Composición parcial de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
x-AMM	83-88	4-9	37	13	0	6	19
y-AMM	67-74	3-4	36	11	0	5	18
BMM	32-39	19-25	38	13	4	1	3

1.4. Importancia y presencia del gluten en alimentos

Los cereales constituyen una parte fundamental de nuestra dieta, situándose en la base de la pirámide alimentaria. Entre ellos, el trigo es uno de los cereales más importantes del mundo (Shewry, 2009). La harina de trigo está compuesta por almidón (70-75%), agua (14%), lípidos (2%) y proteínas (10-15%), pero sus características nutritivas van más allá. Es un compuesto altamente energético debido a la elevada cantidad de carbohidratos que posee, además es una fuente de fibra, aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas que ayudan a cubrir gran parte de las necesidades nutricionales básicas. Entre los componentes de la harina de trigo, el gluten, debido a sus características nutritivas, su moderado coste y su capacidad para provocar saciedad inmediata, junto a las propiedades viscoelásticas de sus proteínas, se ha convertido en un ingrediente esencial en la mayor parte de alimentos que consumimos (Shewry y Halford, 2002). Además de ser un componente principal en alimentos como el pan, pastas, galletas y productos de repostería en general, también se encuentra como aditivo en salsas, cervezas, sopas, helados, conservas, embutidos, patés, dulces e incluso en medicamentos y suplementos vitamínicos, estando presente en un 80% de los alimentos que consumimos. Por lo tanto, se estima que la ingestión de gluten de un individuo que sigue una dieta occidental es de aproximadamente 10-20 g al día (van Overbeek y cols., 1997).

1.5. Toxicidad del gluten

Llegados a este punto, es difícil de imaginar que un alimento tan completo y extendido a nivel mundial pueda ser perjudicial para la salud. Pero no todo en el trigo son beneficios. Las proteínas del gluten, las mismas que confieren características únicas a la masa, tienen un efecto nocivo para la salud de determinados individuos (Wieser, 2007; Wieser, 1996; Shewry y cols., 2002).

Existe una serie de trastornos relacionados con la exposición directa al gluten: la alergia (mediada por inmunoglobulina E), la intolerancia (enfermedad autoinmune) y un tercer grupo menos conocido que se denomina sensibilidad al gluten no celiaca (**Figura 2**).

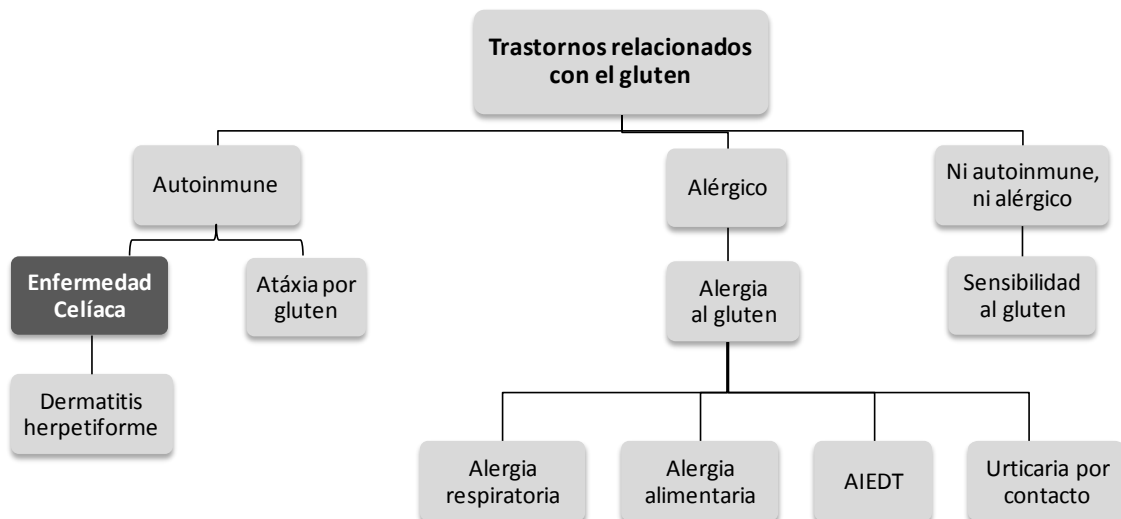


Figura 2. Clasificación de los trastornos relacionados con el gluten. Modificado de Sapone y cols. (2012).

La alergia al gluten se define como una reacción inmunológica a las proteínas del gluten. Dependiendo de la ruta de exposición al alérgeno se distinguen cuatro tipos diferentes: la alergia alimentaria que afecta a la piel y al tracto gastrointestinal o respiratorio, más frecuente en niños (Poole, 2006), el síndrome de anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (AIEDT), la urticaria por contacto y la alergia respiratoria o asma del panadero, una de las alergias ocupacionales más comunes causada por la inhalación diaria de harina de trigo (Shewry, 2002; Sapone y cols., 2012).

La intolerancia al gluten consiste en trastornos autoinmunes relacionados con la ingesta de gluten. En algunos pacientes causa un trastorno neurológico conocido como ataxia por gluten, en el que se dañan las células de Purkinje del cerebelo, provocando descoordinación corporal y dificultad para moverse con normalidad (Sapone y cols., 2012). En otros casos provoca una enteropatía inflamatoria denominada enfermedad celíaca (EC) que se desarrollará a continuación en un apartado independiente. La dermatitis herpetiforme es una manifestación inflamatoria cutánea que exhiben algunos pacientes afectados por la EC.

La sensibilidad al gluten no celíaca se caracteriza por presentar los síntomas de la EC, observándose una mejoría al retirar el gluten de la dieta. Sin embargo, no se producen procesos autoinmunes ni alergias (Verdu y cols., 2009).

2. ENFERMEDAD CELÍACA (EC)

De todos los trastornos mencionados en el apartado anterior, la EC es el trastorno relacionado con el gluten que presenta una mayor prevalencia. De hecho, la EC es en la actualidad una de las enfermedades genéticas más comunes a nivel mundial, afectando a personas de todas las edades y sexos. Sus síntomas son muy variados y pueden complicarse llegando incluso a amenazar la vida del paciente. Además, el único tratamiento que existe es seguir una estricta dieta libre de gluten, lo que conlleva una gran pérdida de calidad de vida. Por todo ello, a continuación describiremos con más detalle la EC.

2.1. Definición: ¿Qué es la EC?

La EC es una enteropatía inflamatoria crónica de carácter autoinmune, que se produce tras la ingestión de gluten en individuos genéticamente predispuestos (Shan y cols., 2002). Produce una inflamación de la zona proximal del intestino delgado (yeyuno), una atrofia de las vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas, provocando una drástica reducción de la superficie de la pared intestinal. Esta alteración de la superficie intestinal impide la correcta absorción de nutrientes, causando complicaciones clínicas y funcionales variables, dependiendo del grado de lesión de la mucosa (Sollid, 2002). La sintomatología típica está asociada a

alteraciones intestinales (malabsorción, diarrea, anemia, fatiga, pérdida de peso, distensión abdominal, etc.), aunque en la mayoría de los casos se dan también síntomas extra intestinales (osteoporosis, depresión, infertilidad, etc.). Además, la ingesta de gluten y la EC se encuentran estrechamente asociadas con otros desórdenes como diabetes mellitus tipo I, síndrome de Down, esclerosis múltiple, dermatitis herpetiforme, miopatía, artritis, autismo, esquizofrenia, linfomas etc. (Green y Cellier, 2007).

2.2. Historia de la EC

La primera descripción de la EC procede de la segunda mitad del siglo II a.C., cuando el médico griego Arateo de Capadocia utilizó la palabra “*koiliakos*”, cuyo significado era “que sufren del intestino”, para referirse a los pacientes que presentaban problemas digestivos acompañados de diarreas y pérdidas de peso (Dowd y Walker-Smith, 1974). Pero no fue hasta 21 siglos después, en 1888, cuando el doctor Samuel Gee escribió el primer informe clínico detallado de la EC (Losowsky, 2008). A partir de este momento, investigadores y clínicos comenzaron a interesarse por dicha enfermedad, observando la posible relación existente entre la dieta y los síntomas de la EC. En 1941 el pediatra holandés Willem-Karel Dicke demostró con todo detalle como los pacientes mejoraban de forma extraordinaria cuando se excluía de su dieta las harinas de trigo, centeno y avena (Van Berge-Henegouwen y Mulder, 1993). Desde entonces, el avance en el conocimiento de la enfermedad, así como en nuevos métodos de diagnóstico, ha ido aumentando a lo largo de los años. Sin embargo desde las observaciones de Dicke en los años 50 hasta la actualidad, el único tratamiento disponible para los enfermos celíacos es una dieta exenta de gluten para toda la vida, con las complicaciones que ello conlleva y que trataremos más adelante.

2.3. Epidemiología de la EC

Durante años, la EC se consideró una patología poco frecuente que afectaba casi exclusivamente a niños de origen caucásico del norte de Europa (Gujral y cols., 2012). Hoy en día se sabe que la EC es una de las enfermedades genéticas más

comunes, con una prevalencia entre el 0,5 y el 1% de la población mundial (Green y Cellier, 2007). Además, se estima que existen un elevado número de pacientes sin diagnosticar (Ludvigsson y cols., 2013; Lionetti y Catassi, 2011; Fassano y Catassi, 2001).

En la **Figura 3** se muestra la distribución de la prevalencia mundial de la EC en diferentes continentes y naciones. Se debe de tener en cuenta que son datos medios recopilados de muchos estudios diferentes, algunos informan de la prevalencia basándose en la serología de los pacientes, otros se apoyan en los resultados de biopsias intestinales y unos pocos se basan en los datos de la serología y la biopsia.

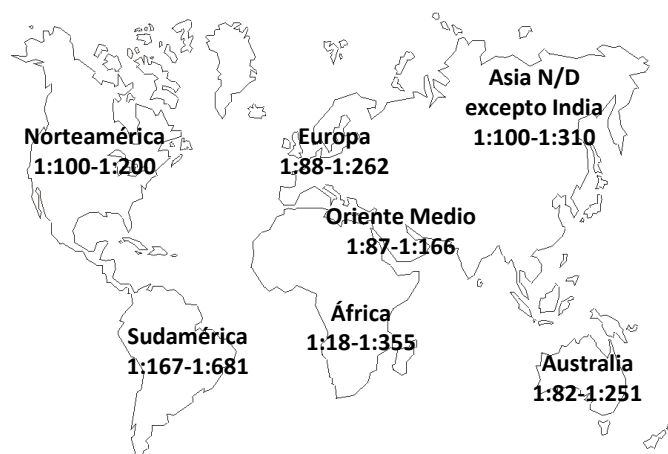


Figura 3. Prevalencia mundial de la EC. Rango estimado de prevalencia de EC en continentes y naciones a lo largo de todo el globo terráqueo. N/D, no determinado. Modificado de Gujral y cols. (2012).

La prevalencia de la EC depende de los genes asociados a la EC y del tipo de dieta que presente cada población (Setty y cols., 2008; Fasano y Catassi 2001; Gujral y cols., 2012). Por ejemplo, en la población Saharai de Argelia, se ha detectado la mayor prevalencia de EC de todo el mundo, un 5,6% de la población se encuentra afectada. Esto se debe a razones genéticas (elevada frecuencia de los alelos HLA-DQ2, que estudiaremos posteriormente) y a los nuevos hábitos alimenticios que han adoptado en las últimas décadas. Se ha disminuido el tiempo de amamantamiento y se ha introducido el trigo como dieta básica en edades más tempranas, características

que han podido jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad (Lionetti y cols., 1999; Catassi y cols., 2001).

Además, como ocurre en otras intolerancias alimentarias, la EC es mayor en mujeres que en hombres, con un ratio de 1:2,8. Aunque puede ser diagnosticada a cualquier edad, es frecuente detectarla en niños entre 1-3 años y en adultos entre los 30-50 años (Green y Cellier, 2007).

2.4. Clínica de la EC

Las manifestaciones clínicas de la EC se clasifican en:

- ~ EC clásica: Se caracteriza por presentar una sintomatología gastrointestinal típica junto a una serología positiva y una biopsia duodenal característica de la EC. Los síntomas gastrointestinales incluyen dolor abdominal, diarrea, flatulencia, vómitos, pérdida de peso, irritabilidad y fatiga. Sin embargo, hay ocasiones en las que se incluyen síntomas extra-intestinales como osteoporosis, infertilidad, anemia ferropénica, dolores articulares, desórdenes psiquiátricos y neurológicos, problemas hepáticos, etc. (Ludvigsson y cols., 2013).
- ~ EC silente: Se trata de pacientes asintomáticos, pero que tienen la mucosa intestinal dañada y presentan una serología positiva (Di Sabatino y Corazza, 2009, Ludvigsson y cols., 2013).
- ~ EC latente: No existe una sintomatología aparente y tampoco presentan las lesiones típicas en la mucosa intestinal ni contienen marcadores serológicos, pero existe una predisposición genética, pudiendo desarrollarse la enfermedad repentinamente (Holmes, 2001; Ludvigsson y cols., 2013).
- ~ EC potencial: En este caso los pacientes nunca han presentado síntomas típicos de EC, ni alteraciones histológicas en la biopsia duodenal, pero poseen algunos marcadores serológicos positivos, una fuerte predisposición genética y en ocasiones linfocitos intraepiteliales (Holmes, 2001; Ludvigsson y cols., 2013).

Las manifestaciones clínicas de la EC, pueden ser conceptualizadas utilizando el modelo del iceberg (**Figura 4**) (Ludvigsson y cols., 2013). En este modelo, el

tamaño total del iceberg simboliza el número total de enfermos celíacos y la parte visible representa aquellos pacientes que exhiben la sintomatología típica de la EC y son diagnosticados. Por lo tanto, la mayor parte de los enfermos, representados por la parte sumergida, se encuentran aún sin diagnosticar. Se estima que por cada paciente diagnosticado hay entre 5 y 7 sin diagnosticar (Lionetti y Catassi, 2011; Fassano y Catassi, 2001). Estos pacientes no son tratados y con el paso del tiempo pueden sufrir complicaciones como infertilidad, osteoporosis e incluso cáncer.

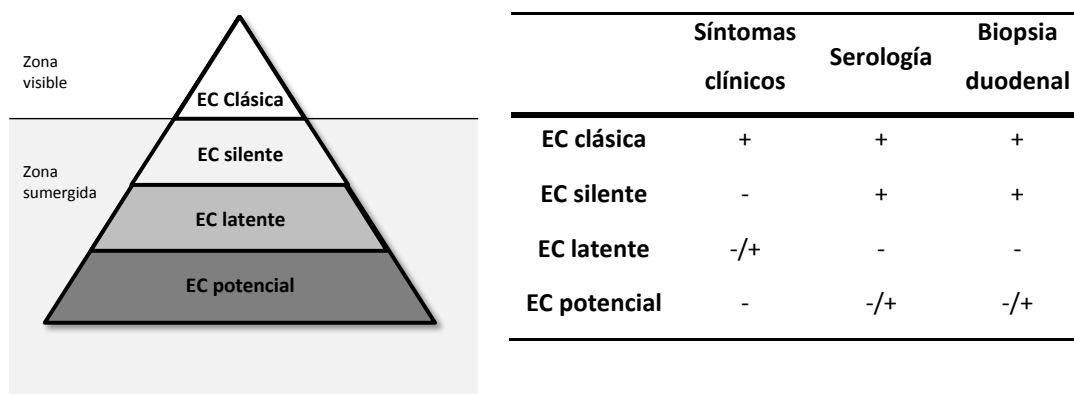


Figura 4. Modelo del iceberg de la EC. Se clasifican las diferentes manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad.

2.5. Etiología

Actualmente se sabe que el gluten es el principal desencadenante de la EC y que se necesita una predisposición genética para padecer la enfermedad. Sin embargo, el hecho de que numerosos individuos portadores de los alelos implicados no desarrollen la EC tras la ingestión de gluten, impulsa a pensar que existen otros factores genéticos o ambientales aún desconocidos (Kagnoff, 2007).

2.5.1. Factores genéticos

Es lógico pensar que si el gluten no afecta a toda la población es porque existe una susceptibilidad individual a desarrollar la EC. Por lo tanto, debe de existir un componente genético importante. Entre los factores genéticos se encuentra el complejo principal de histocompatibilidad humano que es un conjunto de genes (clase I, clase II y clase III) que forman el sistema HLA (*human leukocyte antigen*), que

está implicado en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario. Este conjunto de genes está localizado en el brazo corto del cromosoma seis y presenta un gran polimorfismo en forma de variantes alélicas entre diferentes individuos (The MHC sequencing consortium, 1999). Actualmente, hay descritos más de 3.000 alelos distintos (Robinson y cols., 2009).

La asociación de la EC con los genes HLA de clase II es muy fuerte e incuestionable (Louka y Sollid, 2003; Sollid y cols., 1989). El 95% de los pacientes celíacos portan el heterodímero HLA-DQ2, codificado por los alelos DQA1*05 y DQB1*02. El 5% restante de los pacientes portan el heterodímero HLA-DQ8 (DQA1*03 y DQB1*0302), o son portadores de uno de los dos alelos del HLA-DQ2. Estas moléculas se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos y juegan un papel muy importante en la patogenia de la EC, ya que poseen una elevada afinidad por los péptidos del gluten, siendo responsables de su presentación a los linfocitos T (Arranz y Garrote, 2010).

Sin embargo, aunque la presencia de los heterodímeros HLA DQ2/DQ8 es necesaria para el desarrollo de la EC, no es suficiente. Estudios realizados con gemelos han demostrado que el riesgo genético asociado al HLA no supera el 40%, por lo tanto el 60% restante debe de estar asociado a otras regiones no-HLA (Nisticò y cols., 2006). De hecho, se han identificado regiones no-HLA implicadas en el desarrollo de la EC, sin embargo representan menos del 5% del riesgo genético de padecer la enfermedad, sugiriendo la existencia de otros genes aún sin identificar (Hunt y cols., 2009).

2.5.2. Factor ambiental desencadenante: El gluten

Durante el proceso digestivo, las proteínas ingeridas en la dieta son hidrolizadas en productos de menor tamaño que pueden ser absorbidos en el intestino delgado. Las proteínas a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) sufren una degradación por los enzimas presentes en el estómago, como la pepsina; en el duodeno, como la quimiotripsina, la carboxipeptidasa, la tripsina y la elastasa; y finalmente por las peptidasas ancladas al borde en cepillo del epitelio intestinal.

Como consecuencia, los aminoácidos y péptidos resultantes son absorbidos por los enterocitos y enviados al torrente sanguíneo donde se transportarán por todo el cuerpo (Shan y cols., 2002).

Sin embargo, la hidrólisis de las prolaminas del gluten genera unos péptidos con un elevado porcentaje de residuos de prolina y glutamina, que les confieren resistencia a la degradación proteolítica en el intestino humano. La prolina juega un papel crítico en la resistencia a la proteólisis gastrointestinal, debido a la falta en el intestino humano de enzimas específicos para hidrolizar residuos internos de este aminoácido. Además, promueve una conformación helicoidal dextrógira que fortalece la unión de los péptidos con las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 durante la presentación de antígenos (Gujral y cols., 2012). Por lo tanto, los péptidos resultantes de la hidrólisis del gluten se acumulan en el lumen intestinal y desencadenan una respuesta inmune en individuos genéticamente predispuestos, contribuyendo al desarrollo de la EC (Shan y cols., 2002; Shan y cols., 2005; Quiao y cols., 2004; Hausch y cols., 2002). Se denominan **péptidos inmunotóxicos** a todos aquellos péptidos capaces de alterar el sistema inmune, y a su vez, los péptidos del gluten se clasifican en péptidos tóxicos o inmunogénicos en función del tipo de respuesta inmune que desencadenan. Los péptidos tóxicos son aquellos capaces de producir un daño en la mucosa intestinal, activando el sistema de inmunidad innata. En cambio, se denominan inmunogénicos a aquellos péptidos capaces de estimular los linfocitos T CD4+, induciendo la respuesta adaptativa (Ciccocioppo y cols., 2005).

Durante los últimos años se han identificado numerosos péptidos tóxicos e inmunogénicos provenientes de las prolaminas, principalmente de las γ - y α/β -gliadinas (Ciccocioppo y cols., 2005; Shan y cols., 2005) (**Tabla 4**). Entre ellos, se identificó un péptido de 33 aminoácidos, al que se denomina 33-mer (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) proveniente de la α/β -gliadina (alfa 2 gliadina 56-88), que muestra una inusual resistencia a la actividad proteolítica gastrointestinal y una elevada afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Shan y cols., 2002). Actualmente, es el péptido conocido más inmunogénico del gluten, debido a la presencia de seis copias de tres epítomos

diferentes, que se encuentran solapados en su secuencia aminoacídica (**Figura 5**) (Quiao y cols., 2004).

Tabla 4. Principales péptidos tóxicos e inmunogénicos de la gliadina. Adaptado de Ciccocioppo y cols., 2005.

Secuencia aminoacídica	Posición
<i>Péptidos tóxicos</i>	
PGQQQPFPPQQPY	α 31-43
PGQQQPFPPQQYPQPQPF	α 31-49
PGQQQPFPPQQYPQPQPFPSQQPY	α 31-55
PQPQPFPSQQPY	α 44-55
SQQPYLQLQFPQPQLPY	α 51-70
LQLQFPQPQLPYQPQLPY	α 56-75
LGQGSFRPSQQN	α - 206-217
<i>Péptidos inmunogénicos</i>	
PQPQLPYPQPQLPY	α -: 62-75
QLQFPQPQLPY	α -: 57-68
LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	α -: 57-89
QLQFPQPQLPY	α -: 58-69
PQPQLPYPQPQLPY	α -: 63-76
PSGQGSFQPSQQ	α -: 205-216
SGQGSFQPSQQN	α -: 206-217
OQPQQSFQPSQQ	γ -: 134-153

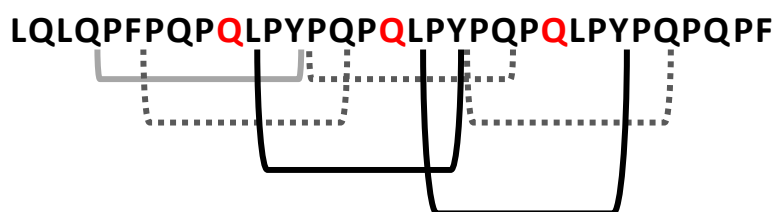


Figura 5. El péptido inmunogénico 33-mer. Se muestran las seis copias solapadas de los tres epítomos inmunostimuladores de los linfocitos T. Se señalan en rojo los tres residuos de glutamina preferidos por el enzima transglutaminasa tisular, para desaminarlos y convertirlos en ácido glutámico (Modificado de Quiao y cols, 2004).

2.5.3. Otros factores ambientales

La predisposición genética y el consumo de gluten son factores necesarios para el desarrollo de la EC, pero tampoco son suficientes. No todos los individuos

con ambas características desarrollan la enteropatía, por lo tanto, deben de existir otros factores desconocidos involucrados en el proceso. Se ha sugerido que factores como la lactancia materna, el momento de introducción del gluten en la infancia, infecciones virales, daño tisular e incluso la microbiota intestinal pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EC (Stepniak y Koning, 2006; Sanz y cols., 2011; Sanz y cols., 2011; Nistal y cols., 2012).

2.5.4. Bases moleculares de la EC

El modelo de patogenia más aceptado para la EC considera que el gluten tiene un efecto tanto en el epitelio como en la lámina propia intestinales, activando la respuesta inmune innata y adaptativa respectivamente (Arranz y Garrote, 2010) (**Figura 6**).

Cuando la digestión incompleta de las proteínas del gluten a lo largo del TGI genera péptidos tóxicos que se acumulan en el lumen intestinal, se activa la **respuesta innata**. Estos péptidos causan un daño directo sobre el epitelio intestinal y los enterocitos comienzan a secretar elevadas cantidades de interleucina 15 (IL-15). IL-15 induce la expresión de los receptores NKG2D en la superficie de los linfocitos T y de las células asesinas naturales (NK, *natural killers*). Estos receptores son ligandos de las moléculas MICA (*MHC class I Chain related Antigen*), antígenos expresados por los enterocitos en situaciones de estrés (Sollid y Khosla, 2005; Mention y cols., 2003). La unión NKG2D-MICA provoca una reacción de toxicidad en el epitelio, induciendo la apoptosis de los enterocitos (Arranz y Garrote, 2010). Además, los enterocitos sobre-expresan el gen que codifica la zonulina, una proteína que modula la permeabilidad de las uniones estrechas, generando un aumento de permeabilidad intestinal y permitiendo el acceso de los péptidos inmunogénicos del gluten a la lámina propia (p. ej. El péptido 33-mer) (Fasano, 2012; Drago y cols., 2006).

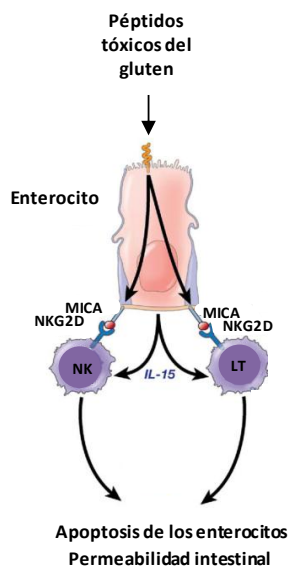
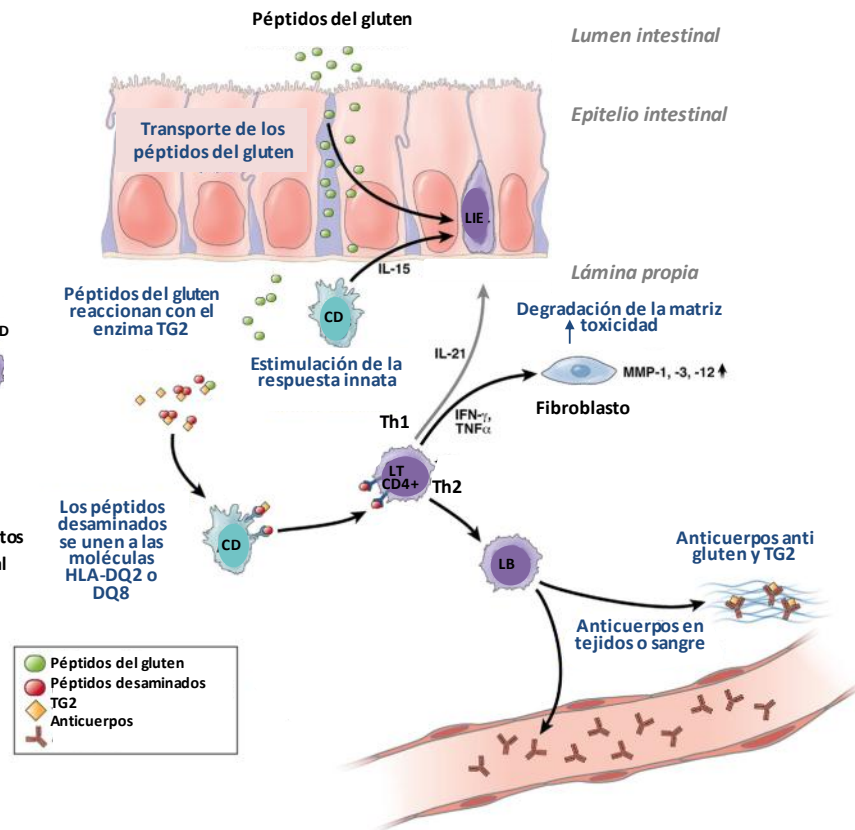
A. Respuesta innata**B. Respuesta adaptativa**

Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos moleculares de la EC. CD, célula dendrítica; LT, linfocito T; LB, linfocito B; LIE; linfocito intraepitelial; TG2, transglutaminasa tisular 2; NK, célula asesina natural; MMP, proteasa metalodependiente. Adaptado de Schuppan y cols., (2009).

Cuando los péptidos inmunogénicos llegan a la lámina propia se activa la **respuesta adaptativa**. En primer lugar, estos péptidos son desaminados por el enzima transglutaminasa tisular 2 (TG2) de la lámina propia, de forma que los residuos de glutamina se convierten en ácido glutámico, aumentando así su afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno o células dendríticas (CD) (Klöck y cols., 2012). Las CD actúan como intermediarios, presentando los péptidos desaminados y/o el complejo péptido-TG2 a los linfocitos T CD4+ de la lámina propia. Estos últimos se activan induciendo la respuesta inmune a través de dos vías diferentes: Th1 y Th2. Durante la reacción Th1 los linfocitos T CD4+ producen citocinas pro-inflamatorias como el

interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral (TNF) y otras como la IL-12, IL-15, IL-18, IL-27, provocando una destrucción de la mucosa y apoptosis de las células epiteliales (Leon y cols., 2005). En la reacción Th2 se producen citocinas IL-4, IL-6, IL-10, activando a los linfocitos B, que se diferencian en células plasmáticas con la consiguiente generación de anticuerpos frente a los péptidos de la gliadina y a la TG2. Estos anticuerpos impiden la correcta maduración de los enterocitos y se piensa que pueden inhibir la formación del factor de crecimiento β (Arranz y Garrote, 2010).

2.6. Diagnóstico de la EC

En 1990 la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica propuso un protocolo a seguir para obtener un correcto diagnóstico de la EC (Informe de la WGESPGN, 1990; Troncone y cols., 2008). El diagnóstico se basaba en detectar los síntomas típicos gastrointestinales, realizar una biopsia duodenal y a continuación observar la respuesta clínica e histológica que se produce tras la exclusión del gluten de la dieta. Este método suponía la realización de varias biopsias intestinales, un método invasivo que conlleva riesgos y es difícil de realizar en niños.

Actualmente, el diagnóstico de la EC se basa en la sintomatología clínica, los marcadores genéticos (haplotipo HLA), los marcadores serológicos [anticuerpos antigliadina (AAG), anticuerpos antiendomiso (EmA) y anticuerpos antitransglutaminasa tisular (ATGt)] y los resultados de las biopsias duodenales, así como la respuesta a una dieta libre de gluten (Green y Cellier, 2007; Lundin y Sollid, 2014). Los EmA y ATGt en conjunto alcanzan una especificidad del 99%, siendo una de las pruebas de diagnóstico más sensibles y fiables (Lewis y Scott, 2006). Sin embargo, siempre pueden existir falsos positivos, por lo que a día de hoy, la biopsia duodenal sigue siendo la prueba de oro obligatoria en todos los casos para finalizar un diagnóstico correcto de la EC (Gujral y cols., 2012).

2.7. Tratamiento de la EC

2.7.1. Tratamiento actual

El único tratamiento que existe actualmente para la enfermedad celíaca es seguir una estricta dieta sin gluten (DSG) durante toda la vida de paciente. El cumplimiento de esta dieta no es una tarea sencilla debido a la ubicuidad de estas proteínas, la contaminación cruzada de alimentos y la falta de un etiquetado correcto en muchos países (Chand y cols., 2006). Además, la DSG provoca una reducción de la calidad de vida del paciente celiaco. La poca diversidad y el elevado coste de los productos libres de gluten disponibles en el mercado, su falta de palatabilidad, la pérdida de prácticas culturales y religiosas, así como la carga social que conlleva seguir una DSG, pueden llegar a producir un estrés psicológico, económico y social importante (Lionetti y Catassi, 2011). No debemos olvidar las deficiencias nutricionales que acarrea esta dieta, tales como falta de hierro, magnesio, calcio, cinc, vitamina D, vitamina B12, ácido fólico, etc., que deben solventarse con la administración de suplementos dietéticos (Kupper, 2005).

En realidad, la eliminación total del gluten de la dieta es prácticamente imposible debido a la elevada contaminación oculta que hay en la mayor parte de los productos alimenticios. En consecuencia, en el año 2008 la Comisión del Codex Alimentarius estableció las directrices a seguir para el etiquetado de los alimentos destinados a personas con EC (CODEX STAN 118 - 1979). A partir de este informe, la Comisión Europea dictaminó en el Reglamento (CE) N°41/2009 (CCE, 2009) que los alimentos serán etiquetados como “contenido muy reducido de gluten” cuando contengan menos de 100 partes por millón (ppm), y como “exento/libre de gluten” cuando tengan menos de 20 ppm. Con el propósito de cuantificar la dosis máxima tolerada por los pacientes celiacos, Catassi y cols. (2007) publicaron un estudio en el que demuestran que la ingesta de 50 mg de gluten al día durante tres meses consecutivos es suficiente para alterar la mucosa intestinal del enfermo. Este tipo de estudios mantiene los límites del etiquetado de alimentos en continua revisión. Por último, cabe destacar que existe un pequeño porcentaje de

enfermos celíacos (1-2%) que no presentan una respuesta clínica ni histológica a la DSG, esta complicación se conoce como EC refractaria (Walter y Murray, 2011).

Por lo tanto, es necesario y urgente el desarrollo de nuevas terapias alternativas a la DSG que mejoren la calidad de vida de los pacientes celíacos.

2.7.2. Terapias alternativas en desarrollo

En los últimos años, el avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares, celulares y genéticos de la EC ha permitido el diseño de nuevos tratamientos que se encuentran en diferentes fases de estudio (**Figura 7**). Los podemos clasificar en dos grupos principales: 1) Terapias que tratan de eliminar la toxicidad del gluten en el propio alimento y 2) terapias que una vez ingerido el gluten, impiden el desarrollo de la enfermedad o palian sus efectos.

Dentro del primer grupo, se encuentra la selección y modificación genética de diferentes variedades de trigo y el tratamiento previo de la harina.

Las **variedades de trigo no tóxicas**, además de ser una opción terapéutica para la EC, permitiría mantener la calidad panaria tan deseada en los productos alimenticios sin gluten. Se han desarrollado variedades de trigo menos tóxicas mediante técnicas clásicas (Frisoni y cols., 1995). Además, se ha demostrado que la eliminación mediante ingeniería genética del locus de la α/β -gliadina en el cromosoma 6 de *T. aestivum*, provoca una eliminación total de los epítomos inmunostimuladores de los linfocitos T, pero también se pierden las propiedades viscoelásticas de la masa (van den Broeck y cols., 2009).

Elaboración de masas fermentadas sin los péptidos inmunotóxicos. La adición de lactobacilos capaces de degradar los péptidos ricos en prolina y glutamina del gluten a la masa en fermentación, disminuye la inmunotoxicidad de la muestra. Posteriormente se añaden harinas de avena, mijo y alforfón obteniendo una buena textura de la masa (Di cagno y cols., 2002; De Angelis y cols., 2006; Rizzello y cols., 2007). Otros autores han propuesto elaborar la harina con la semilla en fase de germinación, cuando comienza la degradación de las proteínas de almacenamiento (Schupan y cols., 2009).

El segundo tipo de terapias tiene como objetivo evitar el desarrollo de la EC una vez ingerido el gluten, y pueden ser clasificadas como : i) intraluminales, aquellas que se centran en disminuir la inmunotoxicidad del gluten o en secuestrar el gluten, para evitar su absorción a través del epitelio intestinal; ii) de absorción transepitelial, que tratan de inhibir la permeabilidad intestinal; iii) amortiguadoras de la respuesta inmune adaptativa e iv) inductoras de tolerancia e inmuno-moduladoras (Schupan y cols., 2009; Rashtak y Murray, 2012; Sanz, 2009; Sollid y Khosla, 2011).

Dentro de **las terapias intraluminales** se diferencian varios tipos:

-La terapia enzimática oral se basa en la eliminación de los péptidos del gluten en el lumen intestinal mediante la administración oral de enzimas con actividades endopeptidasa específicas de prolina y glutamina, para degradar el gluten durante el paso por el TGI. Se han seleccionado distintos tipos de enzimas para llevar a cabo esta hidrólisis, por ejemplo la prolil endopeptidasa de *Flavobacterium meningosepticum*, *Myxococcus xanthus* y *Sphingomonas capsulata* (Shan y cols., 2004), la endoproteasa de cebada EP-B2 (Gass y cols., 2006) y la prolil endoproteasa de *Aspergillus niger* (Tack y cols., 2013). La aplicación de estos enzimas se describe con más detalle en el **apartado 3.4**.

-El secuestro intraluminal de los péptidos del gluten, consiste en utilizar polímeros que secuestran los péptidos de la gliadina, atenuando la activación de las moléculas HLA-DQ2/DQ8 (Pinier y cols., 2009).

-La neutralización del gluten con anticuerpos, propone administrar oralmente anticuerpos IgG anti-gluten de vaca producidos a gran escala, que resistan el paso por el TGI y mantengan su capacidad neutralizadora (Schupan y cols., 2009).

Las terapias de absorción transepitelial consisten en inhibir la permeabilidad intestinal utilizando inhibidores de zonulina como el AT-1001 (Paterson y cols., 2007).

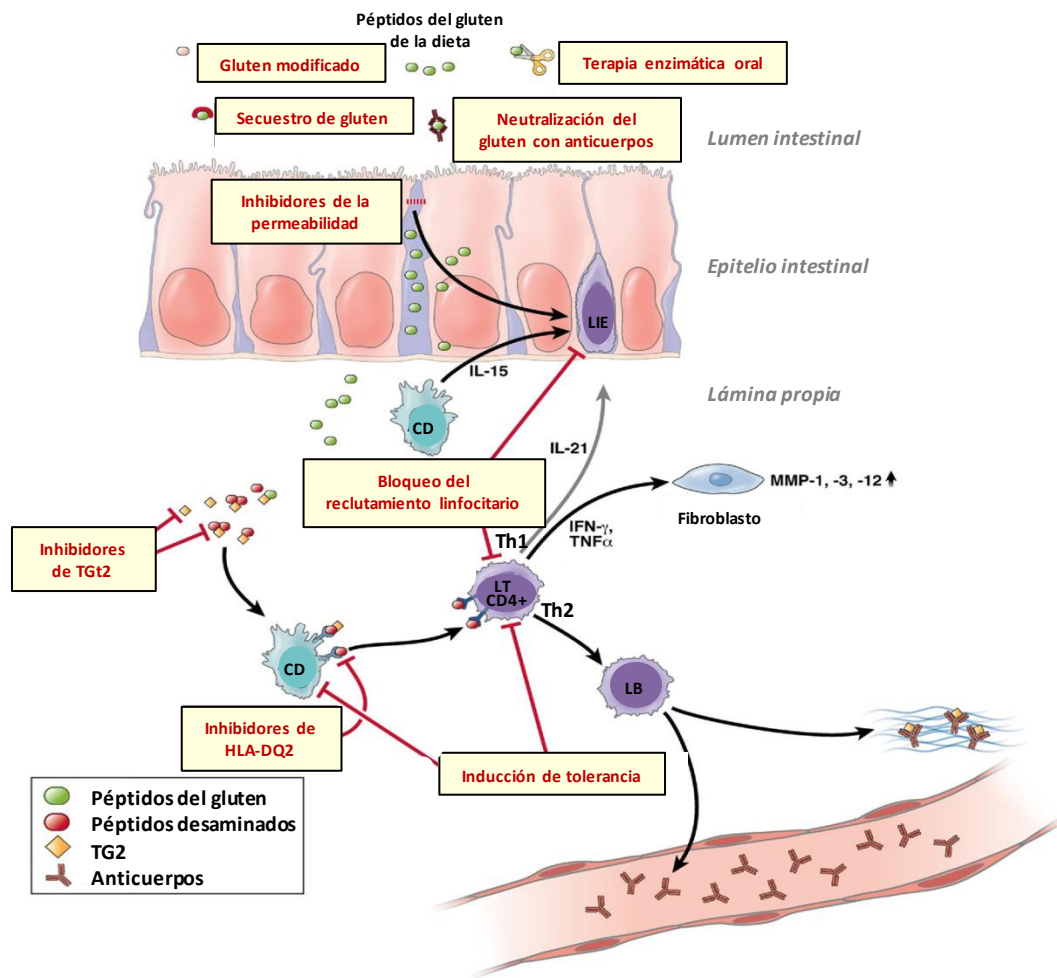


Figura 7. Representación esquemática de nuevas terapias alternativas para la EC. CD, célula dendrítica; LB, linfocito B; LT, linfocito T, LIE, linfocito intraepitelial; MMP, proteasa metalodependiente. Adaptado de Schuppan y cols., (2009).

Las terapias amortiguadoras de la respuesta inmunológica bloquean la presentación de los péptidos, como por ejemplo la administración de inhibidores de la TG2. Al evitar la desaminación de los péptidos del gluten, estos pierden la afinidad por las moléculas HLA-DQ2/DQ8 y por lo tanto se pierde la capacidad estimuladora de los linfocitos T. Algo parecido ocurre con los inhibidores de HLA-DQ2, que evitan el reconocimiento de los péptidos del gluten y por lo tanto no desencadenan la respuesta inmune (Schuppan y cols., 2009; Sollid y Khosla, 2011). Otra terapia en estudio es la utilización de péptidos que regulan la respuesta inmune, como el deca péptido QQPQDAVQPF del trigo *Triticum durum*, que cambia de la

respuesta inmune Th1 a Th2, evitando algunos síntomas de la EC (Capozzi y cols., 2013). O la administración de bacterias que modulan la respuesta inmune, como dos cepas de *Bifidobacterium* que suprimen la respuesta pro-inflamatoria y mejoran la defensa inmune (Medina y cols., 2008). También existen terapias bloqueadoras del reclutamiento de linfocitos, como los inhibidores de la unión CCR9-CCL25, de la integrina $\alpha 4\beta 7$ -MAdCam-1 y de CXCL10-CXCR3. Todos ellos son parejas de quimiocina-receptor, implicadas en la captación de linfocitos (Schupan y cols., 2009; Rashtak y Murray, 2012; Sollid y Khosla, 2011). Otros estudios se basan en la modulación de las citocinas como la IL-15, IL-10 o el TNF- α (Rashtak y Murray, 2012).

Las terapias inductoras de tolerancia e inmunomoduladoras tratan de restaurar la tolerancia oral al gluten mediante la exposición del sistema inmune a diferentes dosis de gluten. Por ejemplo, mediante la administración intranasal de gliadina (Senger y cols., 2003). Otro enfoque distinto es el uso de una cepa probiótica de *Lactococcus lactis* modificada genéticamente, que secreta un péptido desaminado de la gliadina específico para HLA-DQ8. Cuando se administra la bacteria en un ratón transgénico HLA-DQ8, previamente sensibilizado, se obtiene una disminución de la respuesta inmune (Huibregtse y cols., 2009).

3. PROLIL ENDOPEPTIDASAS

3.1. Definición y concepto

Las prolil endopeptidasas (PEP), también conocidas como prolil oligopeptidasas, son una subfamilia de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos de residuos de prolina internos (Gass y Khosla, 2007). La prolina es un aminoácido cíclico que debido a su conformación impone restricciones estructurales a los péptidos en los que se encuentra, otorgando así ciertas propiedades biológicas particulares como por ejemplo la resistencia a la degradación proteolítica. La prolina se encuentra presente en péptidos biológicamente activos implicados en un amplio rango de enfermedades como depresión, Parkinson y EC (Polgar, 2002). Por lo tanto, el interés en poder hidrolizar residuos de prolina tiene una especial relevancia

y no se restringe solo a la EC, sino que ha sido también estudiado para tratar enfermedades neurológicas (Polgar, 2002b).

Las peptidasas se agrupan en familias en base a la similitud de su secuencia, y las familias se agrupan en clanes cuando poseen un ancestro común y una estructura terciaria similar. Las PEP pertenecen a la familia S9 y al clan de las peptidasas SC. La PEP humana fue la primera enzima descubierta, purificada y caracterizada de la familia S9 (Walter y cols., 1971; Koida y Walter, 1976). Se descubrió en 1971 al observar la hidrólisis del enlace peptídico de la oxitocina en el útero humano (Walter y cols., 1971) y se denominó “enzima que corta detrás de la prolina”. Años después se cambió el nombre a prolil endopeptidasa (PEP) y en 1992 se sugirió denominarla prolil-oligopeptidasa debido al tamaño tan pequeño de sus sustratos (IUBMB, 1992). Desde entonces las PEP han sido aisladas de fuentes muy variadas (Venalainen y cols. 2004).

3.2. Características generales

Las PEP hidrolizan el enlace carboxilo de residuos de prolina internos sin falta de una secuencia señal (Yn-Pro-Xn). Su actividad está fuertemente influenciada por el pH. El perfil de pH forma una curva sigmoidea doble, con dos picos de actividad a pH 6 y a pH 8 respectivamente, mostrando una actividad mínima fuera del rango de pH 5-9. Esto se debe a que las PEP poseen dos formas catalíticas diferentes en función del pH, siendo la forma de pH más elevado la predominante fisiológicamente (Polgar, 1991). Su actividad también se encuentra influenciada por la fuerza iónica. Se ha demostrado que un aumento en la concentración de NaCl hasta 0,2 M resulta en un incremento lineal de la actividad enzimática. Resultados similares han sido observados con iones potasio, fosfato y nitrato (Polgar, 1991, Gass y Khosla, 2007).

La estabilidad termal de las PEP es muy variable. Por ejemplo, la PEP de *Pyrococcus furiosus* tiene un óptimo de actividad entre los 85°C y 90°C, y es estable a 4°C y 37°C. Mientras que otras PEP tienen óptimos de temperatura a los 40°C (Gass y Khosla, 2007). En referencia a su estabilidad proteolítica, se ha observado que la

tripsina realiza un corte entre los residuos Lys196-Ser197 de la PEP porcina, justo en la zona flexible del dominio β -hélice enrollada que interacciona con el dominio catalítico. Sorprendentemente, esta forma corta de la PEP porcina muestra mayor actividad a pH bajo que su forma nativa. Este experimento abrió la posibilidad de modificar mediante biología sintética estas enzimas para mejorar su actividad (Polgar y Patthy, 1992).

3.3. Distribución

Se han aislado PEP de organismos tan diversos como eucariotas, eubacterias y archaeas (Venalainen y cols., 2004). En el caso de los eucariotas, las PEP de origen humano y de roedores, son las más estudiadas. La actividad PEP se ha detectado en todos los órganos de los mamíferos, siendo especialmente elevada en el cerebro, donde se ha detectado actividad PEP hasta dos y tres veces más alta que en el resto de órganos (Goossens y cols., 1996; Gass y khosla 2007). El papel fisiológico específico de la PEP en mamíferos es aún desconocido (García-Horsman y cols, 2007).

En procariotas no es una actividad muy frecuente. Hasta el momento se han aislado y caracterizado PEP de diferentes bacterias, siendo muy conocidas las de *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto y cols., 1991), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani y cols., 1993) y *Xbantomonas* sp. (Szwajcer-dey y cols., 1992), todos ellos microorganismos patógenos. En los últimos años se ha avanzado en la caracterización de la PEP de *Sphingomonas capsulata* (PEP Sc) (Kabashima y cols., 1998) y de *Myxococcus xanthus* (PEP Mx) (Gass y cols., 2005) por tratarse de microorganismos no patógenos.

3.4. Aplicación terapéutica en la EC

Tal como se indicó anteriormente, la elevada proporción de residuos de prolina que contiene el gluten le proporciona resistencia frente a los enzimas del TGI (Wieser y cols., 2006). En consecuencia, los péptidos tóxicos e inmunogénicos resultantes de la digestión parcial del gluten, se acumulan en el lumen intestinal y desencadenan la EC (Shan y cols, 2002). En los últimos años se ha propuesto que

una degradación *in situ* de estos péptidos utilizando la actividad PEP, evitaría su acumulación en el duodeno y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad (Gass y Khosla, 2007). Concretamente, se han sugerido la PEP *Sc* y la PEP *Mx* como candidatas ideales para la terapia enzimática oral de la EC (Gass y cols., 2005; Gass y cols., 2007).

Se demostró que la PEP *Mx* es capaz de degradar el péptido inmunogénico 33-mer, tanto *in vitro* como en el lumen intestinal de ratas, generando fragmentos no tóxicos de entre 4 y 7 aminoácidos (Shan y cols., 2004), siendo el sitio de hidrólisis preferente en el extremo carboxilo de la prolina en posición $Y_n\text{-Pro-Tyr-X}_n$. Su pH óptimo es 7, ideal para actuar en las condiciones duodenales donde se desencadena la EC. Además, posee una resistencia relativa a los enzimas gástricos y pancreáticos (Shan y cols., 2004). Sin embargo, PEP *Mx* es muy sensible a las condiciones gástricas (pH bajo y presencia de pepsina), por lo que pierde su actividad a su paso por el estómago (Shan y cols., 2004; Gass y cols., 2005; Fuhrmann y Leroux, 2011). Con la intención de solventar dicha inconveniencia Gass y cols. (2005) diseñaron un sistema de transporte utilizando cápsulas de recubrimiento entérico en las que introducen elevadas cantidades del enzima y comprueban su resistencia al paso por el TGI (Gass y cols., 2005).

PEP *Sc* es activa a unos rangos de temperatura y pH muy amplios, aunque las condiciones óptimas son 43°C y pH 7-8 (Kabashima y cols., 1998). PEP *Sc* es más resistente a las condiciones gástricas (pH y pepsina) que el resto de PEP descritas (Shan y cols., 2004; Ehren y cols., 2008; Kabashima y cols., 1998; Gass y cols., 2007). Sin embargo, aunque posee una elevada especificidad por los péptidos más pequeños del gluten, es incapaz de degradar el péptido 33-mer debido a su elevado tamaño (Gass y cols., 2005). Gass y cols. (2007) realizaron una combinación de PEP *Sc* con la endoproteasa EP-B2 que fue capaz de degradar el gluten en condiciones gastrointestinales demostrando su potencial sinérgico. EP-B2 hidroliza los péptidos más grandes, mientras que PEP *Sc* degrada lo más pequeños (Gass y cols., 2007).

4. BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL)

Las BAL son un grupo microbiano imprescindible en la industria alimentaria debido a su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de una gran variedad de alimentos y bebidas fermentados (de Vos, 2011), siendo responsables de sus propiedades organolépticas y actuando como conservantes naturales (Leroy y de Vuyst, 2004). Además, en los últimos años se ha atribuido a algunas cepas efectos beneficiosos para la salud del hospedador, adquiriendo especial relevancia como probióticos.

4.1. Características generales y clasificación taxonómica

Las BAL son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas que producen ácido láctico como producto mayoritario del metabolismo de carbohidratos. En general, se caracterizan por el bajo contenido en G+C de sus genomas, no son esporuladas, ni pigmentadas, son catalasa negativas, anaerobias aerotolerantes, ácido tolerantes y nutricionalmente exigentes (Axelsson 2004; Carr y cols., 2002). Podemos añadir que las BAL no reducen los nitratos, no licúan la gelatina, no producen indol ni ácido sulfhídrico y poseen actividades enzimáticas como peroxidasa y superóxido dismutasa que permiten su crecimiento en condiciones de aerobiosis (Axelsson 2004; Carr y cols., 2002).

Poseen una elevada ubicuidad natural, pudiendo encontrarse en ambientes tan diversos como la leche y los productos lácteos, vegetales, carne, pescado y otros alimentos fermentados. Cabe destacar que algunas BAL se encuentran en el tracto urinario y gastrointestinal de humanos y animales, donde ejercen efectos beneficiosos, como mejorar la digestibilidad de ciertos alimentos, evitar la colonización por patógenos y actuar como coadyuvantes inmunológicos (Kleerenbezem y Vaughan, 2009).

Desde el punto de vista taxonómico, las BAL son también un grupo heterogéneo. De hecho, se incluyen en dos Phylum diferentes en base al contenido en G+C de sus genomas. Los géneros *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

Carnobacterium y *Weissella* con un contenido en G+C inferior al 50% se incluyen en el Phylum *Firmicutes*. Y los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* que poseen un contenido en G+C superior al 50% pertenecen al Phylum *Actinobacteria* (Axelsson, 2004; Carr y cols., 2002) (**Figura 8**).

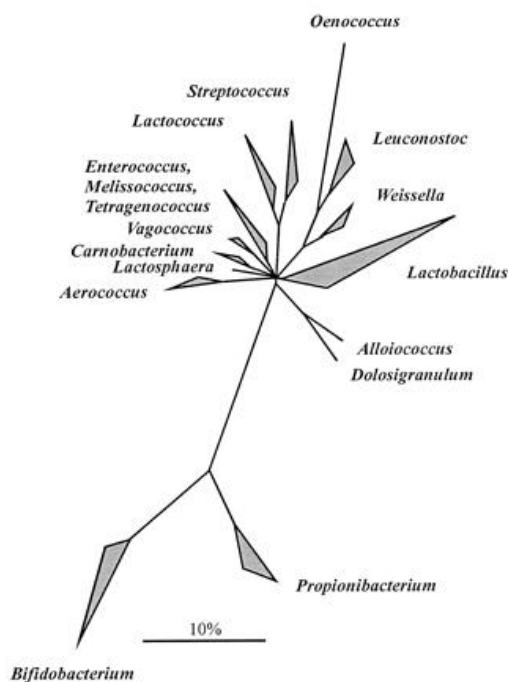


Figura 8. Distribución de los principales géneros de BAL basada en el análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S. Fuente Holzapel y cols. (2001).

Atendiendo a los productos obtenidos durante la fermentación de las hexosas se clasifican en dos grupos. Las BAL homofermentativas, que utilizan la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas produciendo exclusivamente lactato como producto final y las BAL heterofermentativas, que utilizan la ruta 6-fosfogluconato-fosfocetolasa generando además de lactato otros productos como dióxido de carbono, etanol y acetato (Carr y cols., 2002).

Debido a su limitada capacidad biosintética, las BAL son microorganismos muy exigentes nutricionalmente, requiriendo para su crecimiento una fuente de carbono fermentable y factores de crecimientos complejos como vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio y cols., 1994). Además, son auxótrofas para un gran número de aminoácidos, entre 4 y 14 dependiendo de la especie y cepa. En ecosistemas como la leche, la cantidad de péptidos y aminoácidos libres es relativamente baja,

siendo la caseína su principal fuente de nitrógeno. Por lo tanto, han desarrollado un sistema proteolítico eficiente que les permita obtener a partir de la caseína todos aquellos aminoácidos que no pueden sintetizar (Fernández y cols., 2008).

4.2. Sistema proteolítico

El sistema proteolítico de las BAL se puede dividir en tres partes: Proteinasas asociadas a la envoltura celular, sistemas de transporte y peptidasas (**Figura 9**) (Kunji y cols., 1996; Savijoki y cols., 2006).

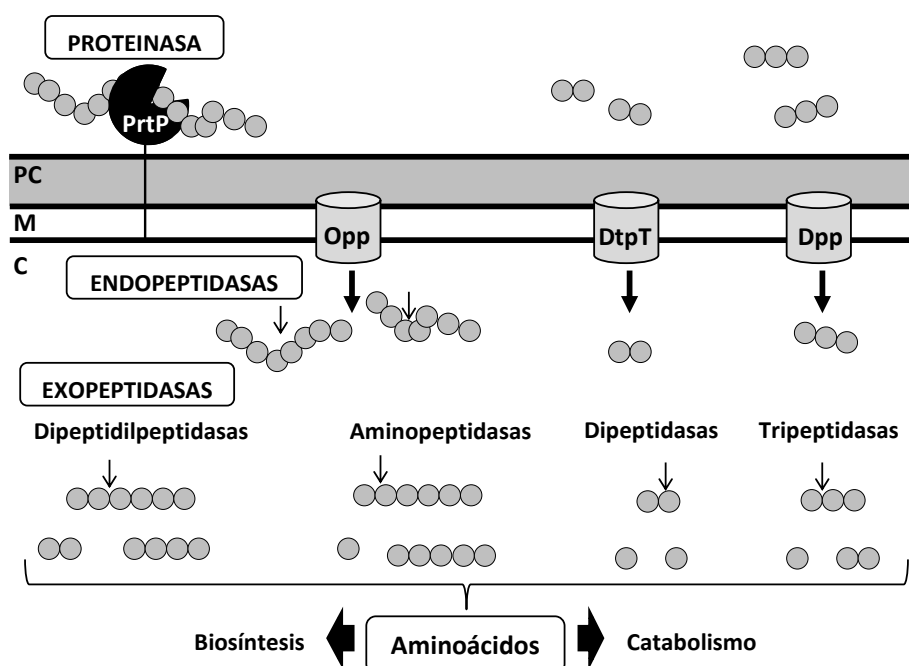


Figura 9. Representación esquemática del sistema proteolítico de las BAL. PrtP, proteínasa asociada a la envoltura celular; Opp, permeasa de oligopéptidos; DtpT, transportador de di y tripéptidos y Dpp, transportador ABC para péptidos; PC, pared celular; M, membrana; C, citoplasma.

4.2.1. Proteinasas

El primer paso en la degradación de proteínas lo realizan las proteinasas asociadas a la envoltura celular (PEC). Se consideran esenciales para alcanzar un crecimiento óptimo en leche. Son proteínas grandes, de unos 200 kDa, pertenecientes a la familia de las serín proteasas tipo subtilisina (familia S8 de serín proteasas). Los genes que codifican estos enzimas, pueden localizarse tanto en

responsables de la unión a ATP (OppF y OppD). En algunas cepas de distintos géneros y especies, este transportador está duplicado.

El sistema de transporte de di- y tri-péptidos hidrofílicos DtpT es dependiente de la fuerza motriz de protones. Está constituido por un polipéptido de 12 segmentos transmembrana, con los extremos C- y N- terminales orientados hacia el interior celular. Es responsable del transporte de di- y tri-péptidos, aunque tiene más afinidad por di-péptidos, y actualmente se ha demostrado que también puede mediar la excreción de péptidos pequeños (Foucaud y cols., 1995).

Por último, el sistema de transporte de di- y tri-péptidos hidrofóbicos DppP, es responsable del transporte de di- y tri-péptidos, aunque presenta mayor afinidad por los tri-péptidos (Savijoki y cols., 2006).

4.2.3. Peptidasas

Una vez que los péptidos han traspasado la membrana citoplasmática, son degradados completamente hasta aminoácidos libres por las peptidasas intracelulares con acciones específicas diferentes. Se dividen en dos grupos en función de su especificidad (**Figura 8**): i) Las endopeptidasas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos y ii) las exopeptidasas que actúan en los extremos terminales (Savijoki y cols., 2006; Kunji y cols., 1996).

Endopeptidasas. Son las encargadas de hidrolizar los enlaces peptídicos internos de los oligopéptidos, generando productos de menor tamaño que serán a continuación sustratos de las exopeptidasas. PepO puede hidrolizar oligopéptidos de hasta 35 aminoácidos, pero es incapaz de degradar la caseína intacta. PepF hidroliza oligopéptidos de entre 7 y 17 residuos. Las endopeptidasas PepE y PepG son cisteín peptidasas que muestran similitud con la aminopeptidasa PepC, pero poseen una especificidad de sustrato diferente. PepE hidroliza sustratos como met-enkefalina y bradiquinina, PepG además, hidroliza sustratos derivados de la paranitroanilida (Christensen y cols., 1999; Fernandez y cols. 2008).

Exopeptidasas. Hidrolizan los enlaces peptídicos situados al final de la cadena de aminoácidos. Se clasifican en función de su especificidad: (i)

Aminopeptidasas que liberan un aminoácido del extremo N-terminal del oligopéptido, (ii) dipeptidasas que hidrolizan dipéptidos, (iii) tripeptidasas que hidrolizan tripéptidos, (iv) dipeptidilpeptidasas que liberan dipéptidos del extremo N-terminal y (v) carboxipeptidasas que liberan un aminoácido del extremo C-terminal del oligopéptido (Christensen y cols., 1999; Fernandez y cols., 2008).

Aminopeptidasas: Se clasifican según su especificidad en cuatro tipos diferentes: i) generales o de especificidad amplia (PepN y PepC); ii) específicas frente a residuos ácidos (PepA) o básicos (RAP); específicas frente a aminoácidos hidrofóbicos (PepL) y/o aromáticos (PepS) y iv) específicas de residuos de prolina (PepI y PepP) (Christensen y cols., 1999).

Dipeptidasas: Son exopeptidasas que hidrolizan exclusivamente dipéptidos y se dividen en dipeptidasas de amplia especificidad (PepV y PepD) y dipeptidasas específicas de prolina (PepQ y PepR) (Kunji y cols., 1996).

Tripeptidasas: Se trata de exopeptidasas que liberan el aminoácido del extremo N terminal exclusivamente de tripéptidos, por ejemplo la tripeptidasa PepT (Fernández y cols., 2008).

Peptidasas específicas de prolina: Debido a la elevada cantidad de residuos de prolina que tiene la caseína, las BAL poseen numerosas peptidasas específicas para este aminoácido. **PepQ** es una prolidasa caracterizada por hidrolizar exclusivamente dipéptidos que contienen prolina en la posición carboxilo terminal (X-Pro). **PepR** es una prolidasa caracterizada por hidrolizar exclusivamente dipéptidos que contienen prolina en la posición amino terminal (Pro-X). **PepP** actúa liberando el aminoácido adyacente a un residuo de prolina, a partir del extremo N-terminal del oligopéptido. **PepI** libera residuos de prolina en el extremo N-terminal de di- y tripéptidos, y de un número limitado de tetra- y pentapéptidos analizados. **PepX** es una dipeptidil aminopeptidasa y es una actividad altamente distribuida en los productos lácteos por lo que ha sido la peptidasa específica de prolina más estudiada. PepX libera dipéptidos X-Pro de sustratos que contengan de tres a siete aminoácidos. Posteriormente enzimas como PepQ que corta dipéptidos X-Pro puede terminar de hidrolizar estos sustratos (Christensen y cols., 1999; Kunji y cols.,

1996; Fernandez y cols., 2008; Savijoki y cols., 2006). El gluten, al igual que la caseína, posee un elevado porcentaje de residuos de prolina, por lo que estas peptidasas son candidatas ideales para degradar los péptidos inmunotóxicos del gluten. Algunos trabajos, como los realizados por De Angelis y cols., (2006, 2009), demuestran la importancia de estas peptidasas para alcanzar una hidrólisis total de los péptidos del gluten.

4.3. Secuenciación masiva de genomas

Las BAL se caracterizan por tener un genoma relativamente pequeño, entre 1,7 Mb en el caso de *Streptococcus thermophilus* y 3,9 Mb en el caso de *L. plantarum*, albergando desde unos 1.600 hasta poco más de 3.000 genes diferentes (Mayo y cols., 2008). Sin embargo, estos genomas tan reducidos se encuentran absolutamente adaptados al nicho ecológico que ocupan. El genoma evoluciona, es plástico y dinámico, y así lo demuestran las BAL con su amplia ubicuidad ecológica debida a la enorme adaptación genómica que poseen. Mediante mutaciones y la transferencia horizontal de genes, modifican su información genética adaptándose a nuevos hábitats y estilos de vida (Broadbent et al 2012; Makarova y cols., 2007; Toh y cols., 2013).

En las dos últimas décadas la secuenciación de genomas completos ha revolucionado y acelerado la investigación científica, con el objetivo de estudiar las características genéticas, bioquímicas y moleculares de las bacterias. En 1999 se secuenció el primer genoma completo de una BAL, *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (Bolotin y cols., 1999). Actualmente, en la base de datos GOLD (Genome Online Database; <http://www.genomesonline.org>) podemos encontrar más de 90 genomas completos de cepas de BAL y más de 300 genomas en proceso de secuenciación. Gracias a este conocimiento, podremos explotar todas sus capacidades metabólicas, potenciando la síntesis de compuestos de interés, el diseño racional de nuevos cultivos iniciadores y mejorar su manipulación genética, con el objetivo de utilizar las BAL como factorías celulares para aplicaciones biotecnológicas nuevas (Mayo y cols., 2008).

4.4. Aplicaciones de las BAL

4.4.1. Uso en alimentos fermentados

Las evidencias más antiguas de la fabricación de alimentos fermentados datan de hace 7.000 años y fueron halladas en Europa central, Polonia (Curry, 2013). La producción de alimentos fermentados se considera uno de los procedimientos de conservación más antiguos y además constituye una fuente inagotable de productos nuevos. Actualmente se engloban más de 3.500 productos elaborados a partir de materias primas como la leche, carne, pescado, frutas, vegetales, raíces y cereales entre los que se incluyen: i) derivados de la leche (p. ej. queso, yogur, kéfir); ii) pan y otros derivados cereales (p. ej. masas fermentadas, ogi); iii) derivados de pescado (p. ej. arenque fermentado, salsas de pescado fermentadas), derivados de vegetales (p. ej. chucrut, kimchi, tempeh), derivados de frutas (p. ej. vino, cerveza, sidra), etc. (Ross y cols., 2002; Steinkraus, 2002; Di Cagno y cols., 2013). Tradicionalmente estas fermentaciones se llevaban a cabo mediante procesos empíricos que a lo largo de las últimas décadas se han ido sustituyendo por procesos altamente controlados, basados en el conocimiento científico.

Las BAL desempeñan un papel muy importante en la elaboración de alimentos fermentados, convirtiéndose en un grupo microbiano imprescindible en la industria alimentaria (de Vos, 2011). Mediante la producción de ácido láctico disminuyen el pH del medio e inhiben el crecimiento de patógenos. Las proteasas y lipasas degradan las proteínas y las grasas, generando sabor y aroma en el producto final. Algunas cepas producen dióxido de carbono y exopolisacáridos, que son importantes para la textura y la reología de algunos productos fermentados. Además, la producción de bacteriocinas y de peróxido de hidrógeno no solo inhibe el crecimiento de otras bacterias patógenas y/o alterantes, sino que pueden provocar la lisis de otros cultivos adjuntos acelerando la maduración del alimento (Leroy y de Vuyst, 2004).

Las BAL forman parte de nuestra alimentación, y se consideran bacterias seguras desde el punto de vista higiénico-sanitario. Muchas especies de BAL se

consideran microorganismos GRAS (Generally Regarded As Safe; *Generalmente reconocidos como seguros*) por la FDA (*Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos*) de los Estados Unidos (Adams y Marteau, 1995) y como QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA (European Food Safety Authority; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (EFSA, 2013).

4.4.1.1. *Los probióticos*

Además de su papel en la fermentación de los alimentos, a algunas cepas se les ha atribuido características probióticas. El término probiótico procede del griego “pro bios” que significa “por la vida”. Se empleó por primera vez en 1960 cuando Lilly y Stillwell observaron que ciertos microorganismos promovían el crecimiento de otros (Lilly y Stillwell, 1965). Posteriormente, el avance en el conocimiento científico desveló que se trataba de microorganismos vivos que beneficiaban al hospedador que los consumía mejorando su equilibrio microbiano intestinal (Fuller, 1989). Actualmente los probióticos se definen como microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso en la salud del consumidor (FAO/WHO, 2002). La mayoría de probióticos administrados en la actualidad pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se emplean otras especies de BAL, y de otros grupos microbianos (*Escherichia coli* y *Bacillus cereus*), incluidas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Kleerebezem y Vaughan, 2009; Ouwenhand y cols., 2002).

La capacidad de producir un efecto beneficioso en la salud del hospedador que define a los probióticos es una característica específica de cepa, que debe de ser validada científicamente para cada caso particular. Se han atribuido numerosos efectos beneficiosos a los probióticos, como por ejemplo la mejora de la digestibilidad de la lactosa y la absorción de calcio, la reducción del riesgo de padecer ciertas diarreas y la competencia con bacterias patógenas en el intestino. Se ha demostrado que algunas cepas producen vitamina K y modulan el sistema inmune (Hardy y cols., 2013). Otros estudios demuestran que algunas cepas probióticas podrían reducir el nivel de colesterol sanguíneo, mejorar el tratamiento y la reducción de alergias, disminuir las infecciones urogenitales y mejorar los

procesos intestinales inflamatorios (Ljungh y Wadström, 2006). De hecho, se ha demostrado en un modelo murino de sensibilidad al gluten que la administración de una cepa de *Lactobacillus casei* es capaz de reducir la enteropatía específica de gliadina, disminuyendo la atrofia vellositaria y mejorando la homeostasis de la mucosa intestinal (D'Arienzo y cols., 2008; D'Arienzo y cols., 2011).

Por todo ello, en los últimos años ha aumentado el interés por los alimentos funcionales, alimentos que contienen componentes biológicos adicionales, con potencial de reducir el riesgo de enfermedad y favorecer la salud (FAO, 2007). Los consumidores prestan más atención a la dieta, a la nutrición y al cuidado de la salud, por lo que estos productos representan un beneficio tanto para el consumidor, como la para industria alimentaria, ofreciendo un valor añadido a sus productos.

4.4.2. *Uso como factorías celulares*

El espectacular desarrollo de la biología molecular en las últimas décadas, permite desarrollar nuevas aplicaciones para las BAL. Debido a sus características y al estatus de bacterias seguras, se propuso su uso como factorías celulares para la producción de compuestos con distintas aplicaciones. Se han utilizado estrategias como la ingeniería metabólica, mediante la cual se modifican genes y rutas metabólicas para incrementar la producción de determinados compuestos, o incluso, para producir nuevos compuestos como es el caso del manitol (Kleerebezem y cols., 2000). En otros casos, las BAL se han utilizado para expresar genes heterólogos de manera eficiente y segura (Hugenholtz y cols., 2002; Wells, 2011; Bermúdez-Humarán y cols., 2013).

En concreto, en los últimos años numerosos estudios se han centrado en el desarrollo de BAL recombinantes como vehículos para el transporte de moléculas terapéuticas y profilácticas a la mucosa intestinal (Daniel y cols., 2011; Wells, 2011; Wells y Mercenier, 2008). Como ya se ha mencionado, las BAL son bacterias GRAS y se utilizan en alimentos fermentados, pero además muchas cepas sobreviven al paso por el TGI, pueden estimular la respuesta inmune en la mucosa provocando la secreción de IgA, inducen respuestas inmunes muy bajas contra ellas mismas, se

pueden administrar como bacterias muertas por vía intranasal, y además, permiten expresar múltiples antígenos simultáneamente, pudiendo desarrollar vacunas multivalentes (Daniel y cols., 2011). Todas estas características hacen de las BAL unas candidatas ideales para el transporte de proteínas heterólogas a la mucosa intestinal. Se ha demostrado la utilidad del género *Lactobacillus* como vehículo de vacunación oral contra diferentes bacterias patógenas como *Borrelia burgdorferi* (del Rio y cols., 2008) y *Yersinia pestis* (der Rio y cols., 2010) o contra virus como el virus Norwalk (Martin y cols., 2004) o rotavirus (Martin y cols., 2011).

Este tipo de aplicaciones requiere el uso de sistemas de clonación de grado alimentario, asegurando además la estabilidad del gen de interés. Por ello, desde los años 90 se han invertido numerosos esfuerzos en el desarrollo de sistemas de grado alimentario en BAL, principalmente en *Lc. lactis*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Peterbauer y cols., 2011), cuyo principal objetivo es evitar las marcas de resistencia a antibióticos y el ADN proveniente de bacterias no consideradas seguras, como por ejemplo los vectores de clonación de *E. coli* (Peterbauer y cols., 2011). Con este fin se han desarrollado vectores de clonación que permiten la integración del gen de interés en el cromosoma de la bacteria hospedadora, sin insertar ADN adicional. La integración de genes en el cromosoma se considera una técnica segura que proporciona una elevada estabilidad a los genes clonados (Petebauer y cols., 2011).

Un ejemplo de un **sistema de clonación de grado alimentario** es el sistema desarrollado por Martin y cols. (2000; 2004; 2011), que permite generar *Lactobacillus* recombinantes de grado alimentario que expresan genes heterólogos integrados establemente en el cromosoma. Este sistema se desarrolla en dos pasos, en primer lugar se integra el gen de interés en el cromosoma hospedador mediante el uso de un plásmido integrativo que no replica en *Lactobacillus*. A continuación, se elimina el ADN de grado no alimentario con un plásmido con origen termosensible, que codifica una β -recombinasa que elimina el ADN indeseado mediante una recombinación sitio específica. Además, los vectores integrativos desarrollados permiten no solo la producción citoplasmática de la proteína codificada, sino que también puede ser secretada al ambiente extracelular o anclada a la superficie externa mediante uniones covalentes o no covalentes (Martin y cols., 2011).

También se han desarrollado diferentes aproximaciones con promotores constitutivos e inducibles. Los promotores constitutivos se usan para obtener una producción constante de la proteína de interés, y los promotores inducibles se activan en respuesta a un agente inductor y son muy útiles cuando la proteína de interés es perjudicial para el hospedador. Kuipers y cols. (1998) han desarrollado uno de los sistemas de expresión génica más importante para su uso en bacterias Gram positivas, el sistema NICE (Nisin-Controlled gene Expression system). Este sistema se basa en el uso de una cepa que contenga los genes *nisRK* del operón de la nisina A, un plásmido que contenga el promotor de la nisina A, y el empleo de nisina A como inductor de la expresión génica (de Ruyter y col., 1996; Mierau and Kleerebezem 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La EC hoy en día representa una de las enfermedades genéticas más comunes a nivel mundial, sin embargo el único tratamiento disponible es seguir una DSG durante toda la vida del paciente, por lo que es necesario y urgente el desarrollo de nuevas terapias alternativas o complementarias a la DSG que mejoren la calidad de vida de los pacientes celíacos. En los últimos años se han propuesto numerosos tratamientos que se encuentran en diferentes fases de investigación. Entre ellos se encuentra la terapia enzimática oral, que se basa en la administración de enzimas específicos capaces de degradar los péptidos del gluten durante el proceso digestivo en el TGI (Bethune y Khosla, 2012). Se propusieron la PEP de *M. xanthus* y la PEP de *S. capsulata* como candidatas (Shan y cols., 2004), sin embargo estos microorganismos no pueden ser incluidos en alimentos. Dado que las BAL son microorganismos reconocidos como seguros, que forman parte de nuestra alimentación y de nuestra microbiota gastrointestinal, junto al hecho de que poseen un sistema proteolítico muy extenso y variado, **en la presente Tesis Doctoral nos propusimos utilizar BAL que sean capaces de hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten como terapia alternativa de la EC.**

Con el fin de alcanzar dicho objetivo se han seguido dos estrategias diferentes, por un lado la búsqueda en nichos ecológicos variados de BAL silvestres que posean dicha capacidad y por otro lado, la generación de BAL recombinantes que sinteticen enzimas con capacidad demostrada de hidrolizar los péptidos

inmunotóxicos del gluten. Para alcanzar este objetivo principal, se propusieron una serie de objetivos parciales:

1. Aislar y caracterizar BAL silvestres capaces de degradar el péptido 33-mer.

- 1.1. Diseñar un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de bacterias capaces de degradar la gliadina.
- 1.2. Identificar y tipificar las bacterias aisladas.
- 1.3. Caracterizar el sistema proteolítico de las BAL aisladas.
- 1.4. Comprobar la capacidad de las cepas seleccionadas de degradar el péptido 33-mer y seleccionar las mejores candidatas.

2. Obtener BAL recombinantes capaces de degradar el péptido 33-mer.

- 2.1. Expresar en *Lc. lactis* bajo el control del promotor de la nisina, genes sintéticos que codifican la PEP *Mx* y la PEP *Sc*.
- 2.2. Optimizar la producción de las PEP en *Lc. lactis* y comprobar la hidrólisis del péptido 33-mer.
- 2.3. Integrar los genes sintéticos de la PEP *Mx* y de la PEP *Sc* en el genoma de *L. casei* mediante un sistema de grado alimentario y de forma que se produzcan intracelular o extracelularmente.
- 2.4. Optimizar la producción de las PEP en *L. casei* y comprobar la hidrólisis del péptido 33-mer.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Las muestras utilizadas en el presente estudio se resumen en la **Tabla 1**. Se emplearon diez muestras de masas de harina fermentada, una de ensilado de trigo y dos de contenido ruminal bovino.

De las masas fermentadas, nueve habían sufrido distintos tipos de procesamiento (casero o industrial), tenían distinta procedencia (España, Italia y Polonia), y su destino era la elaboración de pan, pasta y pizza; de éstas, ocho habían sido elaboradas con harina de trigo y una con centeno. La décima masa fermentada fue elaborada en nuestro laboratorio, para ello se utilizaron 25 g de semillas de trigo trituradas con una picadora Muolinex A320 (Groupe SEB, Lyon, Francia) mezcladas con 25 ml de agua milliQ tibia. El homogeneizado se incubó a 20°C durante 24 h. Este proceso se repitió durante cinco días consecutivos, eliminando cada día la mitad del volumen de la masa, y añadiendo nuevo homogeneizado (Yarza I, 2013).

El ensilado se realizó con semillas de trigo trituradas y fermentadas. Para su preparación se partió de 50 g de semillas de trigo que fueron trituradas utilizando una picadora Moulinex, a continuación se homogeneizaron en 50 ml de una

solución Ringer estéril (Merck) empleando un Stomacher Lab Blender 400 (Seward Ltd., London, UK), durante 3 pulsos de 0,5 min cada uno. Este homogeneizado se incubó en una bolsa de plástico cerrada herméticamente, a temperatura ambiente durante 9 meses.

Las muestras de contenido ruminal se recogieron a partir de dos ejemplares bovinos adultos de raza frisona canulados en el rumen, pertenecientes al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Las muestras, de 50 ml cada una, fueron tomadas a través de la cánula ruminal e incubadas inmediatamente en condiciones de anaerobiosis a 37°C en una campana Mac 500 (Don Whitley, West Yorkshire, UK), en una atmosfera de 10 % (v/v) H₂, 10 % CO₂ y 80 % N₂.

Tabla 5. Características principales de las 13 muestras utilizadas en el presente trabajo.

Tipo	Muestra			
	Organismo de origen	Uso	Procesado	País de procedencia
Masa fermentada	Trigo	Pan	Casero	España
Masa fermentada	Trigo	Pan	Industrial	España
Masa fermentada	Trigo	Pan	Industrial	Italia
Masa fermentada	Centeno	Pan	Industrial	Polonia
Masa fermentada	Trigo	Pasta	Industrial	Italia
Masa fermentada	Trigo	Pasta	Casero A ^a	Italia
Masa fermentada	Trigo	Pasta	Casero B ^a	Italia
Masa fermentada	Trigo	Pizza	Casero A ^a	Italia
Masa fermentada	Trigo	Pizza	Casero B ^a	Italia
Masa fermentada	Trigo	Pizza	Casero C ^a	Italia
Ensilado	Trigo	NA	Casero	España
Contenido ruminal	Vaca 1 ^b	NA	NA	España
Contenido ruminal	Vaca 2 ^b	NA	NA	España

a, A, B y C corresponden con tres fuentes diferentes. b, 1 y 2 corresponden con dos animales diferentes. NA, no aplicable.

2. CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las cepas utilizadas en este trabajo se resumen en la **Tabla 2**. Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados se recogen en las **Tablas 3** y **4**, respectivamente.

Tabla 6. Cepas utilizadas en el presente estudio.

Bacterias	Características relevantes	Fuente
<i>Escherichia</i>		
<i>E. coli</i> DHS11	Usada para clonación general	Gibco-BRL
<i>E. coli</i> CECT 423	Mutante de <i>E. coli</i> K12	CECT 423
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Aislado de saliva humana	Siezen y cols., 2012
<i>L. brevis</i> LMG 11437	Aislado de ensilado	CECT 5354
<i>L. casei</i> BL23	Sin plásmidos	Mazé y cols., 2010
<i>L. casei</i> IPLA1503	Productor intracelular de PEP Mx	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA1504	Productor extracelular de PEP Mx	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA1506	Productor intracelular de PEP Sc	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA1507	Productor extracelular de PEP Sc	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12001	Aislado de masa casera de pan (España)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12003	Aislado de masa casera de pan (España)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12014	Aislado de masa industrial de pan (Polonia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12019	Aislado de masa industrial de pan (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12023	Aislado de masa casera de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12024	Aislado de masa casera C de pizza (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12026	Aislado de masa casera B de pizza (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12027	Aislado de masa industrial de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12030	Aislado de masa industrial de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12032	Aislado de masa industrial de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12034	Aislado de masa casera C de pizza (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12035	Aislado de masa casera A de pizza (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12037	Aislado de masa casera de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12038	Aislado de masa industrial de pan (Polonia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12042	Aislado de masa industrial de pan (Italia)	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12043	Aislado de contenido ruminal bovino A	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12045	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12046	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12047	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12048	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12051	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12052	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12053	Aislado de contenido ruminal bovino B	Este trabajo
<i>L. casei</i> IPLA12055	Aislado de contenido ruminal bovino A	Este trabajo
<i>L. plantarum</i> IPLA88	Aislado de masa industrial de pan (Italia)	Este trabajo
<i>Leuconostoc</i>		
<i>Ln. mesenteroides</i> IPLA12002	Aislado de masa industrial de pan (España)	Este trabajo

<i>Ln. mesenteroides</i> IPLA12012	Aislado de masa industrial de pan (Italia)	Este trabajo
<i>Ln. mesenteroides</i> IPLA12017	Aislado de masa casera B de pasta (Italia)	Este trabajo
<i>Ln. mesenteroides</i> IPLA1218	Aislado de masa industrial de pan (Italia)	Este trabajo
Lactococcus		
<i>Lc. lactis sbs. lactis</i> IL1403	Aislado de producto lácteo	Bolotin y cols., 2001
<i>Lc. lactis sbs. cremoris</i> MG1363	Aislado de producto lácteo	Wegmann y cols., 2007
<i>Lc. lactis</i> NZ9000	Cepa derivada de <i>Lc. lactis</i> MG1363. Posee los genes nisRK	de Ruyter y cols., 1998
<i>Lc. lactis</i> IPLA1510	Productor bajo inducción de nisina de PEP Mx	Este trabajo
<i>Lc. lactis</i> IPLA1509	Productor bajo inducción de nisina de PEP Sc	Este trabajo
Enterococcus		
<i>E. faecalis</i> CECT 481	Cepa tipo	CECT
<i>E. faecium</i> CECT 410	Cepa tipo	CECT
<i>E. durans</i> CECT 411	Cepa tipo, aislada de leche en polvo	CECT
Bacillus		
<i>B. subtilis</i> CECT 461	Genotipo <i>trp2C</i>	CECT
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	Aislado de suelo	DSMZ
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14000	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14001	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14002	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14004	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14006	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14007	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14008	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14009	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14011	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. amyloliquefaciens</i> IPLA14012	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> IPLA14003	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. mojavensis</i> IPLA14005	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
<i>B. mojavensis</i> IPLA14010	Aislado de ensilado de trigo	Este trabajo
Otros		
<i>Streptococcus mitis</i> B6	Aislado de paciente con endocarditis	Denapaité y cols., 2010
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CECT 4549	Aislado de heces de un lactante	CECT
<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	Cepa tipo	CECT
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 401	Cepa tipo	CECT

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España); DSMZ, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares; Mx, *Mycococcus xanthus*; PEP, prolil endopeptidasa, Sc, *Sphingomonas capsulata*.

Tabla 7. Plásmidos utilizados en el presente estudio.

Plásmidos	Características relevantes	Fuente
pUC57- <i>pepMx</i>	pUC57 con <i>pepMx</i> , Ap ^R	Biomedal S.L.
pUC57- <i>pepSc</i>	pUC57 con <i>pepSc</i> , Ap ^R	Biomedal S.L.
pEM76	Derivado de pUC19, A2 int-attP, six, Ap ^R , Em ^R	Martin y cols., 2000
pEM94	pG + host9, gen del enzima β -recombinasa, Cm ^R	Martin y cols., 2004
pUK21	Derivado de pUC, <i>lacZ</i> , Km ^R	Vieira y Messing, 1991
pEM182	Derivado del pEM76, casete pAF100	Martin y cols., 2011
pIJ2925	Derivado de pUC19, <i>lacZ</i> , Ap ^R	Janssen y Bibb, 1993
pNZ8048	Vector de expresión inducible, contiene el P _{nisA} , Cm ^R	De Ruyter y cols., 1998
pEM1214	Derivado de pUK21, promotor del gen <i>apf</i>	Este trabajo
pEM1215	Derivado de pIJ2925, terminador del gen <i>apf</i>	Este trabajo
pEM1253	Derivado de pUK21, promotor y péptido señal del gen <i>apf</i>	Este trabajo
pEM1254	Derivado de pIJ2925, promotor y terminador del gen <i>apf</i> , Ap ^R	Este trabajo
pEM1262	Derivado de pIJ2925, promotor, terminado y péptido señal del gen <i>apf</i> , Ap ^R	Este trabajo
pIPLA1258	Derivado de pEM76, promotor y del terminador del gen <i>apf</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1265	Derivado de pEM76, promotor, terminador y péptido señal del gen <i>apf</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1500	Derivado de pUK21, <i>pep Mx</i> , Km ^R	Este trabajo
pIPLA1501	Derivado de pUK21, <i>pep Sc</i> , Km ^R	Este trabajo
pIPLA1503	Derivado de pIPLA1258, <i>pep Mx</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1504	Derivado de pIPLA1258, <i>pep Sc</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1506	Derivado de pIPLA1265, <i>pep Mx</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1507	Derivado de pIPLA1265, <i>pep Sc</i> , Em ^R	Este trabajo
pIPLA1509	Derivado de pNZ8048, <i>pep Sc</i> , P _{nisA} , Cm ^R	Este trabajo
pIPLA1510	Derivado de pNZ8048, <i>pep Mx</i> , P _{nisA} , Cm ^R	Este trabajo

A2 int-attP, integrasa y zona de integración del fago A2, Ap^R, resistencia a ampicilina, Cm^R, resistencia a cloranfenicol, Km^R resistencia a kanamicina, *apf*, gen que codifica el factor de promoción de la agregación de *Lactobacillus crispatus*; *pep*, gen que codifica el enzima protil endopeptidasa, Mx, *Mycococcus xanthus*, P_{nisA}, promotor inducible por nisina A, Sc, *Sphingomonas capsulate*.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Oligonucleótidos	Secuencia	Fuente
att1	5'-AGCAGGACGAGAAAGCAATGAATGT-3'	Alvarez y cols., 1998
att7	5'-GCCGGTGTGGCGGAATTGGCAG-3'	Alvarez y cols., 1998
1492R	5'-ACCTTGTTACGACTT-3'	Lane y cols., 1991
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Lane y cols., 1991
gyrA_1066R	5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'	Roberts y cols., 1994
gyrA_47F	5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3'	Roberts y cols., 1994
Papf-BglIIF	5'-GAAGATCTGGATAAGGCAGAATAATGGAAT-3'	Este trabajo
PapfSP-NcoIR	5'-ACCTGGGCATCCATGGCCGGCTGGG-3'	Este trabajo
Papf-NcoIR	5'-GATTTAATTTCCATGGAAATTCTCTCC-3'	Este trabajo
term-XbaIF	5'-GGGTCTAGAGAGGAGCTCTCAACTGTAAG-3'	Este trabajo
term-EcoRIR	5'-CGGAATTCCTGAACCGTTTGTGGTGTGCGTTT-3'	Este trabajo

3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Bacillus* se crecieron rutinariamente a 37°C con agitación (250 rpm) en el medio descrito por Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951). En los experimentos de clonación y otras técnicas recombinantes se utilizó la cepa *E. coli* DHS11. Para seleccionar los transformantes de *E. coli* se añadió el antibiótico apropiado al medio de cultivo: 100 µg ml⁻¹ de ampicilina (Sigma) o 50 µg ml⁻¹ de kanamicina (Sigma). En los casos en que se requería inducción y detección de la actividad β-galactosidasa se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Thermo) 0,5 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactopiranosido (X-Gal) (Thermo) 80 µg ml⁻¹.

El género *Lactococcus* se creció a 32°C sin aireación en el medio M17 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) suplementado con glucosa (5 g l⁻¹) (GM17). Para seleccionar los transformantes se añadió 5 µg ml⁻¹ de cloranfenicol (Sigma) al medio de cultivo.

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* se crecieron a 37°C en condiciones estáticas en el medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid). La selección de transformantes se realizó suplementando el medio con los antibióticos

apropiados, 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de eritromicina (Sigma) o 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cloranfenicol (Sigma). Durante el cribado de las muestras, el medio MRS se suplementó con maltosa (5 g l^{-1}) (MRSm) para realizar el recuento total de lactobacilos, y con cicloheximida 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Sigma) para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras. Cuando fue necesario el medio se suplementó con treonina (40 mM) (Sigma), glicina [1 % (p/v)] (Affymetrix-USB, High Wycombe, Reino Unido) o cisteína (0,5%) (VWR, Barcelona, España). En algunos casos fue necesario el crecimiento de los lactobacilos en una fuente de carbono determinada, para ello se utilizó un medio base, el CFB, que contenía extracto de carne bacteriológico (Lamb Lenco), 8 g l^{-1} (Oxoid); extracto de levadura, 4 g l^{-1} (Bioser, Barcelona, España); fosfato dipotásico, 2 g l^{-1} (Merck, Darmstadt, Alemania); citrato de amonio, 2 g l^{-1} (Applichem, Darmstadt, Alemania); acetato de sodio, 5 g l^{-1} (Sigma); sulfato de magnesio, 0.2 g l^{-1} (Panreac, Barcelona, España); sulfato de manganeso, 0.04 g l^{-1} (Panreac) y Tween 80, 1ml l^{-1} (Amresco, solon, USA). Este medio CFB base se suplementó con la fuente de carbono necesaria en cada caso: glucosa, lactosa o maltosa a una concentración final del 0,5%.

Los *Leuconostoc* se crecieron rutinariamente a 32°C sin aireación en MRS. Las cepas pertenecientes al género *Enterococcus* se crecieron a 37°C sin aireación en GM17.

La cepa de *B. bifidum* se creció a 37°C en anaerobiosis en el medio MRS suplementado con L-cisteína 0,25% (p/v) (Sigma). La cepa de *S. mitis* se creció a 37°C en condiciones estáticas en Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid).

El recuento total de bacterias durante el cribado de las muestras, se realizó en el medio Plate Count Agar (PCA) (Merck) con cicloheximida 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Para realizar el test de resistencia a antibióticos se utilizó el medio LSM, compuesto por 90% de medio isosensitest (Oxoid) y 10% de MRS.

Para aislar bacterias capaces de degradar la gliadina, se diseñó un medio que contiene gliadina como única fuente de nitrógeno. Este medio, denominado AHG-M, consta de dos soluciones: un medio base químicamente definido (**Tabla 5**) y un hidrolizado ácido de gliadina (AHG; *Acid Hydrolyzed Gliadin*). El AHG se preparó a

partir de una solución de 3 ml de gliadina (100 mg ml^{-1}) (Sigma, Madrid, España) en HCl 2,5 N (pH 2,0), que se mezcló bien y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se neutralizó con NaOH (2 N) (pH 5,5-6,5), se añadió etanol (60% v/v) hasta alcanzar un volumen final de 20 ml ($15 \text{ mg gliadina ml}^{-1}$) y la mezcla se incubó una hora a 37°C con agitación fuerte (250 rpm). La solución resultante constituye el AHG. El medio AHG-M se obtuvo mezclando 20 ml de la solución AHG con el medio base químicamente definido (**Tabla 5**) en un volumen total de 500 ml. La concentración final de gliadina fue de $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$. Durante el cribado de las muestras, el medio AHG-M se suplementó con cicloheximida $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras.

Tabla 9. Composición del medio base químicamente definido (volumen final de 500 ml)^a

Solución salina ^b		Fuente de carbono	Vitaminas (pH 6,8) ^c		
Na ₂ HPO ₄	3 g	Glucosa	2,5 g	ácido p-aminobenzoico	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g			inosina	0,25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g			ácido orótico	0,25 g
AcNa	1 g			piridoxamina-HCl	0,25 g
NaCl	0,5 g			timidina	0,25 g
MgCl ₂	0,1 g			D-biotina	0,125 g
CaCl ₂	0,005 g			ácido lipoico	0,125 g
Na ₂ SO ₄	0,005 g			piridoxina-HCl	0,1 g
FeCl ₃	0,0003 g			ácido fólico	0,05 g
				ácido nicotínico	0,05 g
				ácido pantoténico	0,05 g
				riboflavina	0,05 g
				tiamina-HCl	0,05 g
				vitamina B12	0,05 g

^a Cuando fue necesario medio sólido se añadió agar al 2% (p/v).

^b Composición de Miladinov y cols., (2001).

^c Añadir después de autoclavar.

Los medios sólidos se prepararon con agar al 2 % (p/v) (Oxoid).

El seguimiento del crecimiento bacteriano se realizó mediante medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros (DO_{600}) en un Biofotómetro (Eppendorf).

La cuantificación de viables se realizó mediante recuento del número de unidades formadoras de colonia (ufc). Para ello, se realizan diluciones seriadas de los cultivos utilizando una solución salina de NaCl (0,85 %), las diluciones se sembraron en placas con medio sólido y se incubaron en las condiciones apropiadas. Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de cultivos líquidos en fase logarítmica de crecimiento mezclados con glicerol al 25 % (v/v).

3.1. Cultivo en fermentador

Para estudiar el efecto del pH en la actividad PEP extracelular, las cepas se cultivaron a diferentes valores de pH en un biorreactor Sixfors (Infors AG, Bottmingen, Suiza). El registro de los datos y el control del biorreactor se llevaron a cabo con el programa Iris NT5 (Infors). Los recipientes del fermentador se autoclavaron y se rellenaron con 400 ml de medio CFB [0,5 % glucosa (p/v)]. A continuación, se inocularon al 1% con los cultivos celulares de cada cepa, previamente crecidos durante 16 h a 37°C en 10 ml de MRS. Las fermentaciones se llevaron a cabo a diferentes valores de pH: 5, 6 y 7 y a pH libre. El control del pH se realizó mediante la adición automática de NaOH (2N). Se mantuvo una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una agitación de 50 rpm durante todo el proceso. Los cultivos se crecieron durante 24 horas. Se recogieron muestras (10 ml) a las 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 horas para realizar los ensayos de actividad PEP. Además, a las 22 horas se recogieron muestras para los experimentos de hidrólisis del péptido 33-mer (10 ml) y para precipitar las proteínas del sobrenadante (100 ml).

3.2. Inducción del promotor de la nisina A

Las cepas recombinantes de *Lc. lactis* construidas en el presente trabajo tienen el gen que codifica la PEP clonado bajo el control del promotor inducible por nisina, con lo que para conseguir la expresión del gen es necesaria la presencia de

nisina en el medio de cultivo. Para llevar a cabo la inducción del sistema, las cepas se crecieron a 32°C en 10 ml de GM17 con cloranfenicol (5 µg ml⁻¹) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4 – 0,5 (aproximadamente 3 h). A continuación se añadieron diferentes concentraciones de nisina A (0, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 ng ml⁻¹) (Sigma) al medio de cultivo y se incubaron a 32°C recogiendo muestras durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h).

4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

Para realizar el análisis microbiológico de las muestras, se homogeneizaron en solución Ringer y se sembraron en varios medios de cultivo para a continuación realizar el recuento de viables.

En las masas fermentadas, se tomaron 10 g de cada muestra y se homogeneizaron durante 5 min en 90 ml de Ringer con un Stomacher Lab Blender 400. En las muestras de contenido ruminal se recogieron alícuotas de 50 ml y se homogeneizaron con bolas de vidrio (5 mm diámetro) (Sigma) y agitación fuerte durante 5 min. La muestra de ensilado de trigo se rehidrató y homogeneizó con 50 ml de Ringer, se inoculó en AHG-M caldo (1 % v/v) y se incubó durante 48 h a 32°C en aerobiosis.

Una vez homogeneizadas las muestras, se realizaron diluciones seriadas en Ringer, de las cuales se sembraron 50 µl en PCA, en MRSm y en AHG-M. Además, a partir de los distintos homogeneizados, se realizaron cultivos de enriquecimiento en AHG-M caldo (1 % v/v) y se incubaron durante 24 h sin aireación. Tras la primera y la segunda ronda de enriquecimiento, se prepararon diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de MRSm y AHG-M. Los medios de cultivo fueron suplementados en todo momento con cicloheximida (50 µg ml⁻¹) para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. Para las muestras de rumen se suplementaron además con 0,5% de cisteína, un agente reductor que promueve la condición de anaerobiosis.

Tanto los cultivos líquidos como los sólidos fueron incubados en tres condiciones diferentes: en aerobiosis a 32°C, en aerobiosis a 37°C y en anaerobiosis

a 37°C. Tras la incubación se realizó el recuento de ufc en aquellas placas que contenían entre 30 – 300 colonias bien separadas.

5. RESISTENCIA AL PASO POR EL TRACTO GASTROINTESTINAL

Se estudió la supervivencia de las cepas al paso por el TGI utilizando un modelo de simulación de las condiciones gastrointestinales *in vitro* descrito por Fernández de Palencia y cols. (2008) con algunas modificaciones.

En primer lugar se prepararon las suspensiones celulares resuspendidas en diferentes matrices: leche, MRS y solución salina. Para ello, los cultivos celulares se crecieron durante 16 h a 37°C en 30 ml de MRS. Se centrifugación (15 min 3.000 g), se lavaron dos veces con NaCl al 0,85% (p/v) y se resuspendieron en un volumen de la matriz correspondiente: leche desnatada en polvo reconstituida al 10% (Oxoid), MRS o una solución salina que contenía 6,2 g l⁻¹ NaCl, 2,2 g l⁻¹ KCl y 1,2 g l⁻¹ NaHCO₃.

A continuación, estas suspensiones celulares se sometieron a las condiciones simuladas *in vitro* del TGI. Se mantuvo una temperatura de 37°C durante todo el proceso para simular la temperatura corporal humana. Para comenzar se añadió 0,1 % (p/v) de lisozima imitando la saliva humana. El estrés gástrico (G) se simuló añadiendo pepsina (Sigma) al 0,3 % (p/v) y disminuyendo el pH cada 20 minutos (pH 5, pH 4,1, pH 3, pH 2,1 y pH 1,8). El estrés gastrointestinal (GI) se ensayó tras el estrés G en las muestras provenientes de los pH 5, 4,1 y 3. Para simular la digestión del intestino delgado se añadieron sales biliares (0,3 % p/v), un coctel de enzimas pancreáticos [1 mg ml⁻¹ de amilasa, 1 mg ml⁻¹ de tripsina y 1 mg ml⁻¹ de quimiotripsina (Shan y cols., 2004)] a una concentración final de 5 µg ml⁻¹ y se subió el pH a 6,5 y se incubaron durante 20 y 120 minutos en las condiciones GI. Se recogieron muestras en cada condición y se realizaron diluciones seriadas en una solución salina de NaCl al 0,85% (p/v). Las muestras se sembraron en MRS y se realizó el recuento de viables tras incubar las placas durante 48 h a 37°C.

Para verificar la capacidad de continuar secretando PEP en las cepas de *Lactobacillus* recombinantes, se recuperaron las muestras de las condiciones GI y se

inocularon en 5 ml de medio fresco CFB durante 4 y 6 h a 37°C. Pasado este tiempo, se ensayó la actividad PEP en el sobrenadante.

6. RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para realizar el test de resistencia a antibióticos en las cepas seleccionadas, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada cepa a ocho agentes antimicrobianos mediante el método de microdilución en caldo descrito por Huys y cols. (2008) con algunas modificaciones. En primer lugar, para cada cepa se preparó una placa de microtiter de 96 pocillos, donde cada fila contiene un antibiótico distinto (ocho en total) (**Tabla 6**). A partir de cada antibiótico, se prepararon diez diluciones seriadas a la mitad en NaCl al 0,85% (p/v) y a cada dilución se le añadió 4 volúmenes del medio LSM. Se agregaron 100 µl de cada dilución en la placa microtiter tal y como indica la **Tabla 6**. Las columnas 11 y 12 se utilizaron como controles, sin antibiótico y sin antibiótico ni inóculo, respectivamente. Una vez finalizadas se almacenaron a 4°C. Se determinó la CIM de los siguientes agentes antimicrobianos: ampicilina, clindamicina y penicilina (de 0,03 a 16 µg ml⁻¹), eritromicina (de 0,16 a 8 µg ml⁻¹), estreptomycin y gentamicina (Fluka, biochemika) (de 0,5 a 256 µg ml⁻¹), tetraciclina y cloranfenicol (de 0,12 a 64 µg ml⁻¹) (todos de Sigma).

Para preparar los inóculos, las cepas se sembraron en estría en el medio LSM agar y se incubaron en las condiciones apropiadas para cada cepa durante 48 h. A continuación, se resuspendió una colonia aislada en un tubo con 2 ml de solución salina NaCl al 0,85% (p/v) hasta obtener una densidad equivalente a 1 en la escala de McFarland (DO₆₀₀=0,16–0,2). Esta suspensión se diluyó 1:1000 para obtener una concentración final de 3 x 10⁵ ufc ml⁻¹. Se inocularon 100 µl en cada pocillo, obteniendo finalmente 1,5 x 10⁵ ufc ml⁻¹ (1,5 x 10⁴ ufc/pocillo).

Tras 48 h de incubación en las condiciones apropiadas para cada cepa, se leyeron los resultados. La última concentración en la que se observó crecimiento al fondo del pocillo fue la CIM. Para confirmar los resultados, se preparó una solución de púrpura de bromocresol en agua al 0,04 % (p/v) y se añadió una gota a cada

pocillo. Se trata de un indicador de pH de color morado a pH 6,8 (el pH del medio) y torna a color amarillo a partir de pH 5,2.

Tabla 10. Representación esquemática de una microplaca utilizada para determinar la CIM de ocho agentes antimicrobianos. La adición de 100 μl /pocillo genera la concentración señalada en cada casilla ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Am 16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	P	N
B	Pc 16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	P	N
C	Cl 16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	P	N
D	Gm 256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	P	N
E	Sm 256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	P	N
F	Tc 64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	P	N
G	Cm 64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	P	N
H	Em 8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,16	P	N

Los números corresponden a la concentración final de antibiótico en cada pocillo ($\mu\text{g ml}^{-1}$) tras añadir 100 μl /pocillo. P, contiene el diluyente utilizado para preparar el correspondiente agente antimicrobiano. N, contiene el diluyente utilizado para preparar el correspondiente agente antimicrobiano, no se inocula. Ap, ampicilina; Pc, penicilina; Cl, clindamicina; Gm, gentamicina; Sm, estreptomycinina; Tc, tetraciclina; Cm, cloranfenicol; Em, eritromicina.

7. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

7.1. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el método de lisis alcalina (Green y Sambrook, 2012). Para el género *Lactococcus* la preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo según el método descrito por O'Sullivan y cols. (1993), y para el género *Lactobacillus* se realizó según Scheirlinck y cols. (1989).

7.2. Extracción de ADN genómico

Dependiendo de la aplicación posterior del ADN, se siguieron diferentes protocolos de extracción.

Para los experimentos de hibridación ADN-ADN, la extracción del ADN cromosómico de *Lactobacillus* se realizó mediante el método kirby con algunas modificaciones. Se partió de 10 ml de cultivo suplementado con glicina al 1 % (p/v) que fue centrifugado (8.000 g 10 min), lavado con una solución de STE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, sacarosa 0,3 M; pH 8,0) y resuspendido en 400 µl de STE con lisozima (30 mg ml⁻¹) (Sigma), mutanolisina (500 U ml⁻¹) (Sigma) y RNAsa (250 µg ml⁻¹) (Sigma). Tras una incubación a 37 °C durante 1 hora se siguió con el protocolo descrito por Hopwood y cols., (1985).

La obtención de ADN para la identificación de los aislados mediante PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito por Ruíz-Barba y cols., (2005).

La extracción de ADN cromosómico de la cepa *L. casei* IPLA12038 para secuenciar su genoma, se realizó utilizando el kit *DNeasy^R Blood & Tissue* (Qiagen, Madrid, España).

7.3. Visualización de fragmentos en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa en un rango de porcentajes que oscilaron entre el 0,6 % al 1,2 % (p/v) en función de los tamaños esperados. Se utilizó el tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8) como electrolito. Previamente a su carga en el gel, a las muestras se les añadió una mezcla densificante (0,25 % de azul de bromofenol y glicerol 50 % en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V. El ADN presente en los geles se visualizó por exposición a la luz UV en un equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, California, USA) tras su tinción con una solución de bromuro de etidio (1 µg ml⁻¹) en agua. Como patrones de peso molecular se utilizó el Gene Ruler™ DNA ladder mix (Thermo, Madrid, España).

7.4. Purificación de fragmentos de ADN

Dependiendo de la procedencia de los fragmentos de ADN, se utilizaron diferentes métodos de purificación. Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa se utilizaron los kits QIAquick gel extraction kit (Qiagen) y ATP Gel/PCR DNA fragment extraction kit (ATP Biotech, Taipei, Taiwan).

Cuando se trataba de productos de amplificación se utilizó el kit GenElute bacterial genomic DNA kit (Sigma-aldrich). Todos ellos se utilizaron siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.5. Tratamientos enzimáticos del ADN

Los tratamientos enzimáticos con fosfatasa alcalina, digestiones con endonucleasas de restricción y otras manipulaciones, se realizaron de acuerdo con procedimientos recomendados por los suministradores.

7.6. Transferencia de ADN a membranas e hibridación

La comprobación de la correcta construcción de las cepas de grado alimentario realizadas en el presente trabajo se llevó a cabo mediante experimentos de hibridación. Esta técnica permite localizar secuencias específicas en el ADN de una cepa, que se encuentra fijado en membranas de nitrocelulosa.

7.6.1. Transferencia de ADN a membranas o “Southern blotting”

En este proceso, el ADN contenido en el gel de agarosa se desnaturaliza, se transfiere y se fija a una membrana de nylon (Hybond-N, GE) (Green y Sambrook, 2012). Para ello, el gel se somete a lavados sucesivos con soluciones depurinizante (HCl 0,25N), desnaturalizante (NaOH 0,5M/NaCl 1 M) y neutralizante (NaCl 3M/Tris HCl 0,5M; pH8). La transferencia se llevó a cabo por capilaridad empleando papel absorbente y un peso. La fijación del ADN a la membrana se realizó mediante la exposición a luz ultravioleta durante 2 minutos.

7.6.2. Marcaje de sondas

Las sondas se obtuvieron mediante un marcaje con digoxigenina utilizando el kit DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor.

7.6.3. Hibridación

Tanto la prehibridación como la hibridación del ADN fijado en la membrana de nylon con el ADN sonda, se realizaron a 60° C utilizando el kit “DNA Labelling and Detection Kit” (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante. El revelado se realizó mediante fluorescencia con el reactivo “CDP-Start Detection System” (Roche) de forma que, en aquellos puntos de la membrana donde la sonda se haya unido a un fragmento de ADN que contenga una parte o todo el gen que buscamos, se visualizará una banda oscura.

7.7. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)

Con el objetivo de extraer el ADN de los aislados y tipificarlos mediante PFGE, se partió de 1,5 ml de cultivo (suplementado con treonina 40 mM) en fase estacionaria y se centrifugó a 8.000 g durante 10 min. A continuación se lavó dos veces con 500 µl de la solución STE-100 (EDTA 100mM, Tris-HCl 100 mM, sacarosa 0.3M) y se resuspendió en 500 µl de STE-100 con 1 µl de mutanolisina (150 U µl⁻¹). Las suspensiones celulares se incubaron durante 30 min a 37°C. A 200 µl de esta suspensión se le añadieron 240 µl de agarosa al 1,8% (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) en agua a 50°C. Se tomaron 200 µl de esta mezcla y se pipetearon en pequeños moldes donde se dejaron solidificar a 4°C. Posteriormente, los bloques de agarosa se incubaron en 2 ml de una solución de lisis que contenía Tris-HCl 6 mM (pH 8), NaCl 1M, EDTA 100 mM, L-lauroilsarcosina 0,5 % (p/v) (Merck), ácido desoxicólico (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania), Brij 58 0,5 % (p/v) (Merck) y lisozima (2 mg ml⁻¹) durante 2 h a 37°C. Pasado este tiempo, los bloques se transfirieron a una solución ESP [EDTA 0,5 M, N-lauroilsarcosina 0,5 % (p/v) y proteinasa K (1 mg ml⁻¹) (Roche, Basel, Suiza)] y se incubaron toda la noche a 55°C. Para eliminar la solución ESP, los bloques fueron equilibrados durante 15 min a 50°C con TE (EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM) y fluoruro de metilfenilsulfonilo 1 mM (Roche) y a continuación, cinco veces más con TE durante 15 min a 50°C cada una. Los bloques se almacenaron en 1 ml de EDTA 0,5M (pH 8) a 4°C hasta su posterior utilización.

Se partió un cuarto de cada bloque de agarosa y se lavaron con 200 µl de TE. A continuación se trataron con la endonucleasa *Sfi*I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) para el género *Lactobacillus*, *Apa*I para *Leuconostoc* y *Sma*I para *Bacillus*. El PFGE se realizó usando un CHEFDR III Systemat a 14 °C (Bio-Rad) en un gel de agarosa al 1 % (p/v) en 0,5x TBE a 4,5 V cm⁻¹, utilizando pulsos de 0,5 a 25 s durante 12 h y de 25 a 50 s durante 6 h. Por último el ADN se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó por exposición a la luz UV.

7.8. Análisis cluster

El árbol filogenético y análisis cluster de los diferentes patrones de bandas obtenidos con la técnica de PFGE se realizaron con el software Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK) y con el software Multi-Variate Statistical Package (MVSP, Kovach Computing Services, Anglesey, Wales).

7.9. Electrotransformación

La introducción de plásmidos en las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante electroporación utilizando un equipo Gene Pulser Xcell Microbial System (Bio-Rad). La preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* y las condiciones de electroporación fueron las descritas por Dower y cols., (1988). Las células electrocompetentes de *Lc. lactis* se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por de Vos y cols., (1989). Y para el género *Lactobacillus* se siguió el protocolo descrito por Wei y cols., (1995).

7.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de una suspensión de ADN (0,25 ng reacción), o bien directamente de colonia. Salvo especificación diferente, la mezcla contenía el enzima “*Taq DNA polymerase*” (Eppendorf. Hamburgo, Alemania) o el enzima “*Dream taq*” (Fermentas), con su solución correspondiente, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), los cebadores oportunos (0,4 µM) y el ADN molde, según las especificaciones del suministrador. Las reacciones se llevaron a cabo empleando los termocicladores *iCycler*TM o *myCycler*TM thermal cycler

(Bio-Rad). En todas las reacciones en las que fue posible se incluyó un control positivo y siempre un control negativo (sin ADN molde). Los cebadores se sintetizaron en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos de MACROGEN (Seoul, Korea), la secuencia de los cebadores utilizados se encuentra expuesta en la **Tabla 4**. La pareja de oligonucleótidos att1/att7 se empleó para comprobar la correcta integración del gen que codifica la PEP en el cromosoma de la bacteria hospedadora. Los cebadores 1492R/27F se utilizaron para identificar molecularmente los aislados, secuenciando el gen codificante de la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr). Los oligonucleótidos gyrA_1066R/gyrA_47F se emplearon para identificar la especie de los aislados pertenecientes al género *Bacillus*, mediante la secuenciación del gen *gyrA*. El resto de cebadores presentados en la **Tabla 4** se utilizaron para construir los plásmidos integrativos que contienen secuencias específicas del gen *apf* de *Lactobacillus crispatus*.

El programa de amplificación (salvo indicación contraria) se inició con la desnaturalización a 95°C durante 6 min, seguida de 35 ciclos de amplificación cada uno basado en 30 seg a 94°C, 30 seg a la correspondiente temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos (T_m) y un periodo de elongación a 68°C o 72°C (dependiendo del enzima utilizado) cuya duración dependía del tamaño del fragmento esperado (1 min por cada kb de fragmento a amplificar). Finalmente un periodo final de extensión a 68°C o 72°C durante 10 min. Las T_m de los oligonucleótidos fueron entre 5 y 10°C inferiores a la T_m teórica calculada por el proveedor comercial.

7.11. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

La secuenciación de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN MACROGEN. Las secuencias fueron leídas con el programa Chromas (v 1.45) y ensambladas y analizadas utilizando los programas Clone Manager Suite 7 y BioEdit. El programa BLAST fue utilizado para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos (Altschul y cols., 1997). Para la construcción de los mapas genéticos de los

plásmidos utilizados en el presente trabajo se utilizaron los programas Clone Manager Suite 7 y Plasmid Map Enhancer.

7.12. Ensamblaje y análisis del genoma

A partir del ADN genómico total de la cepa *L. casei* IPLA12038 se construyó una librería genómica de 0,5 kbp que se secuenció en extremos emparejados de 90 pb cada uno, utilizando un secuenciador HiSeq 1000 system (Illumina) en el Instituto de Genómica Beijing (China). Las lecturas se filtraron por calidad y se ensamblaron utilizando el software Velvet (<https://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>). Los extremos de los contigs se elongaron utilizando el software SSPACE v1.0 (Warren y cols., 2007; Boetzer y cols., 2011). Las discontinuidades existentes se cerraron con el software GapCloser. La ordenación y orientación de los contigs se realizó con el software CONTIGuator (Galardini y cols., 2011) y se visualizó con el software ACT (Artemis Comparison Tool) (Carver y cols., 2005). La alineación de los genomas de *L. casei* se realizó con el software Mauve (Aaron y cols., 2010). La anotación se realizó con el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz y cols., 2008).

7.13. Optimización del uso de codones

Los genes que codifican para la PEP *Mx* y la PEP *Sc* (disponibles en la base de datos del NCBI con los número de acceso AAD31004 y BAA34052.1 respectivamente) se sintetizaron en base al uso de codones del género *Lactobacillus*, mejorando así la eficiencia de la traducción génica (la secuencia del gen sintético de la PEP *Mx* se encuentra disponible en la base de datos del NCBI con el número de acceso HG321354). En las **Figuras 54** y **55** del apartado de material suplementario se muestra la secuencia de los genes sintéticos y las secuencias aminoacídicas correspondientes, así como el codón de inicio y de terminación y los sitios de restricción más relevantes. Los genes fueron sintetizados por Biomedal S.L. (Sevilla, España).

8. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEINAS

8.1. Ensayos enzimáticos

8.1.1. Obtención de extractos celulares

Para realizar los ensayos enzimáticos, así como para visualizar las proteínas en geles de poliacrilamida, se empleó el extracto libre de células (ELC) de los cultivos celulares. El protocolo de obtención del ELC fue diferente para los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

Para la obtención del ELC en el caso del género *Lactococcus*, las cepas se crecieron en 10 ml de GM17 a 32°C durante 18 h, los cultivos celulares se recogieron mediante centrifugación (8.000 g durante 10 min), se lavaron dos veces en tampón fosfato 50 mM (pH 7,5), NaCl 0,2M y se resuspendieron en 500 µl del mismo tampón. Se rompieron con 200 mg de bolas de vidrio (<math><10^6 \mu\text{m}</math>) (Sigma) utilizando el equipo Bio101 Fast Prep (Q-Biogen) mediante 6 tratamientos de 30 seg con intervalos de 1 min en hielo entre cada tratamiento. Las bolas y restos celulares fueron eliminadas mediante centrifugación (10.000 g a 4 °C durante 30 min) y los resultantes ELC fueron ensayados inmediatamente.

Para la obtención del ELC en el género *Lactobacillus*, se partió de cultivos crecidos en 20 ml de MRS a 37°C durante 18 h. Se recogieron mediante centrifugación (8.000 g durante 10 min), se lavaron dos veces en el tampón correspondiente a la actividad enzimática que se fuera a ensayar, y se resuspendieron en 2 ml del mismo tampón. A continuación, las células se rompieron usando una French Press a 2,3 kba (Constant Cell Disruption Systems [Low March, Daventry, Northants, UK]). Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 30 min y los ELC se utilizaron para hacer los ensayos inmediatamente.

8.1.2. Medida de actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática se utilizaron sustratos específicos para cada enzima. En la mayor parte de los casos fueron pequeños péptidos sintéticos

que contienen el cromógeno para-nitroanilida (*p*-NA) ligado al aminoácido C-terminal. La hidrólisis de este enlace por la peptidasa adecuada y la consecuente liberación de *p*-NA producen color amarillo, cuya intensidad se midió espectrofotométricamente a 410 nm. En el caso de la actividad Prolidasa (PepQ) se utilizó el cromógeno ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno), que reacciona con el grupo amino de aminoácidos libres dando lugar a un compuesto con color azul púrpúreo que se midió a 515 nm en el espectrofotómetro. Para medir la actividad pronasa se utilizaron dos sustratos diferentes, la azocaseína, cuya hidrólisis libera un grupo azo que produce color rojo y se detecta espectrofotométricamente a 420 nm, y el medio AHG-M, cuya hidrólisis produce zonas claras debido a la degradación de la gliadina.

Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado. En el caso de las actividades peptidasas el resultado se expresó como miliunidades por mg de proteína, definiendo una Unidad Enzimática (U) como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de *p*-NA, o 1 μ mol de aminoácido, por minuto en las condiciones ensayadas (Yang y Tanaka, 2007). En el ensayo de hidrólisis de azocaseína la U se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un aumento de 0,01 de la absorbancia en 30 min a 37°C.

8.1.3. Ensayos enzimáticos para determinar la actividad prolil endopeptidasa (PEP)

La cuantificación de la actividad PEP se realizó en un volumen final de 1 ml que incluía 625 μ l del tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 0,2 M, 250 μ l del ELC o del sobrenadante del cultivo, dependiendo del caso y 125 μ l del sustrato Suc-Ala-Pro-*p*-NA (Suc-, succinil-) (1,2 mM) (Bachem, Bubendorf, Suiza). Las condiciones de reacción empleadas fueron 1 h a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo 500 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v), se centrifugó (10.000 g, 10 min) y la liberación de *p*-NA se detectó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro U-2800 Digilab Hitachi (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japón) (coeficiente de extinción molar de 8.800 M⁻¹ cm⁻¹).

8.1.4. Ensayo enzimático de las actividades PepX, PepI, PepN y PepO

Las actividades dipeptidil peptidasa IV (PepX), prolil aminopeptidasa (PepI), aminopeptidasa N (PepN) y la endopeptidasa O (PepO) se realizaron utilizando los sustratos cromogénicos H-Gly-Pro-*p*-NA, H-Pro-*p*-NA, H-Leu-*p*-NA y z-Gly-Gly-Leu-*p*-NA, respectivamente (todos de Bachem). Los ensayos se realizaron en un volumen final de 1 ml que incluía 825 μ l de tampón fosfato 10 mM (pH 7,5), 75 μ l del sustrato cromogénico correspondiente (1,2 mM) y 100 μ l del ELC. Las condiciones de reacción empleadas fueron 1 h a 37°C, la reacción se paró añadiendo 500 μ l de TCA al 20% (p/v), se centrifugó (10.000 g durante 10 min) y la liberación de *p*-NA se detectó espectrofotométricamente a 410 nm (coeficiente de extinción molar de 8.800 M⁻¹ cm⁻¹).

8.1.5. Ensayo de la actividad prolidasa Q (PepQ)

La actividad PepQ se determinó empleando el sustrato Leu-Pro (Bachem). La reacción se realizó en un volumen final de 300 μ l que contenía 100 μ l del ELC, 162,5 μ l de tampón citrato [citrato de sodio (20 mM) y sulfato de zinc (2,5 mM), pH 6,5] y 37,5 μ l del sustrato Leu-Pro (1,2 mM). La reacción se incubó durante 30 min a 40 °C. La producción del color se realizó añadiendo 350 μ l de ácido acético glacial y 350 μ l de la mezcla de reacción [ninhidrina (3 % p/v), ácido fosfórico (60% v/v) y ácido acético glacial (40% v/v)]. Se incubó durante 10 min a 90°C. El color se midió espectrofotométricamente a 515 nm (coeficiente de extinción molar de 4570 M⁻¹ cm⁻¹).

8.1.6. Ensayo de la actividad Pronasa

La pronasa es una proteasa general capaz de degradar la gliadina (Bietz y Rothfus, 1971), la actividad pronasa se determinó utilizando dos métodos diferentes: midiendo la absorbancia obtenida con la hidrólisis de azocaseína y midiendo el diámetro de los halos formados en el medio AHG-M. En ambos casos, se partió de una solución de Pronasa (1mg/ml=7U, Roche Diagnostics GmbH, Madrid, España) y se prepararon diluciones seriadas a la mitad, en un rango entre 0–50 μ g ml⁻¹.

La hidrólisis de azocaseína se realizó siguiendo el protocolo descrito por Secades y Guijarro (1999). La hidrólisis de azocaseína se detectó espectrofotométricamente a 420 nm.

La hidrólisis del sustrato AHG se determinó realizando un test de difusión en pocillo en el medio AHG-M agar. Para ello, se añadieron 30 µl de cada dilución de pronasa por triplicado en cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 19 h. Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro del halo alrededor de los pocillos y se representó frente a cada dilución de pronasa. Se determinó la repetitividad del ensayo repitiéndolo 12 veces el mismo día, y la reproducibilidad se determinó repitiendo el ensayo con la misma muestra durante seis días diferentes. El límite de detección del ensayo de pronasa en AHG-M se consideró como la mínima concentración de pronasa que produce halo claro alrededor de los pocillos y que se puede distinguir del control negativo cuando la pronasa se sustituye por agua.

Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos de la digestión de azocaseína con los resultados obtenidos de la digestión de AHG-M.

8.2. Medida del contenido total de proteína

Tanto para calcular la actividad enzimática específica en los ensayos colorimétricos, como para conocer la concentración de proteína solubilizada en las muestras de AHG, se midió el contenido de proteína total en las muestras, empleando el *kit Pierce BCA protein assay* (Pierce, Rockford, USA), utilizando albúmina como estándar.

8.3. Precipitación de proteínas

Se emplearon diferentes métodos de precipitación de proteínas en función de la posterior aplicación de las mismas.

Con el objetivo de identificar las posibles actividades gliadinasas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares, se precipitaron todas las proteínas del sobrenadante y se visualizaron en un zimograma. Para precipitar las proteínas, se crecieron 100 ml de cada cepa en sus condiciones óptimas de cultivo durante 18 h. A continuación se centrifugó el cultivo celular (8.000 g 10 min), el sobrenadante se

filtró con una membrana de nylon de 0,2 μm (VWR) y se añadió sulfato de amonio [60 % (p/v)]. Se agitó y se incubó a 4°C durante 3 h. Posteriormente se centrifugó (10.000 g 30 min 4°C) y el pellet resultante se lavó tres veces con 100 μl de Tris-HCl (pH 6,8) y se concentró 10 veces en el mismo tampón filtrando por una membrana de celulosa de corte en 3000 Da (Amicon Ultra, Millipore, Cork, Ireland). Las muestras se cargaron inmediatamente en el zimograma.

Con el objetivo de visualizar la actividad PEP M_x extracelular en un gel de poliacrilamida, se crecieron las cepas *L. casei* IPLA1506 y *L. casei* BL23 en un biorreactor en CFB [0,5 % glucosa (p/v)] a pH 7 durante 22 horas, se recogieron alícuotas de 100 ml y la precipitación del sobrenadante se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sánchez y cols. (2008).

8.4. Visualización de proteínas en gel de acrilamida

8.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon añadiendo solución de Laemmli (6x) (Laemmli, 1970). A continuación se calentaron durante 5 min a 95°C y se enfriaron en hielo. En algunas ocasiones se trataron con ultrasonidos durante 10 min a 30°C antes del hervido. Para la visualización de las proteínas se siguió el método descrito por Green y Sambrook (2012).

8.4.2. Gel de acrilamida SDS-PAGE

Las electroforesis de proteínas se realizaron mediante la técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). En el caso de la visualización de los ELC de *Lactococcus*, se utilizó un equipo “Miniprotean III” (Bio-Rad) y se prepararon geles de poliacrilamida al 12 %. En el caso de las proteínas de los sobrenadantes de *Lactobacillus*, se utilizó un equipo Hoefer SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (G.E. Healthcare, Buckinghamshire, U.K.) y los geles de poliacrilamida se prepararon al 8 %. En ambos casos se utilizó un gel de empaquetamiento al 4 %. Como marcador de peso molecular se empleó el PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo).

8.4.3. Gel de acrilamida de Tricina (Tricina-SDS-PAGE)

Las fracciones de menos de 5000 Da se obtuvieron filtrando la muestra de proteína total con una membrana de polietersulfona con corte en 5000 Da (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). Para visualizar los péptidos, las muestras fueron separadas electroforéticamente en un gel de Tris-Tricina con poliacrilamida al 16,5% (Gallagher, 2007). Como estándar de pesos moleculares se utilizó el “low range” de Amersham.

8.4.4. Zimograma

Con el objetivo de visualizar aquellas proteínas con actividad gliadinasas, se realizaron geles de poliacrilamida (10%) (Gallagher, 2007) sustituyendo el agua por un volumen equivalente de 2x AHG-M (sin glucosa ni vitaminas, **Tabla 5**) (AHG-SDS-gel). La concentración final de gliadina en el gel fue de 0,5 mg ml⁻¹.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incubó durante 1 h en agitación en una solución de Tris-HCl (50 mM) con Tritón x-100 (2,5%). Se lavó dos veces con una solución de sales (**Tabla 5**) y a continuación se incubó con esta misma solución durante 18h a 37°C. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el “broad range” de Fermentas (Vilnius, Lithuania).

8.5. Técnicas cromatográficas

8.5.1. Preparación de las muestras

Se determinó la capacidad de las cepas para degradar el péptido inmunogénico 33-mer (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) (Shan y cols., 2002). Dicho péptido fue sintetizado por Immunostep (Salamanca, España) con una pureza del 95% . Para ello, se incubaron 10 ml de cada cepa en sus condiciones óptimas de crecimiento durante 18 h. A continuación, se recogieron los cultivos celulares por centrifugación (8.000 g durante 10 min), se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón. Las suspensiones celulares (DO₆₀₀= 35) se incubaron con el péptido 33-mer a diferentes concentraciones, 50 µM en el caso de las cepas silvestres o 25,5 µM en el de las

cepas recombinantes. Las incubaciones se realizaron a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa, a 37°C o 32°C, y el tiempo de incubación varió en función del experimento. Para inactivar la actividad enzimática, las alícuotas se hirvieron a 95°C durante 10 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. Se filtraron usando filtros de “low binding protein” (0,2 µm) (VWR) y se guardaron a -20°C hasta ser analizadas mediante HPLC o LC-MS.

Para determinar los niveles de amonio y de aminoácidos libres presentes en las muestras de AHG, estas se derivatizaron con dietiletoximetilen malonato (DEEMM) (Sigma Aldrich) y se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,22 µm (VWR). Posteriormente se analizaron mediante ultra-HPLC.

8.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La disminución en la concentración del péptido 33-mer, así como los productos intermedios se analizaron mediante HPLC. El sistema de cromatografía HPLC consiste en un módulo de separación Alliance 2795, PDA con un detector de fotodiodo 2996, y un software de adquisición de datos Empower (Waters, Milford, MA). Se usó una columna XTerra MS C18 5 µm, 4,6 x 150 mm con una pre columna Nova-Pak C18 4µm, 3,9 x 20 mm (Waters). Las fases de elución consistieron en (A) agua con 0,1% (v/v) TFA (ácido trifluoroacético) y (B) acetonitrilo con 0,1% (v/v) TFA. El programa de gradiente comenzó con un 100% del solvente A y 0% del solvente B y fue cambiando linealmente hasta alcanzar un 62,6% del solvente A y 37,4% del solvente B en 34 minutos. La columna se lavó con 100% del solvente B durante 5 minutos, y se equilibró con las condiciones iniciales durante 10 min. La absorbancia UV se recogió a los 215 nm y a los 280 nm.

8.5.3. Cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS)

Con el objetivo de identificar los posibles productos de degradación del péptido 33-mer, las muestras se analizaron con la técnica LC-MS. Esta técnica se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida Agilent 1260 Infinity directamente conectado con un espectrómetro de masas Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Las muestras se inyectaron a

través del inyector automático sobre una columna de Gemini-NX C18 de 5 μm 100 x 2.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA).

Tras mantener durante 2 min el solvente A al 97%, los compuestos se eluyeron en un gradiente lineal desde el 3% hasta el 95% del solvente B durante 30 minutos, donde A era agua con 0,1% (v/v) de ácido fórmico y B era acetonitrilo con 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. El flujo fue de 0,4 ml min⁻¹. Después de cada inyección la columna se lavó con 95% del solvente B durante 10 minutos y se equilibró con las condiciones iniciales durante 7 min. La detección de masas se realizó mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI+). Los parámetros de origen fueron los siguientes: 4000 V de tensión capilar, 150 V de tensión de fragmentador, 65 V de tensión del colador, gas de secado a 350 ° C con un caudal de 11 l min⁻¹, y una presión del nebulizador de 35 psig. Los espectros TOF se recogieron en el modo de alta resolución por encima de 100 a 1700 m/z.

El análisis de los datos se realizó usando el paquete de software Agilent MassHunter Qualitative Analysis. En este programa, se utilizó la opción de encontrar los compuestos por su fórmula, para extraer de los cromatogramas las fórmulas moleculares correspondientes al péptido 33-mer (C₁₉₀H₂₇₄N₄₃O₄₇) y a los productos de degradación esperados YPQPQPF (C₄₃H₅₈N₉O₁₁), QPQPF (C₄₉H₄₂N₇O₈), QPQLP (C₂₆H₄₄N₇O₈), LQLQP (C₂₇H₄₈N₇O₈), FPQP (C₂₄H₃₄N₅O₆), and YPQP (C₂₄H₃₄N₅O₇). El programa se estableció para detectar H⁺, K⁺, Na⁺, y NH₄⁺ como portadores de carga, y se seleccionó una opción para poder detectar aquellos iones resultantes de la pérdida neutra de agua [M-H₂O]^{+z}. Los estados de carga permitidos fueron z = +1 a +4. Además, se generó una lista con todos los posibles productos de degradación del péptido 33-mer, rompiendo sistemáticamente los enlaces peptídicos tras cada residuo de prolina, generando así 74 péptidos con 68 masas moleculares. Se evaluó la presencia de estos péptidos mediante la extracción de los cromatogramas tal y como se ha descrito anteriormente.

8.5.4. Cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC)

Los niveles de amonio y de aminoácidos libres en las muestras de AHG, se cuantificaron mediante UHPLC siguiendo el protocolo descrito por Redruello y cols. (2013). La separación cromatográfica se realizó utilizando el cromatógrafo *H-Class Acquity UPLC™ system* (waters, Milford, MA, USA) y una columna *Waters Acquity UPLC™ BEH C18 1,7 μm* (2,1 mm x 200 mm). La detección tuvo lugar a 280 nm y los datos fueron analizados con el software *Empower versión 2* (Waters).

RESULTADOS

BLOQUE 1

BÚSQUEDA DE BAL CAPACES DE
HIDROLIZAR LA GLIADINA Y EL PÉPTIDO
INMUNOGÉNICO 33-MER

CAPÍTULO I – DESARROLLO DE UN MEDIO SELECTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD GLIADINASA

Los medios de cultivo selectivos se utilizan para aislar bacterias en base a sus características metabólicas particulares. El objetivo del presente capítulo fue desarrollar un medio de cultivo con gliadina como única fuente de nitrógeno, que permitiese la selección en muestras complejas de bacterias capaces de hidrolizar la gliadina.

1. SOLUBILIZACIÓN DE LA GLIADINA

El primer objetivo fue aumentar la solubilidad de la gliadina. Vickery en 1923 describió que un tratamiento ácido suave de la gliadina incrementa su solubilidad, debido a la hidrólisis de los enlaces peptídicos y a la desaminación de los residuos de glutamina, con la consecuente liberación de amonio (Vickery, 1923). Por lo tanto, se trató la gliadina con HCl (2,5 M) durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se solubilizó con etanol al 60 % tal y como se describe en materiales y métodos (apartado 3). La solución de gliadina generada se denominó AHG (*Acid Hidrolized Gliadin, Hidrolizado Ácido de Gliadina*). Paralelamente se preparó una solución de gliadina en la que no se realizó el tratamiento ácido.

Para comprobar si el tratamiento ácido había aumentado la solubilidad de la gliadina, se determinó el contenido de proteína total en la muestra hidrolizada y en la muestra control que no había sido tratada, utilizando el *kit Pierce BCA protein assay*.

El contenido total de proteína fue un $14,3 \pm 4$ % más elevado en AHG que en la solución de gliadina sin tratamiento ácido.

Para determinar el grado de hidrólisis de los monómeros de gliadina, tanto la solución ácida como la solución control se filtraron a través de un centrifón de 5 kDa y se cuantificó la proteína total en la fracción eluida (F5). Se obtuvo un $18,5 \pm 0,1$ % más de proteína total en la fracción F5, que contiene péptidos de menos de 5 kDa. La presencia de los péptidos formados se confirmó mediante dos técnicas diferentes, visualización en gel de poliacrilamida SDS-Tricina-PAGE (16,5%) (**Figura 11a**) y análisis HPLC (**Figura 11b**). En ambos casos se detectaron nuevos péptidos de bajo peso molecular. Es importante destacar, que no se detectó la presencia de aminoácidos libres en ninguna de las muestras (datos no mostrados). Por otro lado, el incremento en la concentración de amonio detectado mediante UHPLC (**Figura 11c**) en la solución AHG, corresponde a la desaminación de los residuos de glutamina como consecuencia del tratamiento ácido, tal y como había sido descrito por Vickery (1923).

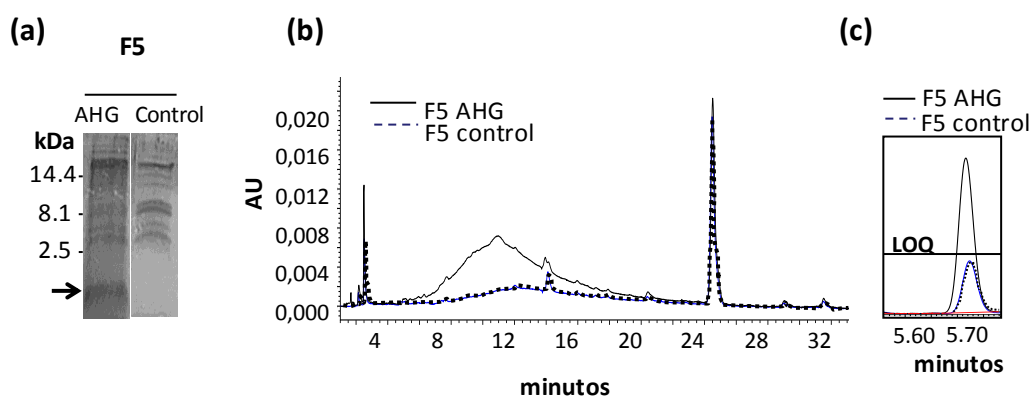


Figura 11. Análisis de las soluciones de gliadina. Se analizaron las fracciones de menos de 5kDa (F5). a) Gel SDS-Tricina-PAGE al 16,5%. La flecha señala los nuevos productos de bajo peso molecular; b) Análisis mediante HPLC del incremento de nuevos productos de bajo peso molecular; c) Análisis de los niveles de amonio mediante UHPLC.

Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la solubilidad de la gliadina habría tenido lugar tanto por el proceso de desaminación de los residuos de glutamina, como por la hidrólisis de enlaces peptídicos, la cual liberó péptidos

menores de 5 kDa, pero no aminoácidos libres. Por lo tanto, serán necesarias actividades enzimáticas específicas para que una bacteria pueda utilizar AHG como única fuente de nitrógeno en un medio de cultivo.

2. DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO, CON AHG COMO ÚNICA FUENTE DE NITRÓGENO

La solución de gliadina (AHG) descrita en el apartado anterior se utilizó como fuente de nitrógeno en un medio de cultivo definido al que se añadieron sales minerales y vitaminas, así como glucosa y maltosa como fuentes de carbono, y cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras tal y como se indica en materiales y métodos (apartado 3, **Tabla 5**). El medio se denominó AHG-M y contenía una concentración final de gliadina de $0,6 \text{ g l}^{-1}$. De forma paralela se preparó un medio de cultivo con gliadina que no había sido tratada previamente con ácido. Cuando se compararon ambos medios, se observó que el medio AHG-M tenía un aspecto homogéneo (Figura 12a), mientras que en el medio con gliadina sin tratar se habían formado grumos y por lo tanto no era un medio adecuado (**Figura 12b**).

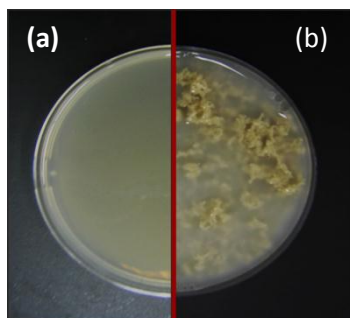


Figura 12. Medio de cultivo con gliadina tratada con HCl (a) y sin tratar (b).

3. VALIDACIÓN DEL MEDIO AHG-M

3.1. Evaluación de AHG como sustrato enzimático

Para determinar la validez del medio AHG-M como sustrato de actividades gliadinasa se utilizó la pronasa, un coctel de proteasas inespecíficas con conocida actividad gliadinasa (Bietz y Rothfus, 1971). Se ensayaron distintas concentraciones

de pronasa ($0\text{--}50\ \mu\text{g ml}^{-1}$) utilizando el test de difusión en agar. La hidrólisis de la gliadina en el medio AHG-M da lugar a la formación de halos claros que permiten la detección de actividades gliadinasas (**Figura 13a**). Al cabo de 19 h de incubación se midió el diámetro de los halos obtenidos y se observó una correlación lineal de $R^2=0,8858$ entre la concentración de pronasa y el diámetro del halo. El límite de detección de este método fue de $6,25\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de pronasa, lo que equivale a $0,044\ \text{U}$ (datos no mostrados). Además, los análisis de repetitividad y de reproducibilidad del ensayo realizado con $12,5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de pronasa, dieron unos coeficientes de variación de $3,15\%$ y $8,18\%$ respectivamente.

Con el objetivo de comparar AHG con la azocaseína, que se usa como sustrato de referencia de la pronasa, se relacionó el diámetro de los halos obtenidos en AHG-M con la absorbancia resultante de la hidrólisis de azocaseína con las concentraciones de pronasa indicadas anteriormente, obteniéndose una correlación lineal de $R^2=0,8543$. Todos estos resultados sugieren que AHG podría ser un sustrato adecuado para seleccionar bacterias con actividades gliadinasas (**Figura 13b**).

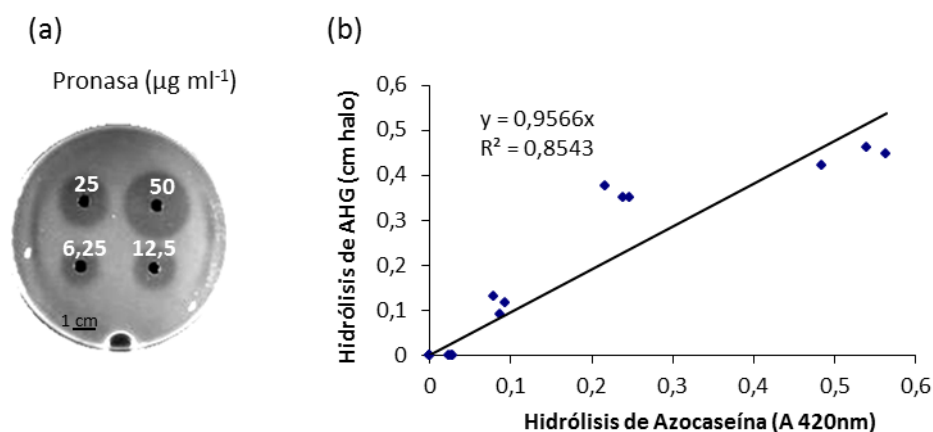


Figura 13. Análisis de la actividad pronasa con diferentes sustratos. a) Digestión en AHG-M mediante el método de difusión en pocillo. Se indica la concentración de pronasa en cada caso ($\mu\text{g ml}^{-1}$). b) Correlación entre la hidrólisis de azocaseína ($\text{DO}_{420\text{nm}}$) y de AHG (cm halo).

3.2. Evaluación del crecimiento de bacterias en AHG-M

La composición del medio AHG-M contiene sales minerales y vitaminas para permitir el crecimiento de un amplio rango de bacterias, incluso de bacterias nutricionalmente exigentes como las BAL. La única restricción impuesta en el medio AHG-M es poder utilizar AHG como fuente de nitrógeno. Con el objetivo de comprobar si el medio AHG-M es adecuado para crecer bacterias, se seleccionaron cepas de diferentes especies cuyo comportamiento frente al gluten aún no había sido ensayado. Cada una de estas cepas se creció en sus condiciones óptimas de cultivo y a continuación se sembró en AHG-M (**Figura 14**).

Cepa	Crecimiento	Halo	Figura
Gram(+)			
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	+	-	
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	+/-	-	
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 5354	+	-	
<i>Lactococcus lactis</i> sbs. <i>lactis</i> IL1403	-	-	
<i>Lactococcus lactis</i> sbs. <i>cremoris</i> MG1363	+/-	-	
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT 481	-	-	
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 410	+/-	-	
<i>Enterococcus durans</i> CECT 411	-	-	
<i>Streptococcus mitis</i> B6	+/-	-	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CECT 4549	+	-	
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 461	+	+	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	+	+	
Gram(-)			
<i>Escherichia coli</i> CECT 423	-	-	
<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	+	-	
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 401	+/-	-	

Figura 14. Comportamiento de diferentes cepas bacterianas en el medio AHG-M. Se crecieron colonias individuales de las cepas indicadas en sus condiciones óptimas de cultivo y a continuación fueron sembradas en placas de AHG-M e incubadas durante 48-72 h. Se evaluaron los fenotipos de crecimiento y de formación del halo. + significa fenotipo positivo; -, fenotipo negativo; +/-, fenotipo débil.

Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento y a la formación del halo se recogen en la **Figura 14**. No todas las bacterias analizadas fueron capaces de crecer en AHG-M, y solo dos de ellas, pertenecientes al género *Bacillus*, formaron halo de degradación.

3.3. Evaluación de AHG-M como medio de cultivo selectivo

Con el objetivo de validar AHG-M como medio para la selección de bacterias con actividad gliadinasas, se realizó un cribado en una muestra de ensilado de trigo para buscar bacterias con dicha actividad. Una vez homogeneizada la muestra, se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en PCA para obtener el recuento total de bacterias y en AHG-M para seleccionar aquellas bacterias capaces de utilizar AHG como fuente de nitrógeno. A su vez, se realizó un cultivo de enriquecimiento en AHG-M caldo durante 48 h, que posteriormente se sembró en AHG-M agar. Tras 48 h de incubación a 37°C se realizó el recuento de colonias. Todos los medios contenían cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Recuento bacteriano total (log ufc g⁻¹) y del número de bacterias formadoras de halo (%) en la muestra de ensilado de trigo. Se realizó el recuento de colonias de la muestra original y de la muestra enriquecida, en los medios PCA y AHG-M.

Muestra	PCA Log ufc g ⁻¹	AHG-M Log ufc g ⁻¹	AHG-M % colonias con halo
Original	6,04	4,81	21
Enriquecida	ND	2,3	60

ND, no determinado

La comparación de los resultados obtenidos entre los dos medios de cultivo reveló que en la muestra original, los recuentos fueron dos órdenes de magnitud inferiores en AHG-M (4,81 log ufc g⁻¹) respecto a PCA (6,04 log ufc g⁻¹). Estos resultados sugieren que no todas las bacterias presentes en la muestra son capaces de crecer en AHG-M. Además, un 21 % de las colonias obtenidas en AHG-M (7 de 32), presentaron un halo a su alrededor debido a la degradación de gliadina. Cuando

se compararon con los datos obtenidos tras el enriquecimiento en caldo AHG-M, se observó que las ufc g⁻¹ habían disminuido de nuevo dos órdenes de magnitud (2,3 log ufc g⁻¹). Pero además, el porcentaje de bacterias formadoras de halo de degradación alrededor de la colonia fue de un 60% (6 de 10). Ambos resultados, tanto la reducción de los recuentos bacterianos como el incremento del porcentaje de bacterias degradadoras de gliadina, señalan que efectivamente se produjo una selección y apoyan la utilización de AHG-M como medio selectivo.

3.1.3 Identificación y tipificación molecular de los aislados

Se recogieron los 13 aislados que habían formado halo de degradación en AHG-M y se identificaron molecularmente mediante la secuenciación del gen codificante de la subunidad 16S del ARNr. Todos los aislados fueron identificados como pertenecientes al género *Bacillus*. Para poder identificar la especie a la que pertenecían se realizó la secuenciación del gen *gyrA*, obteniéndose que 10 aislados pertenecían a la especie *B. amyloliquefaciens*, dos a la especie *Bacillus mojavenensis* y uno a la especie *B. subtilis* subsp. *subtilis*. Los aislados se tipificaron mediante PFGE comprobándose que se habían aislado tres cepas diferentes de *B. amyloliquefaciens*, una de *B. subtilis* subsp. *subtilis* y una de *B. mojavenensis* (Figura 15).

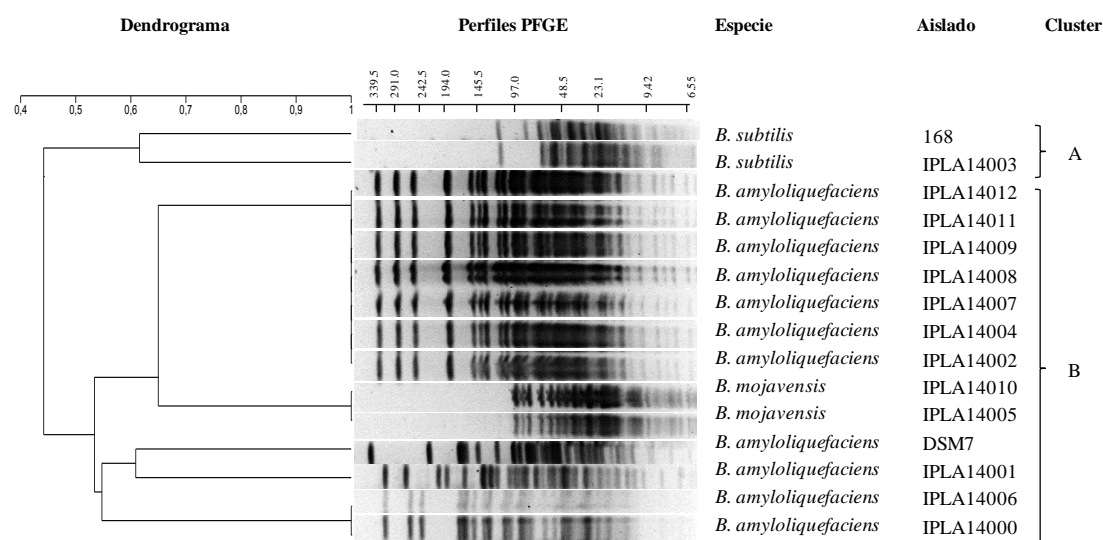


Figura 15. Dendrograma derivado del análisis PFGE de todos los aislados de *Bacillus* obtenidos en el cribado de la muestra de ensilado de trigo. Se realizó en base al coeficiente de similitud de Sorensen con el algoritmo de agrupamiento UPGMA.

El análisis del dendrograma realizado en base al coeficiente de similitud de Sorensen reveló dos conjuntos claramente diferenciados que comparten un porcentaje de similitud del 55%: Por un lado se agrupan las cepas pertenecientes a la especie *B. subtilis* (*B. subtilis* IPLA14003 y la cepa tipo *B. subtilis* 168) y por otro lado, las cepas pertenecientes a las especies *B. amyloliquefaciens* y *B. mojavensis*.

3.2.3 Caracterización de las actividades gliadinasa mediante zimografía

Con el objetivo de caracterizar las gliadinasas extracelulares responsables de la formación del halo, se seleccionaron 9 cepas diferentes: Una cepa de cada uno de los perfiles de PFGE de los aislados de *Bacillus* spp. provenientes del cribado del ensilado de trigo (**Figura 15**), las cepas tipo *B. subtilis* CECT 468 y *B. amyloliquefaciens* DSM7, así como *Lc. lactis* MG1363 y *E. coli* CECT 423 que ni crecían ni formaban halo en AHG-M (**Figura 14**). La obtención de las proteínas extracelulares de los cultivos y el método de zimografía se realizaron tal y como se describió en materiales y métodos (apartados 8.3 y 8.4.4, respectivamente).

Los resultados revelan la presencia de bandas claras, que se corresponderían con actividades gliadinasa, en todas las cepas de *Bacillus* analizadas. Además, se obtuvieron diferentes perfiles de hidrólisis, apoyando el uso de la matriz de AHG como una herramienta adecuada para caracterizar actividades gliadinasa (**Figura 16**). En el caso de *Lc. lactis* y *E. coli* no se observó la formación de bandas claras.

Los resultados obtenidos sugieren que el medio AHG-M puede ser utilizado como método fácil y rápido para el aislamiento de bacterias capaces de utilizar la gliadina como única fuente de nitrógeno. Además, hemos extendido su uso como método de ensayo para facilitar la identificación de actividades gliadinasa.

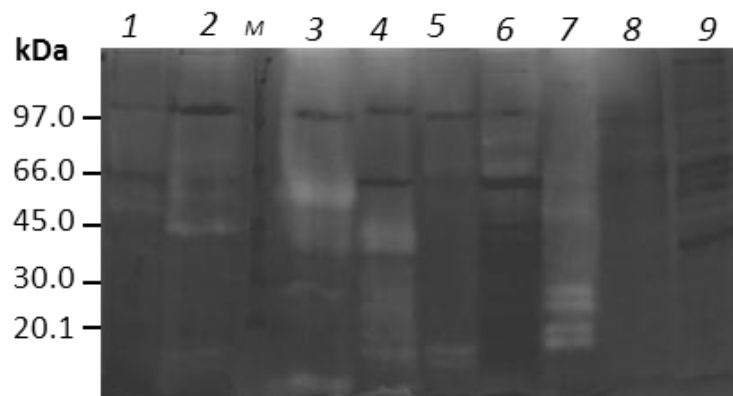


Figura 16. Zimograma SDS-PAGE con AHG como matriz. Se analizaron los sobrenadantes libres de células de varias cepas. Las bandas claras representan zonas de degradación de gliadina. M, marcador de pesos moleculares. 1, *B. amyloliquefaciens* IPLA14000. 2, *B. amyloliquefaciens* IPLA14001. 3, *B. subtilis* IPLA14003. 4, *B. mojavensis* IPLA14005. 5, *B. amyloliquefaciens* IPLA14012. 6, *B. subtilis* 168. 7, *B. amyloliquefaciens* DSM7. 8, *E. coli* CECT 423. 9, *L. lactis* IL1403.

CAPÍTULO II – BÚSQUEDA DE BAL CAPACES DE DEGRADAR LA GLIADINA

El objetivo del presente capítulo fue obtener BAL capaces de degradar la gliadina. Con tal fin se realizaron nuevos cribados en dos tipos de muestras: i) Masas fermentadas donde el gluten constituye la proteína mayoritaria y en ii) contenido ruminal bovino, un ambiente donde se encuentran organismos con gran actividad proteolítica.

1. CRIBADO

1.1. Selección de muestras

Para llevar a cabo la búsqueda de BAL capaces de degradar la gliadina, se seleccionaron diez masas fermentadas, nueve elaboradas con harina de trigo y una con centeno, tanto caseras como industriales, con diferentes usos (pan, pasta y pizza) y que provenían de diferentes países (Italia, Polonia y España) (**Tabla 12**). También se seleccionaron dos muestras de contenido ruminal bovino. Estas muestras se recogieron directamente del rumen a través de una cánula ruminal y cada una pertenecía a un animal diferente (A y B) del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) (**Tabla 13**).

1.2. Recuento del número de viables

Las muestras se homogeneizaron en una solución salina ringer, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en PCA para obtener el recuento total de bacterias, en MRSm para el recuento de *Lactobacillus* y en AHG-M

para obtener bacterias capaces de degradar la gliadina. También se realizaron cultivos de enriquecimiento, inoculando un 1% de la muestra inicial en caldo AHG-M y se incubaron durante 24 y 48 h a 30°C y 37°C en aerobiosis y a 37°C en anaerobiosis. Posteriormente se sembraron diluciones en placas MRSm y AHG-M y se incubaron en las mismas condiciones. Todos los medios contenían cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras y se bajó el pH del medio AHG-M a pH 5,5 para favorecer el aislamiento de BAL. En las **Tablas 12 y 13** se presentan las características principales y los recuentos obtenidos de las muestras analizadas.

En las muestras de masas fermentadas, los recuentos más elevados fueron los obtenidos en PCA, oscilando entre 11,1–14,4 log ufc g⁻¹. En MRSm se obtuvo un descenso entre 2 y 3 órdenes de magnitud, y en AHG-M llegó a bajar hasta 6 órdenes de magnitud, indicando que en estos dos últimos medios de cultivo se estaba produciendo una selección de las bacterias presentes en la muestra. La muestra de masa fermentada industrial procedente de España manifestó un comportamiento diferente al resto, obteniéndose recuentos similares en todos los medios utilizados. Cuando se estudió la evolución de la población microbiana a través de los enriquecimientos en caldo AHG-M, se observó que el número de bacterias capaces de crecer en MRSm disminuía progresivamente tras cada pase. Sin embargo, en AHG-M el comportamiento fue más aleatorio. Tras el primer pase, en tres muestras aumentó el número de bacterias capaces de crecer en AHG-M, en dos se mantuvo estable y en cinco disminuyó. Tras el segundo enriquecimiento, el recuento en AHG-M disminuyó por debajo incluso del recuento inicial. Sin embargo, la disminución total (entre 0,3 a 2,7 log ufc g⁻¹) fue menor que en MRSm (entre 2,6 a 4,6 log ufc g⁻¹) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Principales características y recuentos microbiológicos de las 10 muestras de masas fermentadas utilizadas. La media y la desviación estándar se realizaron con los datos obtenidos en los recuentos a 30°C y 37°C en aerobiosis y a 37°C en anaerobiosis.

Muestras			Log ufc g ⁻¹									
			Sin enriquecimiento			1º enriquecimiento			2º enriquecimiento			
Uso	Cereal	Elaboración	Origen	PCA	MRSm	AHG-M	MRSm	AHG-M	MRSm	AHG-M	MRSm	AHG-M
Pan	Trigo	Casera	España	12,67 ^a	9,36 ± 0,44	9,33 ± 0,04	8,30 ± 0,02	7,79 ± 1,18	6,84 ± 0,65	6,58 ± 0,71		
Pan	Trigo	Industrial	España	7,79 ^a	7,80 ± 0,07	7,90 ± 0,03	7,28 ± 0,35	6,00 ^b	7,02 ± 0,58	ND		
Pan	Trigo	Industrial	Italia	11,95 ± 1,51	9,68 ± 0,08	7,85 ± 0,75	7,96 ± 0,82	7,85 ± 1,22	5,90 ± 1,09	7,15 ± 0,25		
Pan	Centeno	Industrial	Polonia	12,98 ± 0,45	10,80 ± 0,18	6,88 ± 1,15	8,59 ± 0,52	7,52 ± 0,99	6,19 ± 0,41	5,91 ± 1,39		
Pasta	Trigo	Industrial	Italia	13,41 ± 0,52	10,52 ± 0,14	9,10 ± 0,26	8,74 ± 0,20	8,71 ± 0,29	7,29 ± 0,32	7,40 ± 0,28		
Pasta	Trigo	Casero A*	Italia	12,34 ± 0,32	10,86 ± 0,65	9,20 ± 0,18	9,30 ± 0,09	9,18 ± 0,50	6,96 ± 1,23	6,88 ± 0,91		
Pasta	Trigo	Casero B*	Italia	13,79 ± 0,54	10,48 ± 0,17	7,61 ± 1,29	8,88 ± 0,16	9,05 ± 0,32	7,46 ± 0,37	7,23 ± 0,11		
Pizza	Trigo	Casero A*	Italia	13,28 ± 0,99	10,38 ± 0,15	8,80 ± 0,59	9,24 ± 0,21	9,11 ± 0,14	6,94 ± 0,47	7,49 ± 1,16		
Pizza	Trigo	Casero B*	Italia	12,67 ± 0,03	10,38 ± 0,65	9,07 ± 0,11	8,70 ± 0,35	8,76 ± 0,17	7,50 ± 0,26	7,92 ± 0,43		
Pizza	Trigo	Casero C*	Italia	12,57 ± 0,70	10,72 ± 0,72	9,56 ± 0,14	9,24 ± 0,04	9,08 ± 0,38	6,77 ± 0,56	7,04 ± 1,17		

*A, B y C tienen tres orígenes diferentes de elaboración. a, dato recuperado del crecimiento a 30°C. b, dato recuperado del resultado del crecimiento a 37°C. ND, no determinado.

En las muestras de contenido ruminal bovino, los recuentos obtenidos en placas de PCA fueron de 7,5 y 8,1 log ufc g⁻¹. Los recuentos en MRSm y en AHG-M fueron muy similares entre sí y un orden de magnitud inferiores a los de PCA. Cuando se estudia el efecto del enriquecimiento en medio AHG-M líquido se observa que los recuentos en MRSm disminuyeron dos órdenes de magnitud tras el primer pase, manteniéndose estables en el segundo pase, e incluso con un ligero incremento. Resultados similares se obtuvieron en AHG-M. Tras el primer enriquecimiento disminuye un orden de magnitud el número de colonias, pero aumenta de nuevo tras el segundo pase (**Tabla 13**).

Tabla 13. Recuentos microbianos totales de las dos muestras de contenido ruminal bovino.

La media y la desviación estándar se realizaron con los datos obtenidos en los recuentos a 30°C y 37°C en aerobiosis y a 37°C en anaerobiosis.

Muestras	Log UFC/g						
	Sin enriquecimiento			1º enriquecimiento		2º enriquecimiento	
	PCA	MRSm	AHG	MRSm	AHG	MRSm	AHG
Contenido ruminal A	8,09 ± 0,15	6,98 ± 0,69	6,89 ± 0,83	4,51 ± 1,18	5,46 ± 0,48	4,87 ± 0,92	6,26 ± 0,54
Contenido ruminal B	7,49 ± 0,19	6,78 ± 0,15	6,78 ± 0,63	4,80 ± 1,20	5,64 ± 0,33	5,15 ± 0,71	6,60 ± 1,25

1.3. Selección de aislados

A partir de las muestras de masas fermentadas se recogieron 267 aislados capaces de crecer en AHG-M, de los cuales 48 (18%) formaron un halo claro alrededor de la colonia, posiblemente debido a la degradación de la gliadina, y fueron los que se seleccionaron para estudios posteriores. En la **Tabla 14** se presenta el número de aislados recogidos y de aislados formadores de halo para cada muestra. Al analizar cada muestra por separado, se obtuvo que las masas fermentadas de pan de elaboración casera e industrial procedentes de España presentaron el mayor porcentaje de aislados formadores de halo, un 78,6% y un 60% respectivamente. A continuación les siguen tres masas fermentadas de elaboración industrial: pan de Polonia (29,6%), pan de Italia (21%) y pasta de Italia (19,4%). Por último, las cinco masas de pasta y pizza de elaboración casera de Italia

presentaron los porcentajes más bajos de aislados formadores de halo, entre un 6% y un 9,5%.

En las muestras de contenido ruminal bovino se recogieron un total de 58 aislados capaces de crecer en AHG-M, de los cuales se seleccionaron los 17 (29,3%) que formaban un halo claro alrededor de la colonia. En la **Tabla 15** se recoge el número de aislados obtenidos y formadores de halo para cada muestra. Al analizar las muestras por separado, se observó que la muestra de contenido ruminal B presentó un porcentaje de aislados formadores de halo mucho mayor (54,2%) que la muestra de contenido ruminal A (11,8%).

2. IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS SELECCIONADOS DURANTE EL CRIBADO

Los 48 aislados seleccionados de las muestras de masas fermentadas se identificaron mediante secuenciación del gen codificante de la subunidad 16S del *ARNr*. Los resultados mostraron que 43 de los 48 aislados (89,6%) pertenecían al grupo de las BAL. Más concretamente, 34 de los aislados fueron identificados como *Lactobacillus casei*, 1 como *Lactobacillus plantarum* y los 8 restantes fueron identificados como *Leuconostoc mesenteroides*. No se obtuvieron resultados positivos en las secuencias de los 5 aislados restantes, pero el fenotipo de la colonia revelaba que no se trataba de BAL.

Los aislados identificados como BAL se tipificaron mediante PFGE, comprobándose que muchos de ellos eran la misma cepa y resultando finalmente un total de 20 cepas distintas: 15 *L. casei*, 1 *L. plantarum* y 4 *Ln. mesenteroides* (**Figura 17**). En la **Tabla 14** se recoge el número de aislados de BAL identificados y de cepas de BAL tipificadas para cada muestra. Los resultados obtenidos revelan que en todas las muestras analizadas se obtuvo al menos una cepa de BAL capaz de crecer y de formar halo en AHG-M. En la muestras de pan de trigo de elaboración industrial de Italia, se obtuvo el mayor número de cepas de BAL con estas características (5 cepas).

Tabla 14. Selección, identificación y tipificación de BAL procedentes de las muestras de masas fermentadas.

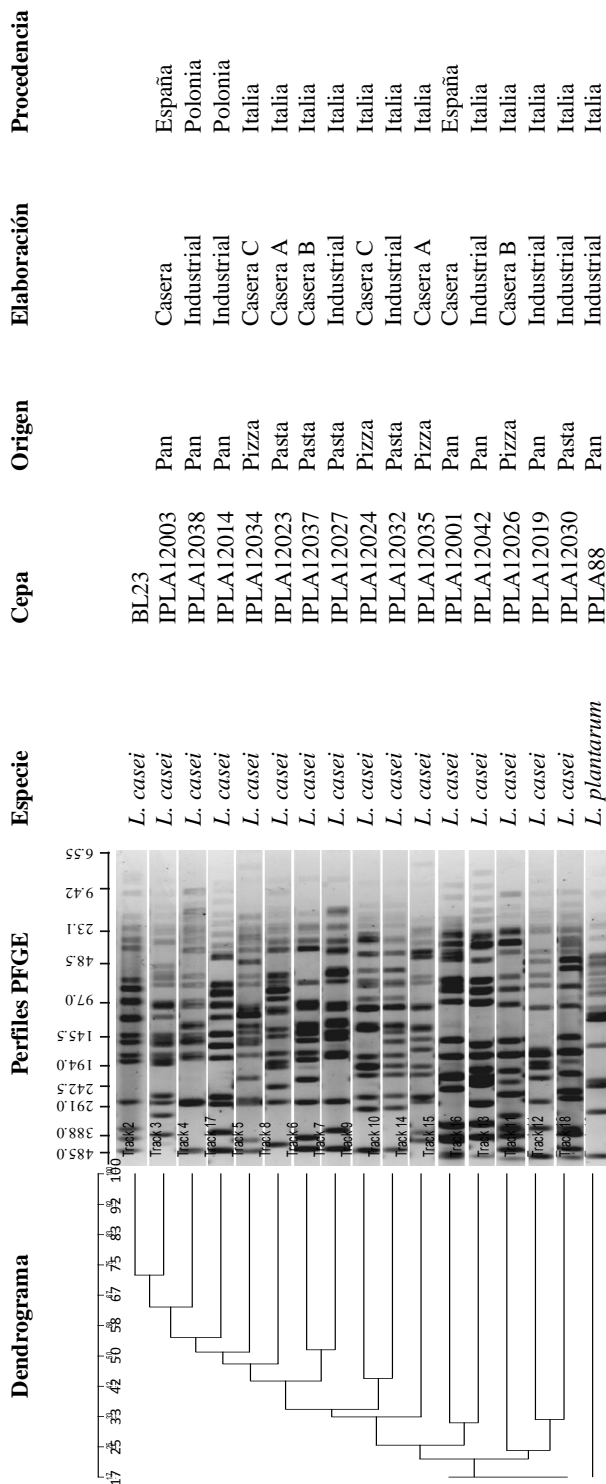
Tipo	Muestra			Nº de aislados crecidos en AHG-M	Nº de aislados con halo	Nº de aislados identificados como BAL	Nº de cepas de BAL
	Cereal	Elaboración	Origen				
Pan	Trigo	Casero	España	14	11	10	2
Pan	Trigo	Industrial	España	5	3	1	1
Pan	Trigo	Industrial	Italia	38	8	6	5
Pan	Centeno	Industrial	Polonia	27	8	8	2
Pasta	Trigo	Industrial	Italia	31	6	6	3
Pasta	Trigo	Casero A*	Italia	33	2	2	2
Pasta	Trigo	Casero B*	Italia	32	3	3	1
Pizza	Trigo	Casero A*	Italia	32	2	2	1
Pizza	Trigo	Casero B*	Italia	21	2	2	1
Pizza	Trigo	Casero C*	Italia	34	3	3	2
				267	48	43	20

A, B y C corresponden con tres fuentes diferentes. NA, no aplicable

El análisis del dendrograma de todas las cepas del género *Lactobacillus* (Figura 17) muestra dos grupos claramente diferenciados en función de la especie, por un lado está la cepa de *L. plantarum* que presenta el mínimo porcentaje de similitud, y en el segundo grupo se encuentran todos los *L. casei*, entre los cuales se observa una elevada heterogeneidad. Existe una ligera tendencia a agruparse según el país de procedencia, exceptuando las dos cepas procedentes de la muestra de masa fermentada realizada en nuestro laboratorio, que no se parecen entre sí. El mayor porcentaje de similitud con la cepa de laboratorio *L. casei* BL23 correspondía a la cepa *L. casei* IPLA12003, proveniente de la masa casera de España, seguida por las dos cepas provenientes de Polonia y las cepas provenientes de Italia.

En el dendrograma obtenido a partir de las cuatro cepas de *Leuconostoc* se advierte una gran diferencia entre las cepas, incluso procediendo de la misma muestra. La cepa *Ln. mesenteroides* IPLA12017 procedente de una masa de pasta casera, es la que presenta las mayores diferencias en comparación con las otras tres cepas que proceden de fermentaciones industriales.

(a)



(b)

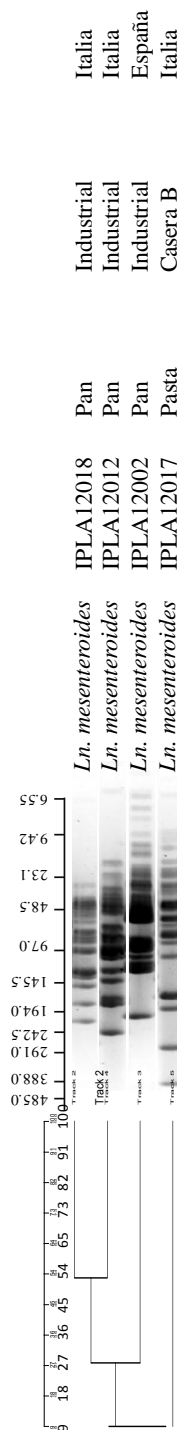


Figura 17. Dendrograma derivado del análisis PFGE de las cepas obtenidas en el cribado de las 10 muestras de masas fermentadas. Se realizó en base al coeficiente de similitud de Dice con el algoritmo de agrupamiento UPGMA. Las cepas se han agrupado en función a su porcentaje de semejanza con la cepa *L. casei* BL23, utilizada como cepa de referencia. a) Dendrograma para el género *Lactobacillus*. Perfiles de restricción obtenidos con *Sfi*I. b) Dendrograma para el género *Leuconostoc*. Perfiles de restricción obtenidos con *Apa*I.

Los 17 aislados de las muestras de contenido ruminal bovino fueron también identificados mediante la secuenciación del gen *ARNr 16S*, comprobándose que 13 aislados (76,5%) eran BAL y curiosamente todos pertenecían a la especie *L. casei*. Los 4 aislados restantes pertenecían a la especie *Bacillus coagulans*. El análisis PFGE de los aislados identificados como BAL reveló que se trataba de 9 cepas diferentes (**Figura 18**). En la **Tabla 15** se presenta el número de aislados de BAL identificados y de cepas de BAL tipificadas para ambas muestras. La muestra de contenido ruminal bovino B presentó un mayor número de cepas de BAL capaces de crecer y de formar halo en AHG-M (7 cepas) en comparación con la muestra de contenido ruminal bovino A (2 cepas).

Tabla 15. Selección, identificación y tipificación de BAL en las muestras de contenido ruminal bovino.

Muestras	Nº de aislados crecidos en AHG-M	Nº de aislados con halo	Nº de aislados identificados como BAL	Nº de cepas de BAL
Contenido ruminal A	34	4	3	2
Contenido ruminal B	24	13	10	7
Total	58	17	13	9

El análisis del dendrograma (**Figura 18**) señaló la existencia de una elevada heterogeneidad y diversidad dentro de la misma especie. No se observaron agrupaciones en función del animal de procedencia (A o B). La cepa *L. casei* IPLA12055 presentó el mayor porcentaje de similitud (70%) con *L. casei* BL23.

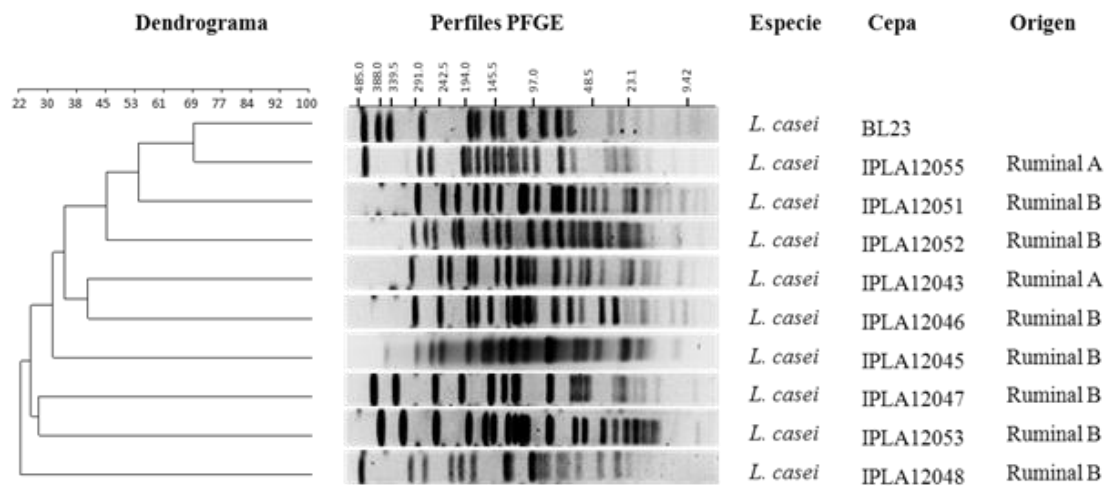


Figura 18. Dendrograma derivado del análisis PFGE de las cepas de *L. casei* obtenidas en el cribado del contenido ruminal. Se realizó en base al coeficiente de similitud de Dice con el algoritmo de agrupamiento UPGMA. Las cepas se han agrupado en función a su porcentaje de semejanza con la cepa *L. casei* BL23, utilizada como cepa de referencia.

CAPÍTULO III – CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

En el presente capítulo se procedió a caracterizar las 29 cepas distintas de BAL seleccionadas por su capacidad para degradar la gliadina a partir de muestras de masas fermentadas y de contenido ruminal bovino.

1. TEST DE RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

El primer objetivo fue analizar la resistencia o sensibilidad a varios antibióticos, así como determinar si esta resistencia era intrínseca o adquirida. Se comprobó la resistencia a ocho antibióticos diferentes mediante la técnica de microdilución en caldo, siguiendo los estándares descritos por Huys y cols. (2010) y los puntos de corte microbiológicos recomendados por la EFSA (2012) (**Tabla 16**).

El análisis de los resultados reveló que *L. plantarum* 88 fue sensible a todos los antibióticos ensayados. Las cepas de *Ln. mesenteroides* IPLA 12012 e IPLA12018, sobrepasaron ligeramente el límite propuesto para la ampicilina. Aunque las cuatro cepas de esta especie se encuentran en un rango similar, por lo que podría ser una desviación dentro de la misma especie y categorizarse como resistencia intrínseca. En el caso de resistencia a clindamicina, las cepas *Ln. mesenteroides* IPLA12002 e IPLA12017 presentaron claramente una resistencia adquirida a clindamicina debido a la distancia que las separa de las otros dos cepas de la misma especie.

Tabla 16. Distribución de la CIM de 8 antibióticos para las 29 cepas de BAL seleccionadas

Antibiótico	Especie	Nº de cepas	Número de cepas con CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de:															
			<0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>256		
Ampicilina	<i>Lactobacillus casei</i>	24							8									
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1								15								
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4							2									
Penicilina	<i>L. casei</i>	24				4	18			1								
	<i>L. plantarum</i>	1					1											
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4				1	1		2									
Clindamicina	<i>L. casei / L. paracasei</i>	24	1	5	17	1												
	<i>L. plantarum</i>	1	1															
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4	1	1	1				1	1								
Gentamicina	<i>L. casei</i>	24								5	18							
	<i>L. plantarum</i>	1								1								
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4							2	1								
Estreptomina	<i>L. casei</i>	24										1	2	18	3			
	<i>L. plantarum</i>	1																
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4											1	1	2			
Tetraciclina	<i>L. casei</i>	24								6	9	8						
	<i>L. plantarum</i>	1																
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4										1	3					
Cloramfenicol	<i>L. casei</i>	24										4	16	4				
	<i>L. plantarum</i>	1											1					
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4										1	3					
Eritromicina	<i>L. casei</i>	24	9	13	2													
	<i>L. plantarum</i>	1	1															
	<i>Ln. mesenteroides</i>	4		2	2													

Las áreas sombreadas muestran el rango de diluciones ensayado para cada antibiótico. Las líneas rojas señalan el corte microbiológico establecido por la EFSA en cada condición.

Las cepas de *L. casei* IPLA12026, IPLA12034, IPLA12046 e IPLA12047 fueron sensibles para todos los antibióticos ensayados. Las 20 cepas de *L. casei* restantes son sensibles para todos los antibióticos ensayados excepto para cloranfenicol, para el que superan el corte ligeramente. Sin embargo, si observamos la distribución poblacional de los 24 *L. casei* aislados de masas fermentadas forman una típica campana de Gauss, que podría indicar que se trata de una resistencia intrínseca a cloranfenicol de esta población.

2. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA ACTIVIDAD GLIADINASA Y FENOTIPO DE CRECIMIENTO Y HALO EN AHG-M

En primer lugar se estudió la localización celular de las actividades implicadas en la degradación de gliadina comprobando la formación de halo tanto de las suspensiones celulares como de los sobrenadantes libres de células. No se obtuvo actividad en ninguno de los sobrenadantes, lo que indicaba que no se trataba de actividades extracelulares, sino que serían citoplasmáticas o ancladas al exterior celular.

El siguiente paso fue comparar el crecimiento y el halo formado en las placas de AHG-M de las 29 cepas seleccionadas. Para comparar el crecimiento se procedió a la siembra por estría en medio AHG-M de cada una de las cepas y se analizó el tamaño de las colonias formadas. Para comparar el halo se procedió a la siembra por botón de cada una de las cepas y se analizó la intensidad y el tamaño del halo formado. Las cepas de *Ln. mesenteroides* presentaron un fenotipo débil, tanto de crecimiento como de formación de halo. La cepa de *L. plantarum* aunque creció muy bien en AHG-M daba lugar a un fenotipo de halo débil. En el caso de las cepas de *L. casei* se observaron diferentes fenotipos. En algunas cepas se observó concordancia entre su crecimiento y el halo formado y en otros casos, aunque el crecimiento no era muy bueno si se observó un fenotipo fuerte de halo de degradación. Se incluyó la cepa de colección *L. casei* BL23 en el experimento y aunque fue capaz de crecer ligeramente en el medio, no produjo halo de degradación (datos no mostrados).

3. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO

Para identificar las actividades enzimáticas posiblemente implicadas en la degradación de la gliadina, se cuantificaron diferentes actividades peptidasa mediante ensayos enzimáticos colorimétricos: Prolil endopeptidasa (PEP), prolidasa (PepQ), endoproteasa (PepO), prolil iminopeptidasa (PepI) y dipeptidil aminopeptidasa IV (PepX) que son específicas para la hidrólisis de residuos de prolina, junto con la aminopeptidasa N (PepN). Estas actividades se determinaron usando sustratos cromogénicos específicos tal y como se describe en materiales y métodos (apartado 8.1).

Los resultados obtenidos demuestran que todas las cepas poseen las actividades PepQ, PepN, PepX y PepI (**Figura 19**). En ninguna cepa se detectó PepO, ni PEP (datos no mostrados).

La actividad PepQ alcanzó en las cepas de *Ln. mesenteroides* niveles de actividad comprendidos entre 20–24 mU mg⁻¹, excepto la cepa *Ln. mesenteroides* IPLA12012 que no llegó a una mili unidad enzimática. La cepa *L. plantarum* IPLA88 presentó una actividad PepQ de 0,5 mU mg⁻¹. En el caso de las cepas de *L. casei* los valores oscilaron entre las 8–38,5 mU mg⁻¹, excepto la cepa *L. casei* IPLA12023 que presentó una actividad de 0,3 mU mg⁻¹. La cepa *L. casei* IPLA12034 alcanzó el mayor nivel de actividad PepQ (38,5 mU mg⁻¹).

En las actividades PepN y PepX el perfil entre las diferentes cepas fue muy similar, siendo las cepas de *Ln. mesenteroides* y *L. plantarum* las que presentaron los niveles de actividad más bajos (0-1,6 mU mg⁻¹ en PepN; 0,3-1 mU mg⁻¹ en PepX). Las cepas de *L. casei* tenían unos valores de actividad muy variable, siendo en ambos casos la cepa *L. casei* IPLA12024 la que obtuvo el mayor valor de actividad enzimática con 15 mU mg⁻¹ para PepN y 4,7 mU mg⁻¹ para PepX.

Por último, en PepI se registraron valores de actividad por debajo de 1 mU mg⁻¹. Siendo también en este caso las cepas de *Ln. mesenteroides* y de *L. plantarum* las que presentaron los valores más bajos, comparadas con las cepas de *L. casei*, y dentro de estas fue la cepa *L. casei* IPLA12043 la que presentó el valor más elevado con 0,8 mU mg⁻¹.

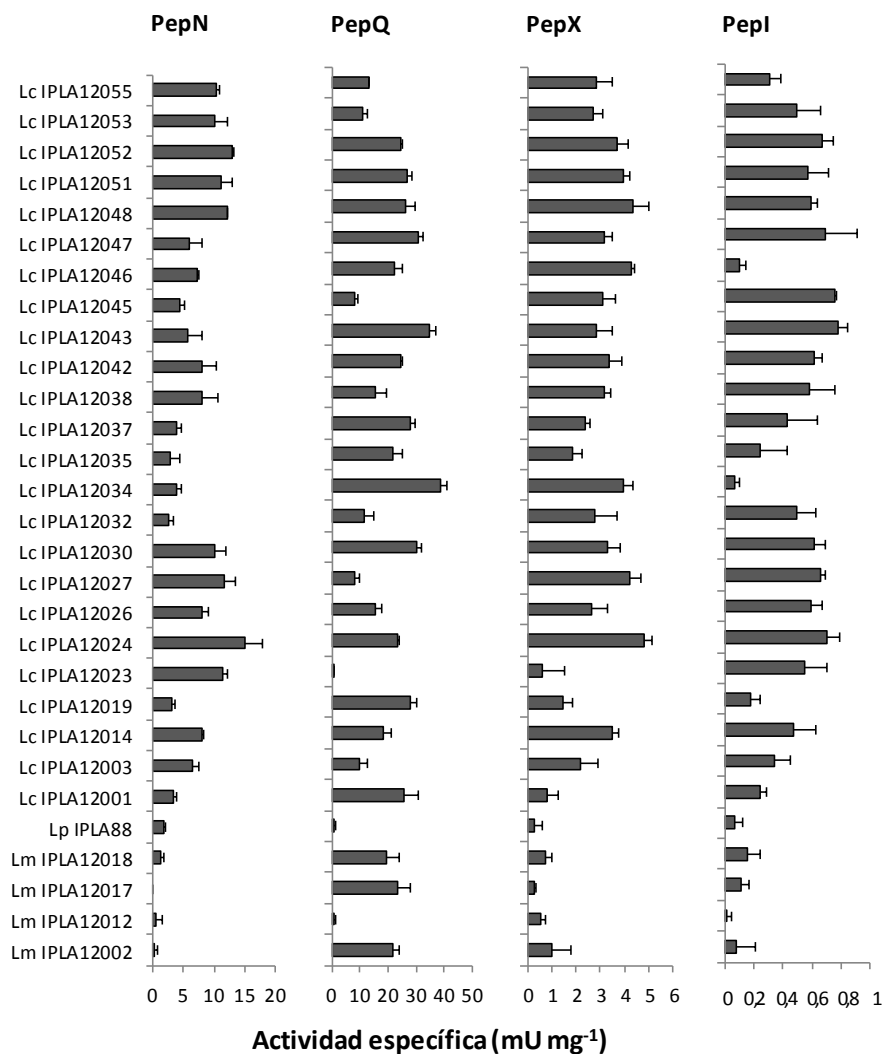


Figura 19. Niveles de actividad específica de PepN, PepQ, PepX y PepI para las 29 cepas de BAL seleccionadas. Lc, *Lactobacillus casei*; Lp, *Lactobacillus plantarum*; Lm, *Leuconostoc mesenteroides*.

3.1. Hidrólisis del péptido 33-mer

Tal y como se indicó en la introducción, uno de los principales responsables de la EC es el péptido 33-mer procedente de la α -gliadina. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue estudiar la capacidad de cada cepa para degradar este péptido. Para ello se prepararon suspensiones celulares de cada cepa en PBS (pH 7,5) y se incubaron individualmente con el péptido 33-mer (50 μ M) a 37°C. La hidrólisis del péptido se determinó mediante cromatografía (HPLC). Inicialmente se ensayaron diferentes concentraciones celulares y tiempos de incubación (datos no mostrados), obteniéndose los mejores resultados con una suspensión celular de DO₆₀₀=35 y

unos tiempos de incubación de 8 y 24 h (**Figura 20**). Cinco de las 29 cepas (17,3%) fueron capaces de degradar completamente el péptido, 6 degradaron más del 50% y las 18 restantes degradaron entre el 0–50%. La cepa *L. casei* BL23 no degradó el péptido en las condiciones ensayadas.

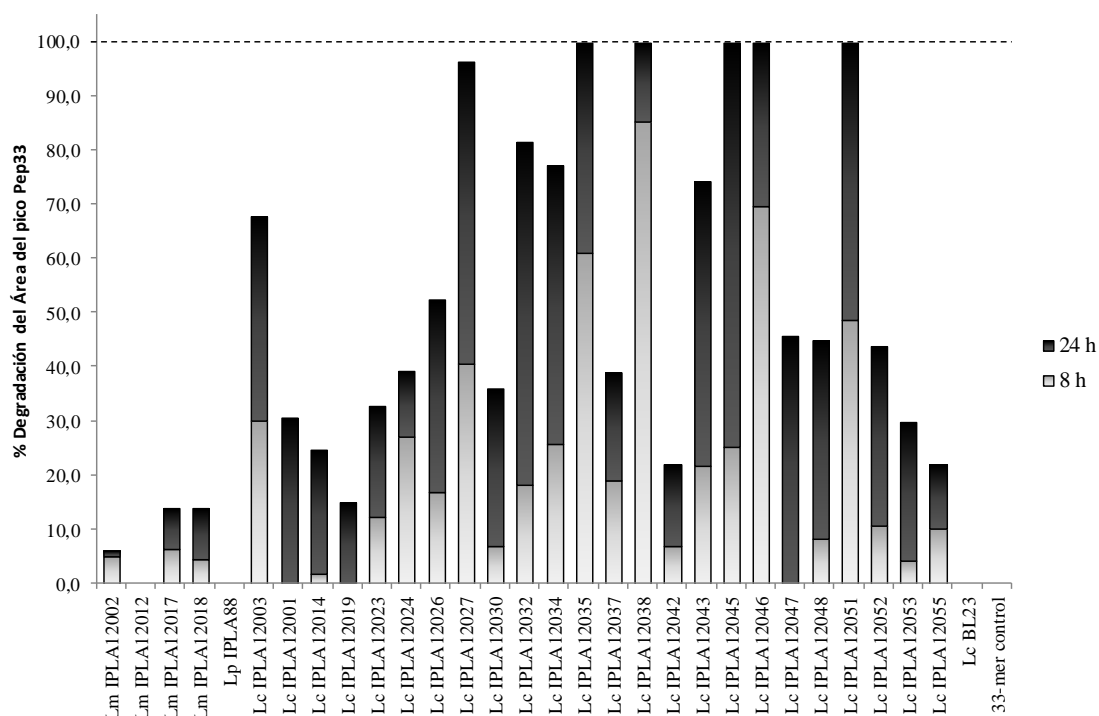


Figura 20. Determinación del porcentaje de hidrólisis del péptido 33-mer. Las 29 cepas de BAL seleccionadas, así como la cepa *L. casei* BL23, se incubaron individualmente con el péptido 33-mer durante 8 y 24 h. Como control se incubó el péptido en las mismas condiciones, pero sin ninguna cepa. La degradación del sustrato se monitorizó mediante HPLC. Las barras indican el porcentaje del área del pico del péptido que fue hidrolizado a las 8 (gris) y a las 24 (negro) h.

El análisis de los resultados reveló que las cepas de *Ln. mesenteroides* y la cepa de *L. plantarum* fueron las que menos hidrolizaron el péptido en las condiciones ensayadas. De hecho, las cepas *L. plantarum* IPLA88, *Ln. mesenteroides* IPLA12012 y *L. casei* BL23 fueron las únicas en las que el péptido se mantuvo intacto durante las 24 h de incubación. Tres de las cepas de *L. casei* fueron capaces de degradar más del 50% del péptido 33-mer a las 8h y cinco lo degradaron completamente tras 24h. De estas últimas, dos proceden del cribado de las masas fermentadas, *L. casei* IPLA12035 e IPLA12038, y tres de las muestras de contenido ruminal, *L. casei*

IPLA12045, IPLA12046 e IPLA12051. Debido a su elevada degradación del péptido, se seleccionaron las cepas *L. casei* IPLA12038 (masas fermentadas) y *L. casei* IPLA12046 (contenido ruminal) para estudios posteriores. En la **Figura 21** se muestran los cromatogramas obtenidos para ambas cepas.

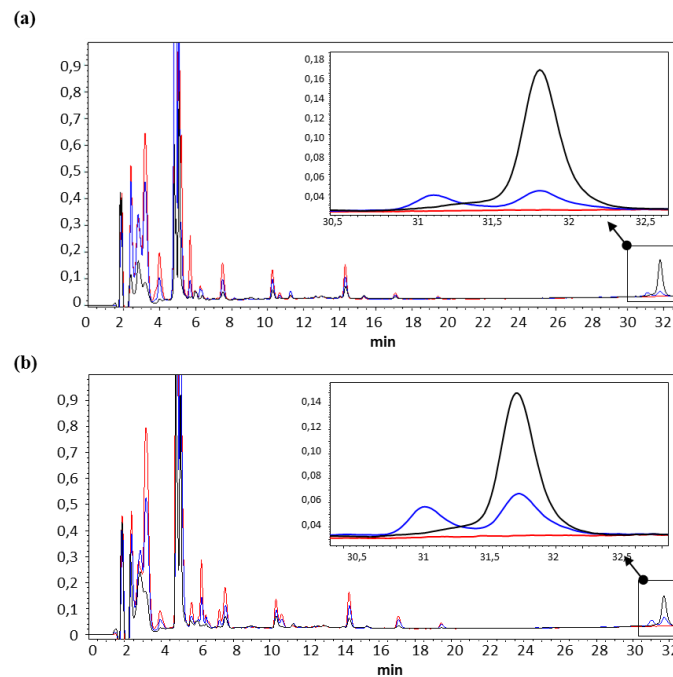


Figura 21. Hidrólisis del péptido 33-mer por las cepas *L. casei* IPLA12038 (a) y *L. casei* IPLA12046 (b). Las cepas seleccionadas se incubaron con el péptido (50 μ M) en PBS (pH 7,4) durante 0 (negro), 8 (azul) y 24 h (rojo). La hidrólisis del sustrato se monitorizó mediante HPLC. Se muestra aumentado el pico correspondiente al péptido inmunogénico-.

4. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL DE *L. casei* IPLA12038 Y *L. casei* IPLA12046

Una vez seleccionadas dos cepas que eran capaces de degradar el péptido inmunogénico, era interesante conocer si podrían ser administradas de forma oral. Con este objetivo, se comprobó si *L. casei* IPLA12038 e IPLA12046 serían capaces de resistir el estrés gastrointestinal. Para ello, se sometieron en un modelo *in vitro* a las condiciones más relevantes del estrés gástrico y gastrointestinal, considerando el efecto de la lisozima, la pepsina, el pH, las sales biliares y los enzimas pancreáticos en la viabilidad celular, a la vez que se simuló el proceso de vaciamiento gástrico, tal

y como se describe en materiales y métodos (apartado 5). El experimento se realizó con suspensiones celulares en leche, pensando que esta podría ser la matriz más adecuada para la ingesta de la cepa. Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura 22**.

Durante el ensayo del estrés gástrico, ambas cepas mantuvieron una viabilidad celular estable tras la adición de pepsina y lisozima y durante los pH 5, 4,1 y 3. En el tratamiento con los pH más bajos, pH 2,1 y 1,8, la supervivencia disminuyó 4 órdenes de magnitud, pero se mantuvo estable entre 10^4 y 10^5 ufc ml^{-1} en *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* IPLA12046 respectivamente.

En el caso del estrés gastrointestinal, la cepa *L. casei* IPLA12038 redujo la viabilidad celular en solo medio orden de magnitud tras 120 min de incubación con sales biliares y enzimas pancreáticos, en las muestras provenientes de los pH 5, 4,1 y 3. La cepa *L. casei* IPLA12046 después de la adición de sales biliares y enzimas pancreáticos, disminuyó la viabilidad celular 1,5 Log ufc ml^{-1} a los 20 min de incubación, en las muestras provenientes de los pH 4,1 y 3.

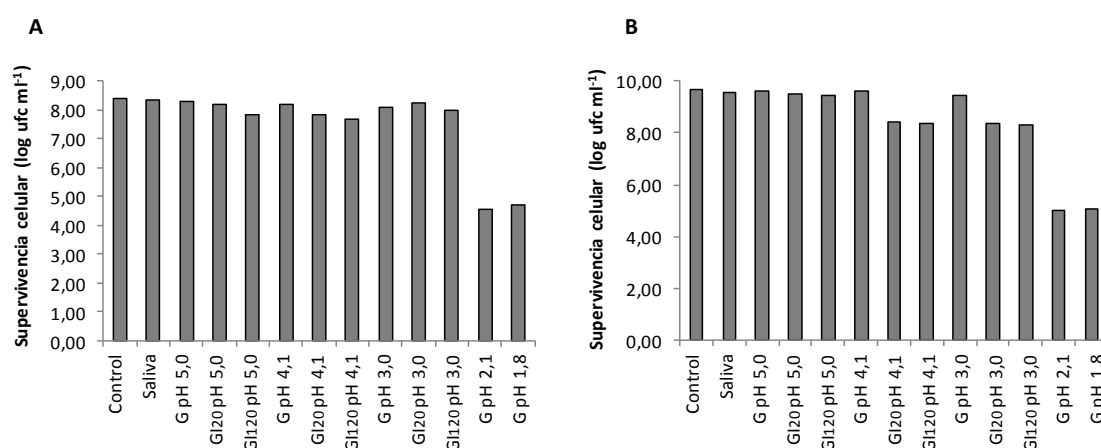


Figura 22. Supervivencia celular al estrés gástrico y gastrointestinal de las cepas *L. casei* IPLA12038 (A) y *L. casei* IPLA12046 (B). Se crecieron las cepas en MRS, se lavó el cultivo celular y se resuspendió en leche, donde se sometió a la simulación in vitro de las condiciones del tracto gastrointestinal. G, estrés gástrico (20 min) (negro); GI₂₀, estrés gastrointestinal (20 min) (blanco); GI₁₂₀, estrés gastrointestinal (120 min) (gris).

CAPÍTULO IV - SECUENCIACIÓN, ENSAMBLAJE Y ANÁLISIS DEL GENOMA DE *L. casei* IPLA12038

Teniendo en cuenta su capacidad de degradar el péptido inmunogénico y la resistencia al estrés gastrointestinal, el genoma de la cepa *L. casei* IPLA12038 fue secuenciado y analizado, con el fin de profundizar en su caracterización y tratar de identificar posibles genes implicados en la degradación del péptido 33-mer.

1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA

A partir de una preparación de ADN total de la cepa *L. casei* IPLA12038 se secuenció el genoma tal y como se describe en materiales y métodos (apartado 7.12). Se obtuvo una cobertura de aproximadamente 40X. Durante el proceso de secuenciación se realizaron 11.847.388 lecturas de 90 pb cada una, equivalentes a 1.066 Mb de datos crudos. Se realizó un filtrado eliminando aquellas secuencias que habían presentado una calidad muy baja (1,8 % de las secuencias), obteniendo finalmente 1.002 Mb de datos limpios. En la **Figura 23** se representa la distribución de calidad a lo largo de las secuencias y el proceso de filtrado que se realizó. No se observan grandes cambios tras el proceso de filtrado, puesto que la mayor parte de lecturas poseían un nivel de calidad elevado, por encima de 25. La calidad disminuye en los extremos de cada secuencia de 90 pb.

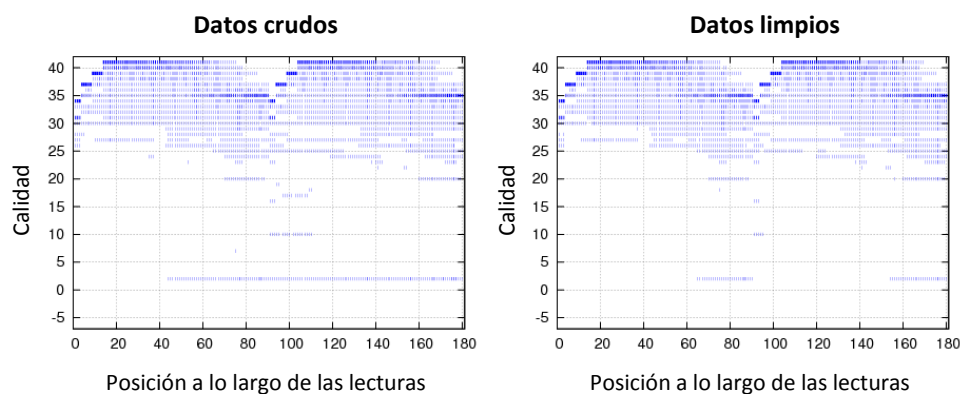
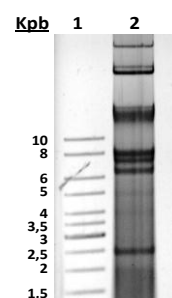


Figura 23. Distribución de calidad a lo largo de las lecturas. Se observa la distribución de calidad de las secuencias obtenidas a lo largo de las lecturas de los datos crudos (izquierda) y de los datos tras el proceso de filtrado de calidad (derecha). Se representan los dos extremos emparejados de 90 pb cada uno.

El ensamblaje de las secuencias se realizó utilizando el software Velvet y aplicando el estadístico N50, que nos da una medida de la longitud media de los contigs, dando más importancia a los más largos. Se obtuvieron un total de 3.149.613 pb, distribuidas en 125 contigs con un N50 de 91.518, siendo de 202.182 pb la longitud del contig más largo. A continuación, se utilizó el software SSPACE para realizar la extensión de los extremos de los contigs y unir los contigs que fuera posible. Se procedió también a la eliminación de las discontinuidades existentes mediante la utilización del software GapCloser, obteniéndose finalmente un total de 120 contigs. El análisis de los datos, reveló que el genoma de *L. casei* IPLA12038 está formado por un cromosoma circular y varios plásmidos, con un tamaño estimado de 3.151.760 pb y un contenido total en G+C del 46,2%. La presencia de los plásmidos se comprobó mediante lisis alcalina de la cepa y electroforesis en gel de agarosa (**Figura 24**).

Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los plásmidos de *L. casei* IPLA12038 obtenidos mediante lisis alcalina. 1, marcador de pesos moleculares. 2, *L. casei* IPLA12038. Kpb, kilobases.



Para llevar a cabo la ordenación y orientación de los contigs con el software CONTIGuator, se utilizó el genoma de la cepa *L. casei* BL23 como referencia, generándose una única secuencia virtual. En la **Figura 25** se muestra la comparación de los genomas de *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA12038 usando el software ACT (Artemis Comparison Tool), donde se señalan las zonas de homología entre ambos genomas, así como el orden y orientación de los contigs (**Figura 25**).

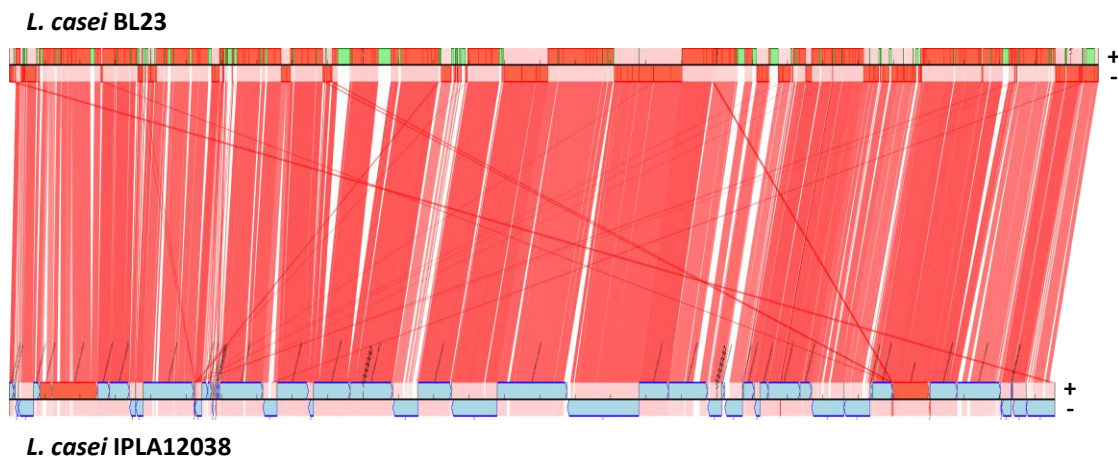


Figura 25. Comparación de los genomas de *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA12038 utilizando el software CONTIGuator y el ACT (Artemis Comparison Tool). Se representan las dos hebras, directa y reversa, de los genomas de *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA12038. Las líneas rojas representan zonas homólogas de alineamiento que comparten ambos genomas, y el porcentaje de similitud viene dado por la intensidad del color, el rojo más intenso representa el 100% de similitud BLAST. Las líneas blancas, indican zonas no homólogas en la secuencia de nucleótidos. Las cajas verdes en el genoma de referencia son secuencias de nucleótidos no homólogas pero que producen la misma secuencia aminoacídica (tblastn). En el genoma de *L. casei* IPLA12038 cada bloque representa un contig diferente, situado en la hebra y dirección correspondiente. Los bloques rojos son contigs solapados.

Con el fin de comprobar la variabilidad de la estructura genómica en la especie *L. casei*, se realizó un análisis comparativo entre los siete genomas completos de *L. casei* que se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI y la cepa *L. casei* IPLA12038. Todos estos genomas se alinearon utilizando el software Mauve (**Figura 26**).

El análisis de la comparación reveló que todas las cepas analizadas de *L. casei* poseen una organización muy parecida, con estructuras altamente conservadas y pocas reorganizaciones en el genoma, indicando que las diferencias se deberían sobre todo a pequeñas recombinaciones genéticas. Este resultado apoya la selección de la cepa *L. casei* BL23 como cepa de referencia. Además, nos proporciona información adicional, puesto que en la cepa *L. casei* IPLA12038 se observan varias zonas blancas en el interior de los bloques, que corresponderían con secuencias específicas y diferenciales con el resto de *L. casei*.

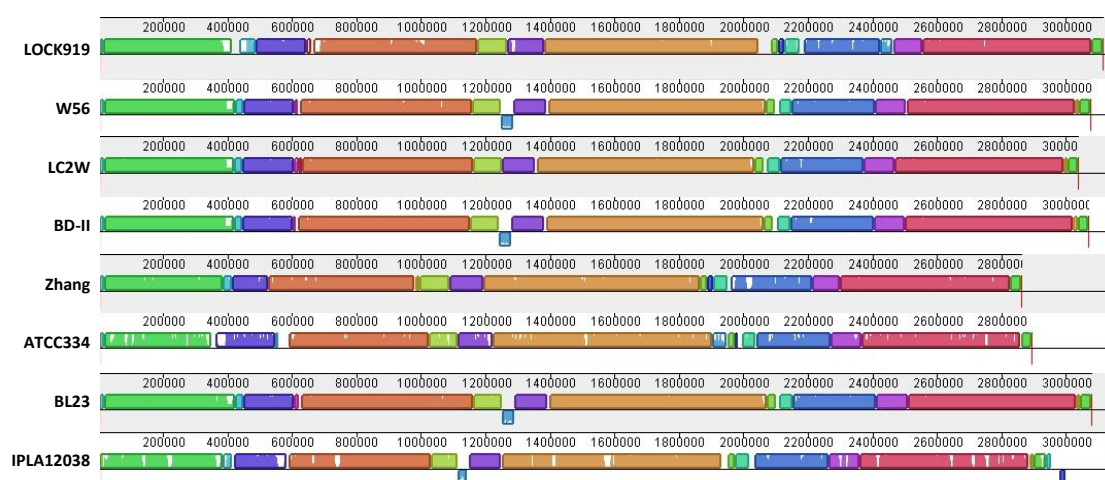


Figura 26. Alineamiento de los genomas de *L. casei*. Se han alineado los siete genomas cerrados de *L. casei*, disponibles en la base de datos del NCBI, con el *L. casei* IPLA12038 utilizando el software Progressive Mauve. Los mapas se han ajustado a la izquierda para reflejar las diferencias de longitud entre cada genoma. Las líneas rojas indican el principio y el final de cada secuencia nucleotídica. Los bloques alineados localmente señalan zonas altamente conservadas en todos los genomas analizados y las zonas blancas en el interior de estos bloques, representa zonas no homologas, específicas para cada cepa.

2. ANOTACIÓN

La anotación se realizó utilizando el servidor RAST, que predijo un total de 3.144 secuencias de ADN codificadoras (CDS, codings DNA sequences), 56 codificadoras de tRNA y 4 de rRNA.

El servidor RAST genera dos tipos de anotaciones diferentes que denomina i) anotaciones basadas en subsistemas y ii) anotaciones no basadas en subsistemas

(Figura 27). Aquellas CDS basadas en subsistemas, las agrupa en diferentes categorías en base a su función metabólica. En nuestro caso, el 41% de las CDS (1.281 CDS) pertenecieron al grupo de anotaciones basadas en subsistemas, que se dividen en 28 categorías diferentes, con sus consecuentes 346 subcategorías (Figura 27). La categoría principal la constituyen los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (472 CDS), característica que apoya la versatilidad metabólica de la especie *L. casei* y que le permite estar presente en hábitats muy diferentes. A continuación se encontraron los genes relacionados con el metabolismo de proteínas (209 CDS), donde se incluyeron genes relacionados con biosíntesis (159 CDS), degradación (28 CDS), plegamiento (12 CDS), procesado y modificación (10 CDS). Seguidos del metabolismo de aminoácidos con 127 CDS (Figura 27). Se comprobó que la cepa *L. casei* IPLA12038, al igual que había sido descrito en otros genomas de *L. casei*, no presenta genes relacionados con virulencia ni genes de resistencia a antibióticos

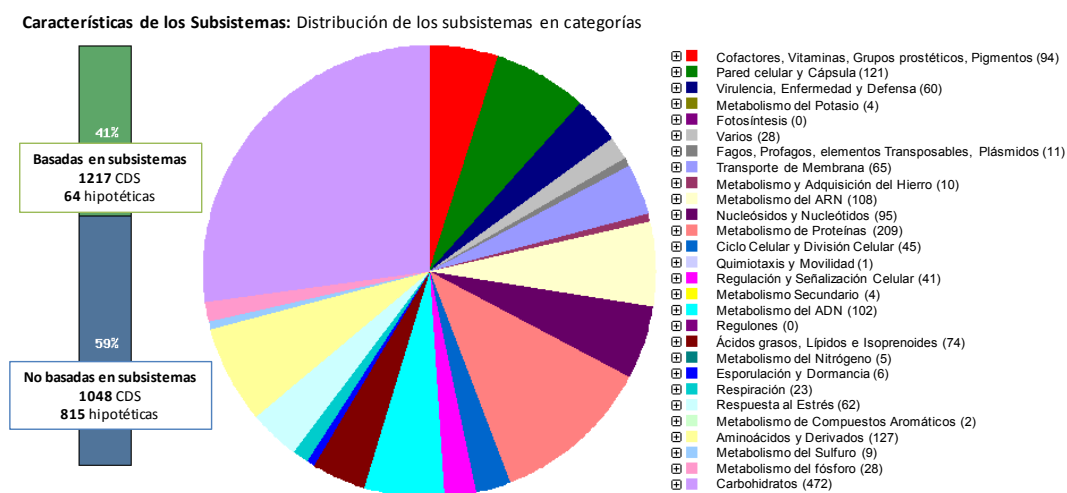


Figura 27. Clasificación por subsistemas del servidor RAST para la cepa *L. casei* IPLA12038. El servidor RAST clasificó el 41 % de los genes de la cepa *L. casei* IPLA12038 en subsistemas distribuidos en 28 categorías diferentes.

Un análisis más detallado de la anotación realizada por el RAST reveló que 930 CDS se habían clasificado como proteínas hipotéticas de función desconocida, 38 CDS eran elementos móviles y transposasas y un total de 36 CDS estaban relacionadas con bacteriófagos. Con el objetivo de identificar aquellas actividades

que pudieran estar implicadas en la hidrólisis de los péptidos del gluten, se analizaron las CDS relacionadas con el sistema proteolítico (peptidasas, proteasas y transporte). Se identificaron 187 CDS relacionados con el transporte de diferentes sustancias: iones, carbohidratos, aminoácidos y péptidos. Una vez eliminadas las peptidasas implicadas en la biosíntesis del peptidoglicano, se obtuvo un total de 25 secuencias que codifican peptidasas (**Tabla 17**) y 22 que codifican proteasas (**Tabla 18**).

Tabla 17. Lista de todos los CDS que codifican peptidasas en el genoma de *L. casei* IPLA12038 según la anotación realizada por el RAST.

Peptidasa	Especificidad	Gen	Nº genes
Aminopeptidasas			
Aminopeptidasa C	X (X) _n	<i>pepC</i>	2
Prolina iminopeptidasa	Pro (X) _n	<i>pepI</i>	3
Aminopeptidasa Ypdf	Met (X) _n o X-Pro (X) _n	<i>Ypdf</i>	2
Aminopeptidasa YpdE	Pro (X) _n	<i>YpdE</i>	1
Aminopeptidasa N	X (X) _n	<i>pepN</i>	1
Aminopeptidasa S	X (X) _n	<i>pepS</i>	1
Aminopeptidasa M (Met)	Met (X) _n	<i>pepM</i>	1
Endopeptidasas			
Endopeptidasa neutral	(X) _n (X) _n		2
Oligoendopeptidasa F	(X) _n (X) _n	<i>pepF</i>	3
Oligo-/Tri-/di-peptidasas			
Dipeptidasa D	X X	<i>pepD</i>	1
Dipeptidasa A	X X	<i>pepA</i>	2
Prolina dipeptidasa	X Pro		1
Xaa-Pro dipeptidil peptidasa	X-Pro (X) _n	<i>pepX</i>	1
Tripeptidasa T	X X-X	<i>pepT</i>	1
Isoaspartil dipeptidasa	Asp (X) _n		1
Dipeptidasa B	X X	<i>pepB</i>	1
Sin caracterizar			
Peptidasa, familia M16			1

Tabla 18 Lista de todos los CDS que codifican proteasas en el genoma de *L. casei* IPLA12038 según la anotación realizada por el RAST.

Proteasa	Nº genes
Proteasa dependiente de zinc	2
Proteasa Clp	5
Proteasa de membrana (CAAX)	4
Proteasa eep	1
Serín-proteasa	3
Carboxi-terminal proteasa ctpa	1
Cisteín-proteasa	1
Proteasa Hslv	2
Proteasa metalodependiente	1
Proteasa	1
Proteasa de membrana. Stomatinprohibitina	1

3. ANÁLISIS COMPARATIVO CON EL GENOMA DE LA CEPA *L. casei* BL23

Se realizó un análisis comparativo entre la cepa *L. casei* IPLA12038 con la cepa de referencia *L. casei* BL23 utilizando el software BRIG. Este programa permite comparar, alinear y visualizar genomas de organismos procariotas utilizando el BLAST (**Figura 28**).

El análisis muestra que la mayor parte del genoma comparte un 100% de similitud con la cepa *L. casei* BL23. Sin embargo, se observan fragmentos con menos del 50% de semejanza, demostrando las diferencias existentes entre ambas cepas.

Con el objetivo de identificar aquellas actividades específicas de la cepa *L. casei* IPLA12038 que pudieran estar relacionadas con su capacidad para degradar el péptido 33-mer, se comparó la anotación de su genoma con el de la cepa *L. casei* BL23, que no puede degradar el péptido.

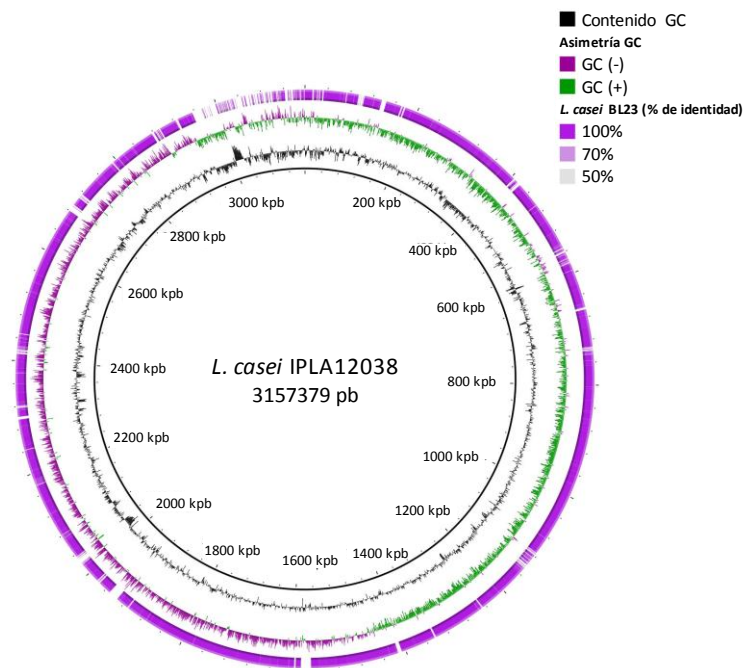


Figura 28. Análisis BRIG de las cepas *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* BL23. Los colores indican el porcentaje de similitud con la cepa *L. casei* BL23.

Se obtuvieron 366 CDS que no están en el genoma de *L. casei* BL23, lo que demuestra la gran diferencia que existe entre ambas cepas. De estas 366 CDS, 284 se encuentran anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida. Entre las 82 CDS restantes ninguna está anotada como peptidasa o proteasa, y entre ellas se encuentran proteínas que participan en distintos procesos celulares como elementos móviles y transposasas (10), algunos transportadores (5), el sistema de defensa CRISPR (4), endonucleasas (1) y otras proteínas de función variable (24), etc.

BLOQUE 2

GENERACIÓN DE BAL RECOMBINANTES

PRODUCTORAS DE PEP

CAPÍTULO V – GENERACIÓN DE *Lc. lactis* RECOMBINANTES CON ACTIVIDAD PEP

Las BAL son unas candidatas excelentes para ser utilizadas como factorías celulares (Mayo y cols., 2008). El sistema NICE es uno de los sistemas de expresión más utilizados en *Lc. lactis*. Este sistema se basa en la clonación del gen de interés bajo el control del promotor inducible por nisina (De Ruyter y cols., 1996), utilizando como hospedador la cepa *Lc. lactis* NZ9000, que posee el sistema NisRK, necesario para la traducción de la señal de la nisina.

1. CONSTRUCCIÓN DE DOS PLÁSMIDOS BASADOS EN EL SISTEMA NICE PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PEP *Sc* Y PEP *Mx*

A partir de las secuencias aminoacídicas de PEP *Mx* y de PEP *Sc* (disponibles en la base de datos del NCBI con los números de acceso AAD31004 y BAA34052.1, respectivamente), se encargó el diseño y la síntesis de los genes correspondientes, *pepMx* y *pepSc*, con el uso de codones optimizado para el género *Lactobacillus*, con el fin de mejorar la eficiencia del proceso de traducción génica. En las **Figuras 54** y **55** del apartado de datos suplementarios se muestra la secuencia nucleotídica de los genes sintéticos, y la secuencia aminoacídica correspondiente, así como el codón de inicio y de terminación y los sitios de restricción más relevantes (la secuencia del gen sintético *pepMx* se encuentra disponible en la base de datos del NCBI con el número de acceso HG321354).

Los genes sintéticos fueron clonados en el plásmido pUC57 (**Tabla 7**) (**Figura 29**), originando los plásmidos pUC57-*pepSc* y pUC57-*pepMx* (**Figura 29**).

Ambos plásmidos fueron digeridos con los enzimas de restricción *NcoI* y *XbaI* y los fragmentos resultantes de 2.180 y 2.078 pb, fueron ligados en el vector pNZ8048 (Tabla 7) (Figura 29), previamente digerido con *NcoI* y *XbaI*, de forma que queden bajo el control del promotor de la nisina. Con esta mezcla de ligación se electroporó la cepa *Lc. lactis* NZ9000 y los transformantes se seleccionaron en GM17 con cloranfenicol. A partir de las colonias obtenidas, se extrajo ADN plasmídico y se comprobó mediante análisis de restricción aquellos plásmidos que habían incorporado el inserto clonado. Los plásmidos obtenidos se denominaron pIPLA1509 y pIPLA1510, respectivamente (Figura 29).

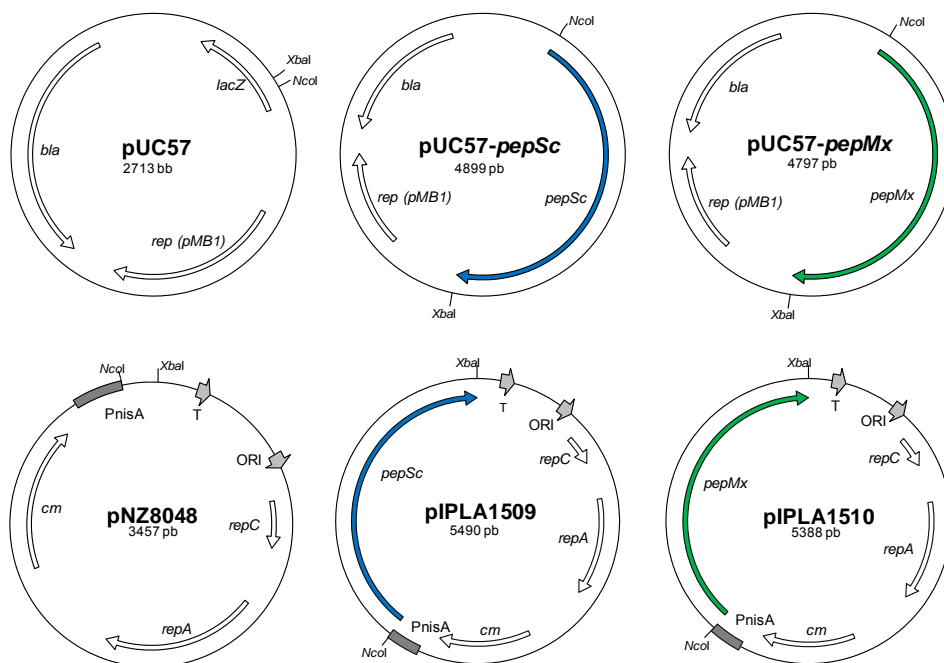


Figura 29. Mapa genético de los plásmidos pUC57, pUC57-pepSc, pUC57-pepMx, pNZ8048, pIPLA1509 y pIPLA1510. Se muestran las principales características: el gen de resistencia a cloranfenicol (*cm*), el gen de resistencia a ampicilina (*bla*), los genes de replicación (*repA*, *repC* y *rep (pMB1)*), el gen que codifica la β -galactosidasa (*LacZ*), el origen de replicación (ORI), el promotor inducible por nisina (PnisA), el terminador (T) y los genes que codifican la PEP *Sc* (*pepSc*) y la PEP *Mx* (*pepMx*). Así como los sitios de restricción más relevantes.

Con el fin de comprobar la expresión de los genes clonados se realizó la inducción de los cultivos con nisina tal y como se describe en materiales y métodos (apartado 3.2). A partir de los cultivos celulares inducidos, se obtuvieron los ELC y se ensayó la actividad PEP mediante la realización de ensayos enzimáticos colorimétricos con el sustrato específico Suc-Ala-Pro-pNA.

Como se puede observar en la **Figura 30**, la actividad PEP fue 4,4 veces más elevada en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 que produce la PEP *Mx*, que en *Lc. lactis* IPLA1509 que produce la PEP *Sc*. Cabe destacar que no se ha observado expresión basal desde el promotor en las condiciones ensayadas, puesto que cuando no se añadió nisina al cultivo no se detectó actividad PEP. Tampoco se detectó actividad PEP en la cepa *Lc. lactis* con el plásmido pNZ8048 utilizada como control e inducida de igual forma que los clones (datos no mostrados). Debido a los resultados obtenidos se seleccionó la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 que expresa la PEP *Mx* para estudios posteriores.

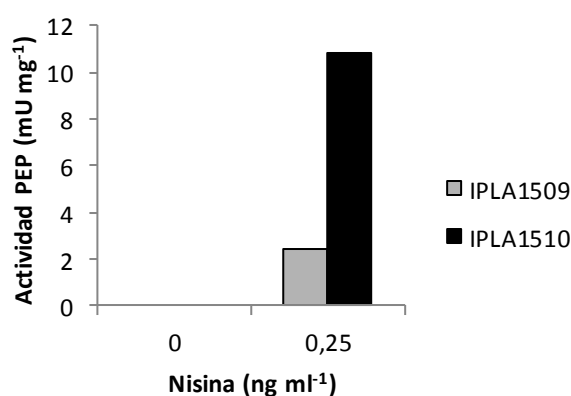


Figura 30. Actividad PEP de las cepas *Lc. lactis* IPLA1509 y *Lc. lactis* IPLA1510. Se crecieron las cepas *Lc. lactis* IPLA1509 y *Lc. lactis* IPLA1510 en M17 hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,4–0,5. Los cultivos fueron inducidos con nisina ($0,25 \text{ ng ml}^{-1}$) y se incubaron durante 2 h a 30°C . Paralelamente se incubaron otros cultivos sin inducir como control del experimento. A continuación, se ensayó la actividad PEP en los ELC.

2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE *pepMx* EN LA CEPA *Lc. lactis* IPLA1510.

Con el fin de obtener la mejor expresión posible del gen *pepMx*, se decidió optimizar la concentración de nisina y el tiempo de inducción.

2.1. Influencia de la concentración de nisina en la actividad PEP

Se creció la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 tal y como se indica en materiales y métodos (apartado 3.2), añadiendo a los cultivos diferentes concentraciones de nisina, entre 0 y 10 ng ml⁻¹. Se incubaron durante 2 h a 30°C y se recogieron las células, se rompieron, y se ensayó la actividad PEP en los ELC (**Figura 31**). Se seleccionó la concentración de 2,5 ng ml⁻¹ de nisina, como aquella concentración más baja en la que se obtienen los valores de actividad PEP más elevados (15,2 mU mg⁻¹ ± 1,4).

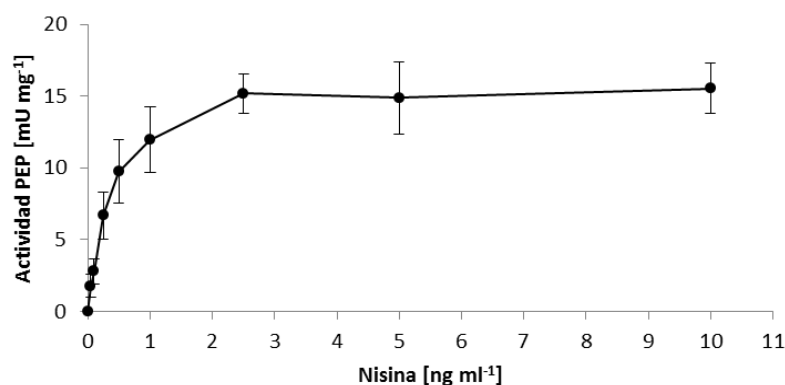


Figura 31. Efecto de la concentración de nisina en la expresión de PEP en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510. Se creció la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 en M17 hasta alcanzar un valor de DO₆₀₀ entre 0,4–0,5. A continuación se añadieron diferentes concentraciones de nisina (0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 ng ml⁻¹) y se incubó durante 2 h a 30°C. Se ensayó la actividad PEP en los ELC de los cultivos. El experimento fue realizado por triplicado, los valores indican el valor medio y la desviación estándar obtenida.

2.2. Influencia del tiempo de inducción en la actividad PEP

Otro de los parámetros que pueden influir en el nivel de expresión es el tiempo de inducción. Con el objetivo de comprobar el efecto que este tiene, se

creció la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 y los cultivo se indujeron con la concentración de nisina seleccionada en el apartado anterior ($2,5 \text{ ng ml}^{-1}$). Se recogieron alícuotas de 10 ml de cultivo a diferentes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas, y se ensayó la actividad PEP en los ELC de los cultivos celulares (**Figura 32**).

El mayor nivel de actividad PEP se detectó en el rango entre 3 y 5 h de inducción, que corresponde con unos niveles de actividad de $14,5 \pm 1,5 \text{ mU mg}^{-1}$. Por lo tanto se seleccionó un tiempo de 3 h, como tiempo óptimo de inducción para producir PEP en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510.

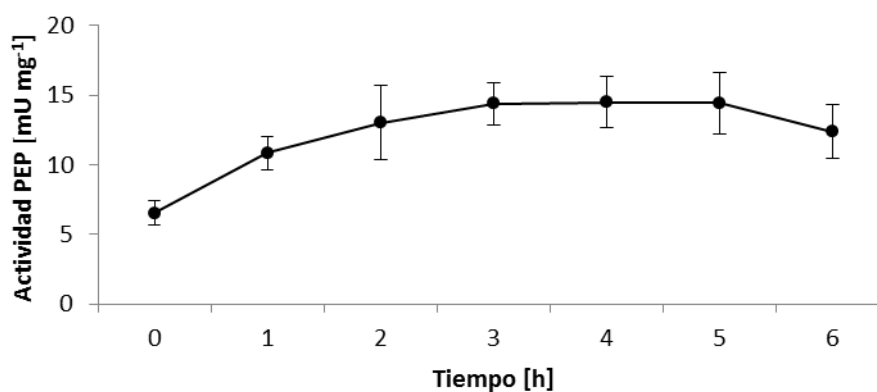


Figura 32. Influencia del tiempo de inducción en la expresión de PEP *Mx* en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510. Se creció la cepa *Lc. lactis* IPLA15010 en M17 hasta alcanzar un valor de DO_{600} 0,4 y 0,5. A continuación se indujo el cultivo con nisina ($2,5 \text{ ng ml}^{-1}$) y se incubó a 30°C durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h. Se ensayó la actividad PEP en los ELC de los cultivos. El experimento fue realizado por triplicado, los valores indican el valor medio y la desviación estándar obtenida.

3. VISUALIZACIÓN EN SDS-PAGE DE PEP *Mx*

Con el fin de visualizar la PEP formada en el ELC de la cepa *Lc. lactis* IPLA1510, se creció el cultivo celular y se indujo en las condiciones descritas anteriormente ($2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ de nisina durante 3 h de incubación). Se recogieron los cultivos celulares y se obtuvieron los ELC. Las proteínas resultantes se separaron y

visualizaron en geles de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE (**Figura 33**). Como control se utilizó la cepa *Lc. lactis* NZ9000 con el plásmido pNZ8048.

El análisis de los perfiles de bandas obtenidos mostró que ambos extractos celulares poseen el mismo patrón de bandas, como era de esperar. Sin embargo, en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 se observa una banda adicional en la zona del peso molecular esperado para el enzima PEP *Mx* (78 kDa).

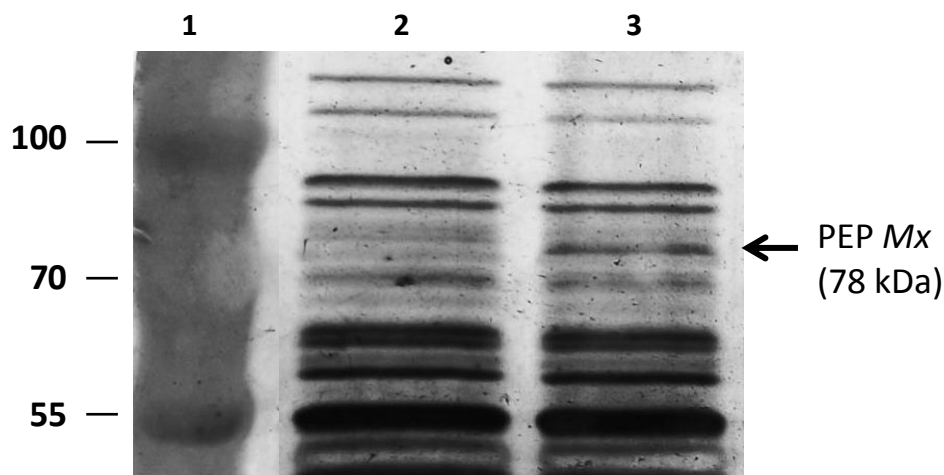


Figura 33. Análisis Tricina-SDS-PAGE. Calle 1: Marcador de pesos moleculares. Calle 2: *Lc. lactis* NZ9000:pNZ8048. Calle 3: *Lc. lactis* IPLA1510.

4. CAPACIDAD DE *Lc. lactis* IPLA1510 PARA HIDROLIZAR EL PÉPTIDO 33-MER

Como ya se ha descrito anteriormente, las PEP han sido ampliamente estudiadas debido a su posible uso como agentes terapéuticos frente a la EC. En la literatura hay estudios científicos que demuestran que el enzima PEP *Mx* purificado es capaz de degradar el péptido inmunogénico 33-mer (Shan y cols., 2004).

Con el objetivo de comprobar si el enzima PEP *Mx* producido en *Lc. lactis* era activo frente al péptido 33-mer, se creció *Lc. lactis* IPLA1510, se indujo con nisina en las condiciones seleccionadas en los apartados anteriores (2,5 ng ml⁻¹ de nisina durante 3 h de inducción) y se incubó una suspensión celular concentrada (DO₆₀₀ = 35) de este cultivo con el péptido 33-mer (25,5μM) en PBS durante 24 horas. La degradación del péptido se monitorizó mediante HPLC (**Figura 34**).

En el control sin inducir con nisina, la degradación del péptido fue de un 4%, apareciendo un nuevo pico en el minuto 31, que podría corresponderse con un producto de degradación del péptido. Sin embargo, al inducir con nisina se obtuvo una hidrólisis de un 80% del péptido y además, no se observan nuevos productos de degradación en el cromatograma.

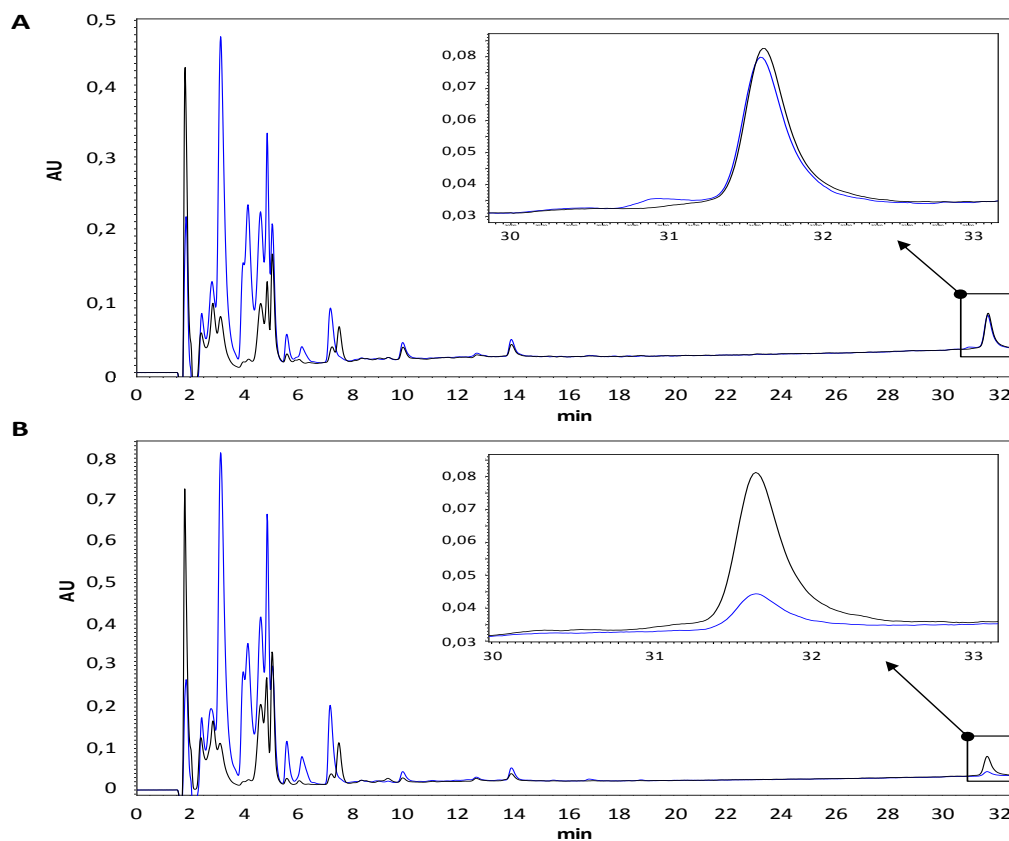


Figura 34. Hidrólisis del péptido 33-mer por *Lc. lactis* IPLA1510. Se crecieron dos cultivos de la cepa *Lc. lactis* IPLA1510 en M17 a 30°C. A las tres horas de crecimiento (DO_{600} entre 0,4 – 0,5) uno de los cultivos (A) fue inducido con nisina ($2,5 \text{ ng ml}^{-1}$) y el otro no (B). Se incubaron 3 h a 30°C, se recogieron los cultivos, se concentraron un orden de magnitud ($DO_{600} = 35$) en PBS (pH 7,4) y se incubaron con el péptido 33-mer ($25,5 \text{ } \mu\text{M}$) a 30°C durante 0 (negro) y 24 h (azul). La degradación del sustrato se monitorizó mediante HPLC. En los cromatogramas se muestra el pico que corresponde al péptido 33-mer a las 0 h (negro) y a las 24 h (azul).

CAPÍTULO VI - GENERACIÓN DE UN *L. casei* RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP *Mx* EXTRACELULARMENTE

En el capítulo V se generaron mediante biología sintética dos cepas recombinantes de *Lc. lactis* que expresan los genes que codifican PEP *Sc* y PEP *Mx*, regulados bajo la acción del promotor de la nisina. Se obtuvieron resultados positivos alcanzando una elevada expresión heteróloga, actividad enzimática y logrando la degradación del péptido inmunotóxico 33-mer. Sin embargo, este sistema presenta tres inconvenientes principales: i) la inestabilidad de los genes clonados, ya que se encuentran en plásmidos que se pueden perder con relativa facilidad, ii) estos plásmidos tienen ADN que no es de grado alimentario, como por ejemplo los genes de resistencia a antibióticos para su selección y además, ii) la expresión de los genes clonados es inducible, lo que dificulta su expresión en el TGI. Para evitar estos inconvenientes se utilizó el sistema de integración de grado alimentario desarrollado por Martín y cols. (2000), que permite la integración estable del gen de interés en el cromosoma de la bacteria hospedadora, y la posterior eliminación del ADN de grado no alimentario mediante un sistema de depuración.

1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN *pepMx* EXTRACELULARMENTE.

Para generar el plásmido integrativo se seleccionó el promotor del gen *apf* (aggregation-promoting factor) de *Lactobacillus crispatus*, que es un promotor fuerte y

constitutivo (Martin y cols., 2011). Además, el gen *apf* contiene un péptido señal que dirige la proteína al exterior celular, alcanzando niveles elevados de secreción en el sobrenadante (Jankovic y cols., 2003; Marcotte y cols., 2004; Ventura y col., 2002). El plásmido pEM182 (**Tabla 7**) se utilizó como templado para amplificar los fragmentos de ADN del gen *apf* que eran necesarios. En la **Figura 34** se representan esquemáticamente los pasos realizados en la construcción del plásmido integrativo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la **Tabla 8**. La región promotora y el péptido señal del gen *apf* se amplificaron utilizando los oligonucleótidos Papf-BglIIF y PapfSP-NcoIR (Fragmento 1). La región terminadora del gen *apf* se amplificó utilizando los cebadores term-XbaIF y term-EcoRIR (Fragmento 2). El fragmento 1 fue clonado en los sitios de *Bgl*II y *Nco*I del vector pUK21 (**Tabla 7**) generando pIPLA1214. El fragmento 2 fue clonado en los sitios *Xba*I y *Eco*RI del plásmido pIJ2925 (**Tabla 7**) generando pIPLA1215. A continuación el plásmido pIPLA1214 fue digerido con *Spe*I-*Xba*I y ligado a pIPLA1215 que había sido digerido anteriormente con *Xba*I, dando lugar a pIPLA1262.

El último paso en la construcción de los vectores integrativos fue la clonación de estos fragmentos en el vector pEM76 (**Tabla 7**), que contiene el sitio *attP* y el gen que codifica la integrasa del fago A2 para permitir la integración en el cromosoma, y dos secuencias *six* flanqueando el ADN que no es de grado alimentario que posteriormente será eliminado. Por lo tanto, el plásmido pIPLA1262 fue digerido con *Bgl*II, y el fragmento resultante de 1108 pb, fue clonado en el vector pEM76 (Martin y cols., 2000) previamente digerido con *Bam*HI, generando el plásmido integrativo pIPLA1265 (**Figura 35**).

Para facilitar la clonación del gen *pepMx* (a partir del plásmido pUC57-*pepMx* descrito en el capítulo V, **Figura 29**), en el vector integrativo pIPLA1265, se decidió realizar un paso intermedio utilizando el vector pUK21.

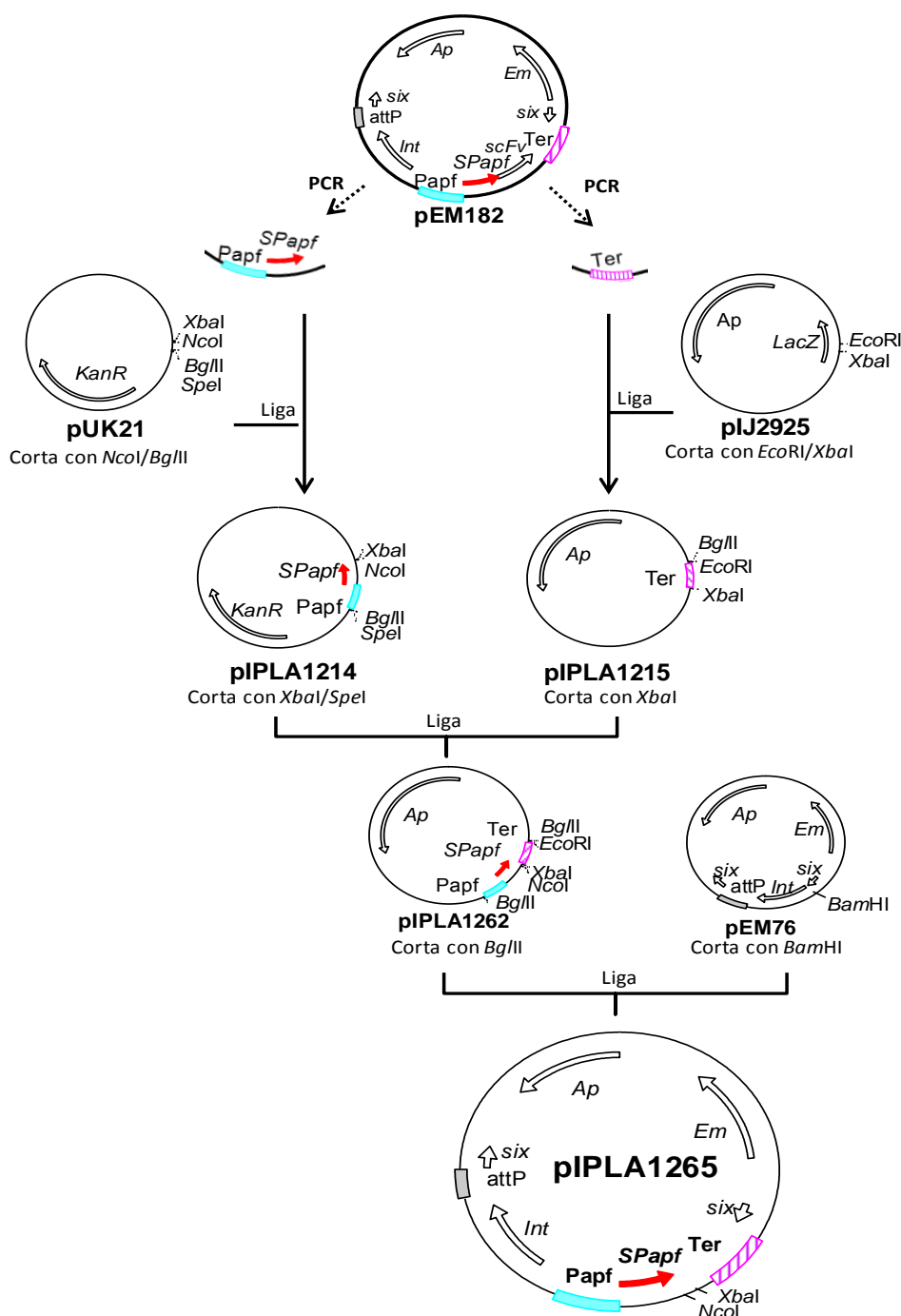


Figura 35. Esquema de los pasos realizados en la construcción del vector integrativo de expresión extracelular **pIPLA1265**. Se muestra el mapa físico y las características principales de los plásmidos **pEM182**, **pUK21**, **pIJ2925**, **pIPLA1214**, **pIPLA1215**, **pIPLA1262**, **pEM76** y **pIPLA1265**. Se han indicado los genes de resistencia a ampicilina (*Ap*), eritromicina (*Em*) y kanamicina (*KanR*), el gen que codifica la β -galactosidasa (*LacZ*), el gen que codifica el fragmento variable de cadena sencilla de llama (*scFv*), la región de integración del bacteriófago A2 (*int*, *attP*), los sitios de reconocimiento del enzima β -recombinasa (*six*), las regiones promotora, terminadora y el péptido señal del gen *apf* de *L. crispatus* (*Papf*, *Ter* y *SPapf*), y los sitios de restricción más relevantes.

el gen que codifica la β -recombinasa, con el objetivo de eliminar mediante una recombinación sitio específica el ADN de grado no alimentario localizado entre los dos sitios *six*. Los transformantes se seleccionaron en MRS con cloranfenicol. Para curar el plásmido pEM94, el cual contiene un origen de replicación termosensible, la cepa se creció a 37°C (Martin y cols., 2011). Se seleccionaron aquellos transformantes sensibles tanto a eritromicina como a cloranfenicol. La cepa resultante se denominó *L. casei* IPLA1506. La correcta integración del plásmido pIPLA1506, así como la eliminación del ADN de grado no alimentario y el pEM94, fue verificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos att1 y att7 (**Tabla 8**) y mediante hibridación Southern (datos no mostrados).

3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE PEP *Mx*

Con la intención de optimizar el medio de cultivo para obtener una producción máxima del enzima, se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono en la actividad PEP. La cepa *L. casei* IPLA1506 se creció a 37°C en CFB con glucosa, lactosa o maltosa al 0,5% como fuente de carbono. Se determinó tanto la evolución del crecimiento (DO_{600}), como el pH del cultivo celular durante 24 h (**Figura 37**). La mayor densidad y tasa de crecimiento se obtuvo en el medio suplementado con glucosa, donde la fase estacionaria se alcanzó tras 16 h de cultivo, alcanzando una DO_{600} de 3 y un pH de 4,75. Cuando el medio fue suplementado con lactosa o maltosa, a las 24 h de crecimiento aún no se había alcanzado la fase estacionaria y el pH había alcanzado unos valores de 5,1 y 5,8 respectivamente.

Se recogieron los cultivos celulares en tres tiempos diferentes (5, 13 y 24 h) y se ensayó la actividad PEP en los sobrenadantes de los cultivos libres de células. Como se puede observar en la **Figura 36**, aunque se obtuvo un mejor crecimiento en presencia de glucosa, los valores más altos de actividad se obtuvieron tras 24 h de crecimiento en presencia de lactosa (0,2 mU mg⁻¹). En presencia de maltosa la actividad PEP osciló entre 0,05 y 0,13 mU mg⁻¹. Cuando se utilizó la glucosa como fuente carbono, la actividad PEP disminuyó a lo largo de la curva de crecimiento, con niveles de actividad desde 0,1 hasta 0,001 mU mg⁻¹.

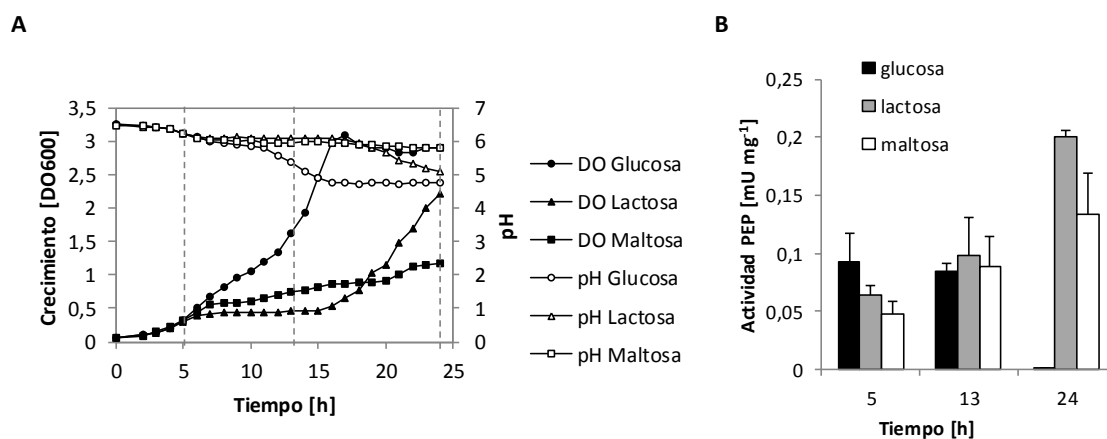


Figura 37. Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y en la producción de PEP *Mx* en la cepa *L. casei* IPLA1506. La cepa *L. casei* IPLA1506 se creció a 37°C en CFB con diferentes fuentes de carbono: glucosa, lactosa y maltosa. El panel A muestra las medidas de densidad óptica (DO_{600}) y los valores de pH en intervalos de tiempo de una hora con cada fuente de carbono. Las líneas discontinuas señalan los puntos en los que se ensayó la actividad PEP. El panel B muestra la actividad PEP en tres puntos diferentes de la curva de crecimiento (5, 13 y 24 h) y en tres fuentes de carbono diferentes (glucosa, lactosa y maltosa). Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado. Se muestra el valor medio y la desviación estándar.

4. EFECTO DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD PEP *Mx* EXTRACELULAR

En la literatura se ha descrito que el pH óptimo de la actividad del enzima PEP *Mx* es 7 (Yoshimoto y cols., 1991). Esto no es un inconveniente para la producción de PEP intracelular, puesto que las BAL son capaces de mantener un pH citoplasmático neutro incluso cuando el pH del medio externo varía (Nyanga-Koumou y cols., 2012). Sin embargo, la acidificación del medio de cultivo podría ser responsable de la baja actividad registrada en la actividad de la PEP extracelular en glucosa. Para comprobarlo, se creció la cepa *L. casei* IPLA1506 en un birreactor [CFB (0,5% glucosa)] y se ensayó la actividad PEP en el sobrenadante de los cultivos crecidos a pH libre y a diferentes valores de pH controlado: 5, 6 y 7 (**Figura 38**).

En el cultivo crecido a pH libre la actividad PEP desapareció completamente tras 14 h de crecimiento, punto que coincidió con un valor de pH 4,7. No se detectó actividad PEP en el cultivo a pH 5 controlado. Sin embargo, en los cultivos crecidos a pH 6 y a pH 7, la actividad PEP aumentó a lo largo del tiempo. A pH 6, la

actividad PEP en el medio de cultivo aumentó hasta alcanzar un valor de 0,7 mU mg⁻¹, lo que corresponde a un valor cuatro veces más alto que el máximo valor obtenido en ausencia de control de pH. A pH 7 la actividad PEP se incrementó pronunciadamente, con un máximo de actividad registrado de 2,5 mU mg⁻¹ tras 22 horas de crecimiento, 14 veces más elevado que en ausencia de control de pH.

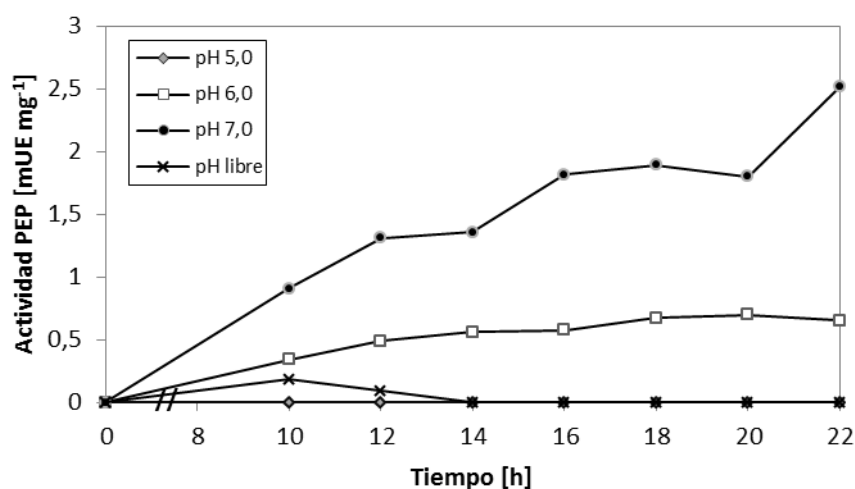


Figura 38. Producción de PEP por la cepa *L. casei* IPLA1506 a diferentes valores de pH. La cepa *L. casei* IPLA1506 se creció en un biorreactor tanto a pH libre, como a diversos valores de pH controlado: pH 5, pH 6 y pH 7. La actividad PEP se determinó en el sobrenadante del cultivo celular.

Para verificar que la proteína PEP M_x de la cepa *L. casei* IPLA1506 estaba siendo procesada adecuadamente durante el proceso de secreción y que se encontraba intacta en el medio de cultivo, las proteínas del sobrenadante fueron analizadas mediante SDS-PAGE (**Figura 39**). El perfil de proteínas secretadas fue similar a la de la cepa hospedadora (*L. casei* BL23), pero en la cepa *L. casei* IPLA1506 que tiene integrado el gen *pepM_x*, se observó una banda extra, cuyo tamaño corresponde con el tamaño esperado para el enzima PEP M_x .

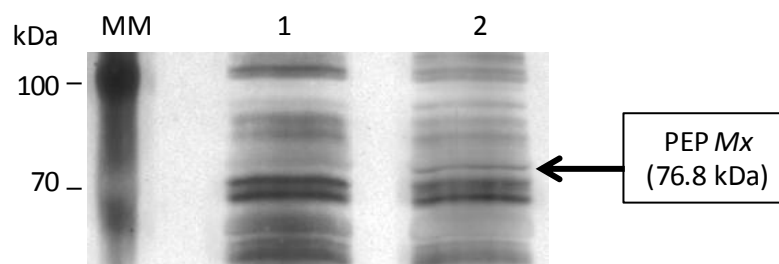


Figura 39. Análisis SDS-PAGE de las proteínas secretadas por *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA1506. Las proteínas del sobrenadante de *L. casei* BL23 y de *L. casei* IPLA1506 se precipitaron y se analizaron mediante SDS-PAGE. MM, marcador de pesos moleculares; 1, *L. casei* BL23; 2, *L. casei* IPLA1506.

5. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer

Con el objetivo de determinar si el enzima PEP *Mx* producido en la cepa *L. casei* IPLA1506 es capaz de hidrolizar el péptido inmunogénico, se incubó la cepa con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12 h a 37°C. La degradación del péptido 33-mer se monitorizó mediante HPLC (**Figura 40**). Como control negativo del experimento se utilizó la cepa *L. casei* BL23.

La cepa *L. casei* IPLA1506 fue capaz de degradar un 63% del péptido tras 8 horas de incubación y casi por completo después de 12 h. Además, no se observó la aparición de productos de degradación en el cromatograma. La cepa control *L. casei* BL23 no fue capaz de degradar el péptido de 33-mer en las condiciones ensayadas (**Figura 40**).

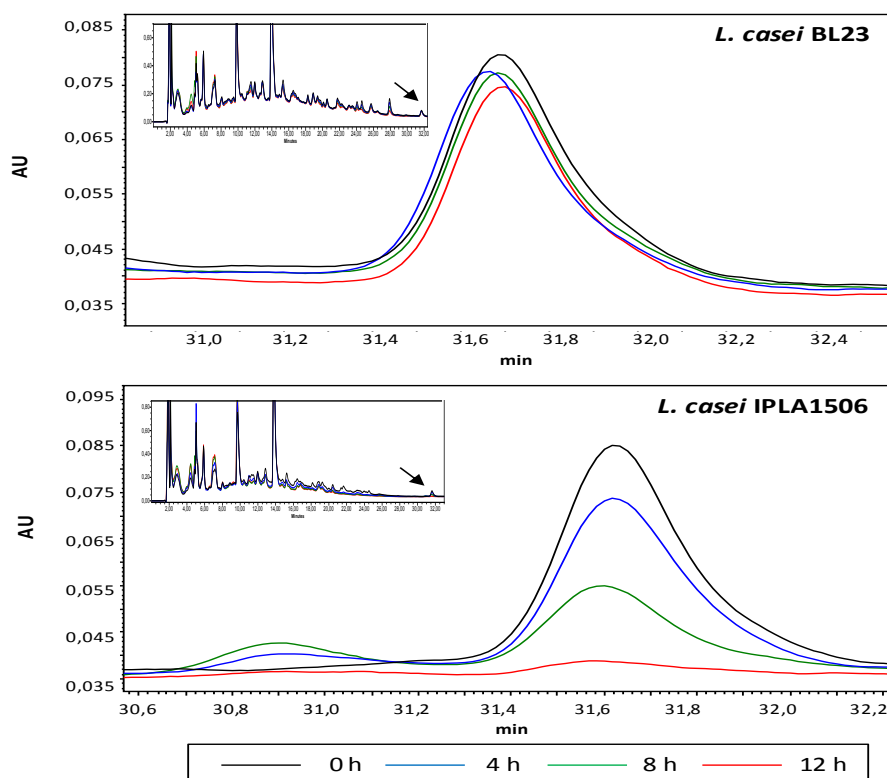


Figura 40. Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer. Las cepas *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA1506 fueron incubadas con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12 horas. Cada cuatro horas se recogieron alícuotas y la concentración del sustrato se monitorizó mediante análisis HPLC. Los cromatogramas muestran la degradación del péptido 33-mer a lo largo del tiempo. El cromatograma completo se observa en un cuadro con el sustrato señalado con una flecha.

Para comprobar si *L. casei* IPLA1506 es capaz de eliminar todos los epítomos tóxicos del péptido 33-mer, tanto las muestras de la cepa *L. casei* IPLA1506 como las de la cepa control *L. casei* BL23 se analizaron mediante LC-MS. En este caso la actividad peptidasa se monitorizó en un rango de 0 a 16h. Tras 8 horas de incubación, la cepa *L. casei* IPLA1506 hidrolizó el 73% del péptido, el cual fue totalmente degradado a las 16 h y además, no se detectaron productos o intermediarios de la degradación (**Figura 41**).

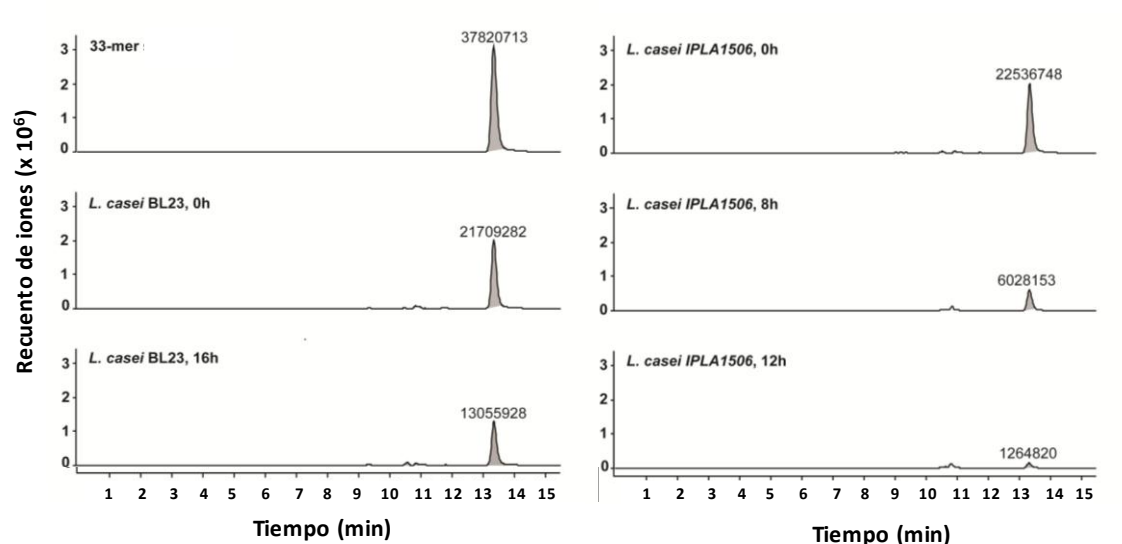


Figura 41. Análisis LC-MS de los productos de la degradación del 33-mer. Las cepas *L. casei* BL23 y *L. casei* IPLA1506 se incubaron con el péptido de 33-mer (25,5 μ M) durante 16 h a 37°C. Se recogieron alícuotas cada cuatro horas y se analizaron mediante LC-MS. Tras 16 h de incubación con la cepa *L. casei* IPLA1506, el 33-mer se encuentra bajo los límites de cuantificación del instrumento. El péptido de 33-mer es señalado en gris y los rótulos representan el recuento absoluto de iones.

6. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL

Para comprobar la resistencia al paso por el TGI, se sometió a la cepa *L. casei* IPLA1506 a las condiciones del TGI simuladas *in vitro*. El experimento se realizó con la cepa resuspendida en diferentes matrices (solución salina, MRS y leche desnatada). Cuando la cepa se resuspendió en solución salina o en MRS fresco y se simuló el paso por el TGI, la supervivencia al estrés gástrico se mantuvo estable hasta que alcanzó los valores de pH más bajos (2,1 y 1,8), donde el recuento de viables disminuyó 6 y 4 órdenes de magnitud respectivamente. En las condiciones gastrointestinales, tras la adición de las sales biliares y de los enzimas pancreáticos, en el cultivo resuspendido en solución salina la viabilidad celular disminuyó 7 órdenes de magnitud en las muestras provenientes de los pH 5, 4,1 y 3. En el cultivo resuspendido en MRS, las condiciones gastrointestinales causaron una disminución de 2 órdenes de magnitud en la muestra proveniente del pH 5, y de 6 y 5 órdenes de magnitud en las muestras provenientes de los pH 4,1 y 3, respectivamente (datos no mostrados).

Cuando la cepa se resuspendió en leche, ni la lisozima ni la pepsina afectaron la viabilidad celular en el rango de pH de 3-5. A pH 2,1 el recuento bacteriano disminuyó 1,3 órdenes de magnitud, mientras que a pH 1,8 el recuento de colonias bajó 3,4 órdenes de magnitud (**Figura 42**). Para simular el estrés gastrointestinal, se tomaron aquellas muestras provenientes del estrés gástrico a pH 3, 4 y 5, y se incubaron con 0,3% de sales biliares y 0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tripsina, quimiotripsina y amilasa durante 20 (GI₂₀) y 120 (GI₁₂₀) minutos (**Figura 42**). Estas condiciones causaron una ligera reducción en la viabilidad celular (un orden de magnitud menos). Por lo tanto, cuando las células se resuspenden en leche se consigue una buena resistencia al estrés. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en trabajos previos, que demuestran el papel protector de la leche en la viabilidad celular de las BAL, a través del paso por el TGI (Conway y cols., 1987; Charteris y cols., 1998; Wang y cols., 2012).

Para comprobar que *L. casei* IPLA1506 mantenía la capacidad de producir y secretar PEP activa, tras ser sometida a estrés gastrointestinal, las muestras provenientes de GI₂₀ y de GI₁₂₀ fueron usadas como inóculo en CFB y tras 4 horas de incubación se comprobó que efectivamente se detectaba actividad PEP en el sobrenadante, verificando que la cepa mantenía la capacidad de secretar PEP de manera activa.

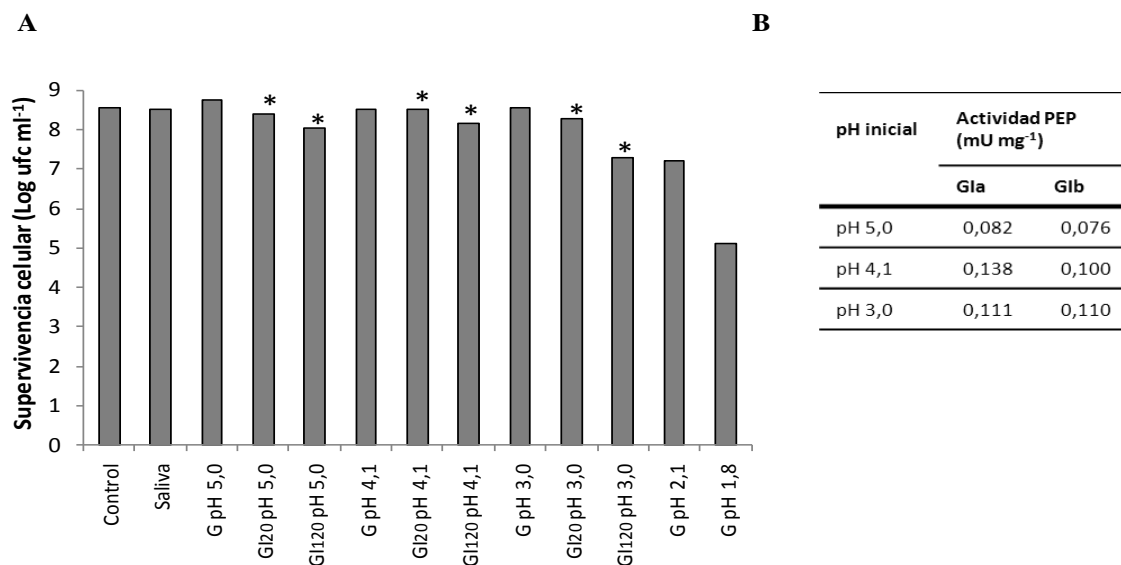


Figura 42. Supervivencia celular (A) y producción de PEP (B) de *L. casei* IPLA1506 en condiciones gastrointestinales. La cepa *L. casei* IPLA1506 se resuspendió en leche y se sometió a las condiciones gastrointestinales simuladas in vitro para determinar la supervivencia celular. Para simular el estrés gástrico (G), las muestras fueron incubadas con lisozima y pepsina a valores de pH decrecientes. Para simular el estrés gastrointestinal (GI), las muestras provenientes de los pH 5, pH 4,1 y pH 3 fueron incubadas posteriormente con sales biliares y enzimas pancreáticos durante 20 (GI₂₀) y 120 (GI₁₂₀) minutos. Las muestras provenientes de GI₂₀ y de GI₁₂₀ (*) fueron usadas como preinóculo en un medio fresco, en el que se ensayó la actividad PEP tras 4 horas de crecimiento.

CAPÍTULO VII - GENERACIÓN DE UN *L. casei* RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP *Mx* INTRACELULARMENTE

1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN *pepMx* INTRACELULARMENTE.

Para desarrollar el plásmido integrativo se seleccionó de nuevo el promotor del gen *apf* de *L. crispatus*, y se generó tal y como se realizó en el capítulo VI para construir el plásmido integrativo de expresión extracelular pIPLA1265 (**Figura 34**), pero en este caso no se clonó el péptido señal del gen *apf*, obteniendo así una expresión intracelular (Martin y cols., 2011). En la **Figura 43** se representan los pasos realizados en la construcción del plásmido integrativo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la **Tabla 8**. A partir del plásmido pEM182 (**Tabla 7**) se amplificó la región promotora del gen *apf* utilizando los oligonucleótidos Papf-BglIIIF y Papf- NcoIR (Fragmento 3). El Fragmento 3 fue clonado en los sitios de *Bgl*II y *Nco*I del vector pUK21 (**Tabla 7**) generando pIPLA1253. A continuación el plásmido pIPLA1253 fue digerido con *Spe*I-*Xba*I y ligado a pIPLA1215 (**Tabla 7**) (**Figura 35**) que había sido digerido anteriormente con *Xba*I, dando lugar a pIPLA1254. Por último, el plásmido pIPLA1254 fue digerido con *Bgl*II, y el fragmento resultante de 984 pb fue clonado en el vector pEM76 (**Tabla 7**) (Martin y cols., 2000) previamente digerido con *Bam*HI, generando el plásmido integrativo pIPLA1258 (**Figura 43**).

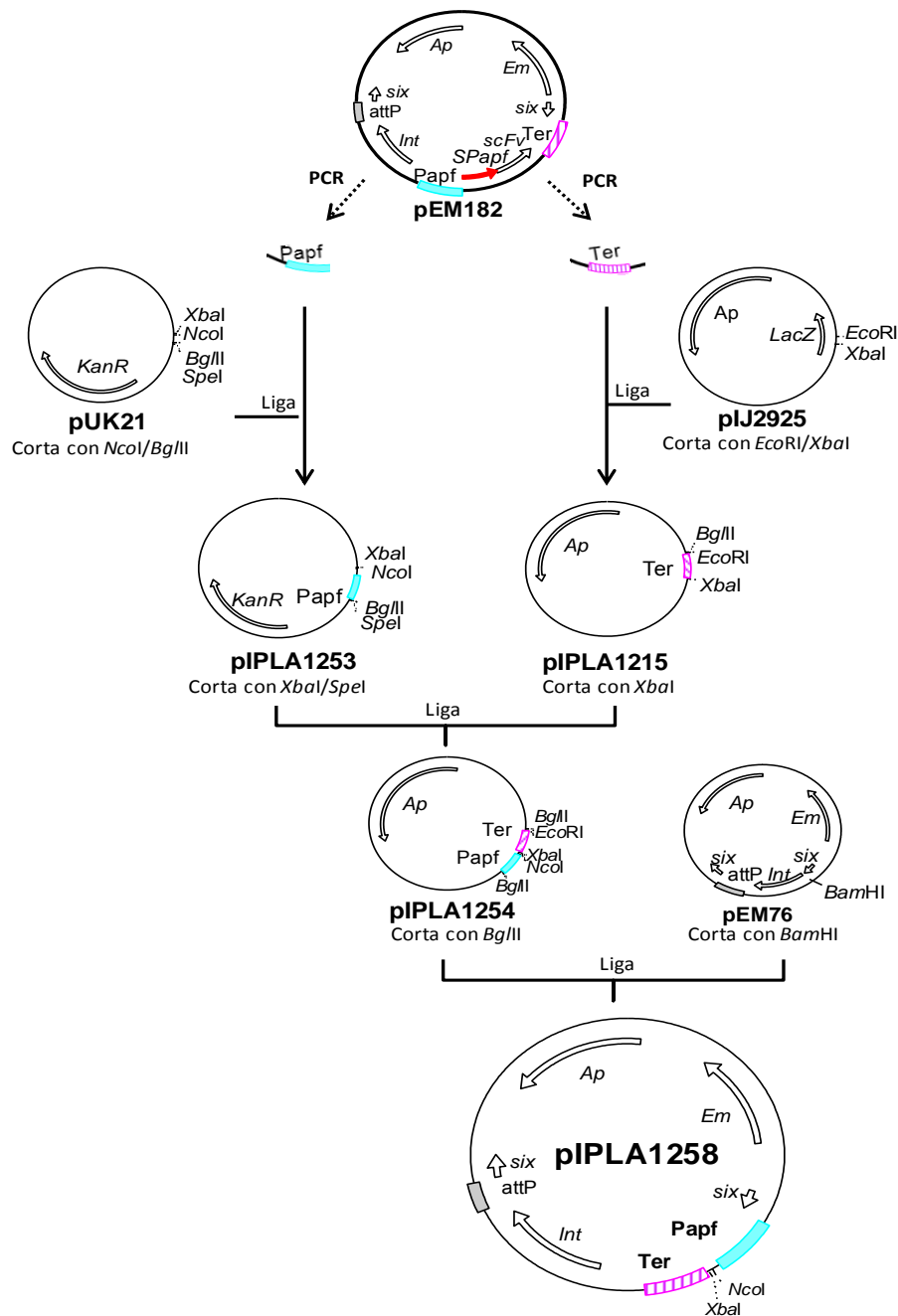


Figura 43. Esquema de los pasos realizados en la construcción del vector integrativo de expresión extracelular pIPLA1265. Se muestra el mapa físico y las características principales de los plásmidos pEM182, pUK21, pIJ2925, pIPLA1253, pIPLA1215, pIPLA1254, pEM76 y pIPLA1258. Se han indicado los genes de resistencia a ampicilina (*Ap*), eritromicina (*Em*) y kanamicina (*KanR*), el gen que codifica la β -galactosidasa (*LacZ*), el gen que codifica el fragmento variable de cadena sencilla de llama (*scFv*), la región de integración del bacteriófago A2 (*int*, *attP*), los sitios de reconocimiento del enzima β -recombinasa (*six*), las regiones promotora, terminadora y el péptido señal del gen *apf* de *L. crispatus* (*Papf*, *Ter* y *SPapf*), así como los sitios de restricción más relevantes.

resultante se denominó *L. casei* IPLA1503. La correcta integración del plásmido pIPLA1503, así como la eliminación del ADN de grado no alimentario y del pEM94, fue verificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos att1 y att7 (Tabla 8) y mediante hibridación Southern (datos no mostrados).

3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE PEP *Mx*

Al igual que se hizo con la cepa *L. casei* IPLA1506 en el capítulo VI, se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono en la actividad PEP *Mx* intracelular. La cepa *L. casei* IPLA1503 se creció a 37°C en CFB con glucosa, lactosa o maltosa al 0,5% como fuente de carbono. El crecimiento fue similar al de la cepa *L. casei* IPLA1506 (Figura 37).

Se recogieron los cultivos celulares en tres tiempos diferentes (5, 13 y 24 h) y se ensayó la actividad PEP en los ELC. A pesar de haber obtenido el mejor crecimiento en presencia de glucosa, los valores más altos de actividad se registraron en presencia de lactosa (1,9 mU mg⁻¹). En presencia de maltosa la actividad PEP osciló entre 0,7 y 1,6 mU mg⁻¹. Cuando se utilizó la glucosa como fuente carbono, la actividad PEP disminuyó a lo largo de la curva de crecimiento, desde 1,1 hasta 0,1 mU mg⁻¹ (Figura 45).

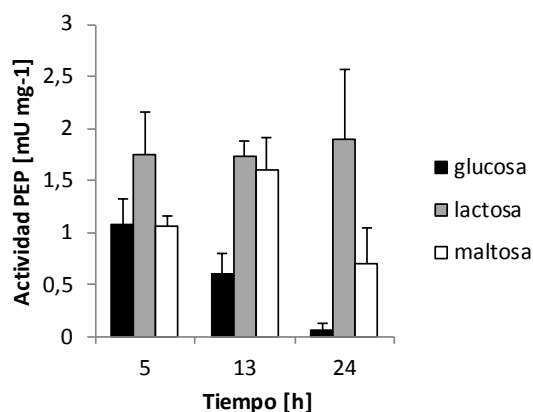


Figura 45. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de PEP *Mx* en la cepa *L. casei* IPLA1503. Se muestra la actividad PEP registrada en tres puntos diferentes de la curva de crecimiento (5, 13 y 24 h) y en tres fuentes de carbono diferentes

(glucosa, lactosa y maltosa). Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado. Se muestra el valor medio y la desviación estándar.

4. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer

Con el objetivo de determinar si la cepa *L. casei* IPLA1503 es capaz de hidrolizar el péptido inmunogénico, se incubó con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12 h a 37°C. La degradación del péptido se monitorizó mediante HPLC (Figura 45).

La cepa *L. casei* IPLA1503 fue capaz de degradar un 63% del péptido tras 12 horas de incubación y se observó la aparición de posibles productos de degradación que eluyeron en el minuto 31 (Figura 46).

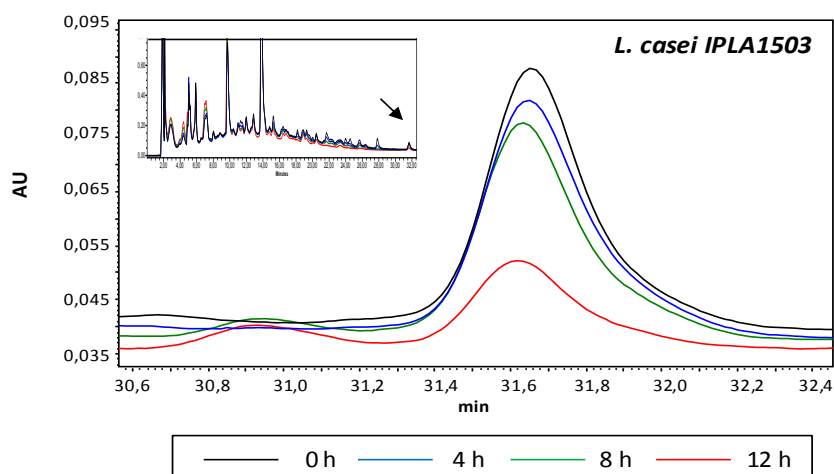


Figura 46. Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer. La cepa *L. casei* IPLA1503 se incubó con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12h. Cada 4h se recogieron alícuotas y la concentración del sustrato se monitorizó mediante análisis HPLC. El cromatograma muestra la degradación del péptido 33-mer a lo largo del tiempo. El cromatograma completo se observa en un cuadro con el sustrato señalado con una flecha.

CAPÍTULO VIII - GENERACIÓN DE UN *L. casei*

RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP *Sc* EXTRACELULARMENTE

Además de la PEP *Mx*, la PEP *Sc* está siendo muy estudiada debido a su elevada afinidad por los péptidos pequeños del gluten, así como por su actividad y estabilidad a pH ácido (Shan y cols., 2004). El objetivo del presente capítulo fue generar una cepa recombinantes de *L. casei* que contenga el gen que codifica la PEP *Sc* (*pepSc*) integrado en el cromosoma y que produzca el enzima extracelularmente.

1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN *pepSc* EXTRACELULARMENTE

Para generar el plásmido integrativo, se partió del plásmido de expresión extracelular pIPLA1265 (**Tabla 7, Figura 35**) descrito en el capítulo VI. Para facilitar la clonación del gen *pepSc* (a partir del plásmido pUC57-*pepSc* descrito en el capítulo V, **Figura 29**) en el vector integrativo pIPLA1265, se decidió realizar un paso intermedio utilizando el vector pUK21.

El gen *pepSc* se clonó como un fragmento *XbaI-NcoI* de 2,2 kb en el vector pUK21 previamente digerido con los mismos enzimas de restricción, generando el plásmido pIPLA1501. El plásmido pIPLA1501 fue digerido con los enzimas *NcoI-XbaI* y el fragmento resultante (el gen *pepSc*) fue clonado en el plásmidos integrativo

pIPLA1265, que había sido digerido con los mismos enzimas de restricción. La mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli*. A partir de los transformantes obtenidos se extrajo ADN plasmídico y se comprobó la correcta clonación del gen *pepSc* mediante análisis de restricción. El plásmido obtenido se denominó pIPLA1507 (**Figura 47**).

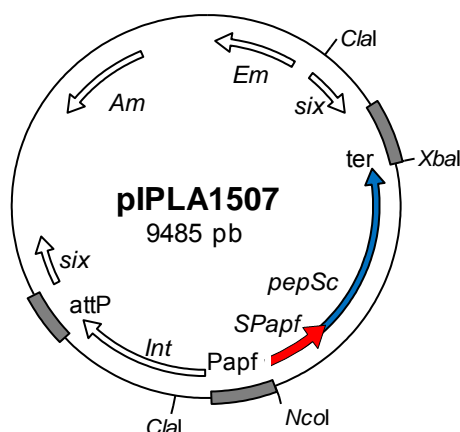


Figura 47. Mapa genético del plásmido integrativo pIPLA1507. Se muestra el mapa físico y las características principales. Se ha indicado el gen de resistencia a ampicilina (*Ap*) y a eritromicina (*Em*), la región de integración del bacteriófago A2 (*int-attP*), los sitios de reconocimiento del enzima β -recombinasa (*six*), las regiones promotora, terminadora y el péptido señal del gen *apf* de *L. crispatus* (*Papf*, *ter* y *SPapf*) y el gen que codifica la PEP *Sc* (*pepSc*). También se han señalado los sitios de restricción más relevantes.

2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1507 EN EL CROMOSOMA DE *L. casei* BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO

Para generar la cepa *L. casei* con el gen *pepSc* integrado en el cromosoma, se electroporó la cepa *L. casei* BL23 (**Tabla 6**) con el plásmido integrativo pIPLA1507 (**Figura 47**). Como se indicó en los capítulos anteriores, se seleccionaron los transformantes crecidos en MRS con eritromicina. Se comprobó la correcta integración del vector mediante PCR y la cepa resultante se transformó con el plásmido replicativo pEM94 (**Tabla 7**), que contiene el gen que codifica la β -recombinasa, para eliminar mediante una recombinación sitio específica, el ADN de grado no alimentario localizado entre los dos sitios *six*. Los transformantes se seleccionaron en MRS con cloranfenicol. Como el plásmido pEM94 tiene un origen

de replicación termosensible, la cepa se creció posteriormente a 37°C para su curación (Martin y cols., 2011). La cepa resultante se denominó *L. casei* IPLA1507. La correcta integración del plásmido pIPLA1507, así como la eliminación del ADN de grado no alimentario y del pEM94, se verificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos att1 y att7 (**Tabla 8**) y mediante hibridación Southern (datos no mostrados).

3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN EXTRACELULAR DE PEP Sc

Con la intención de optimizar el medio de cultivo para obtener una producción máxima del enzima, se estudió el efecto de diferentes fuentes de carbono en la actividad PEP. Se creció la cepa *L. casei* IPLA1507 a 37°C en CFB con glucosa, lactosa o maltosa como fuente de carbono al 0,5%, y se determinó el crecimiento del cultivo celular (DO_{600}), la evolución del pH y la actividad PEP (**Figura 48**).

Los resultados muestran un mejor crecimiento en el medio suplementado con glucosa, donde la fase estacionaria se alcanzó tras 12 h de crecimiento con una DO_{600} de 4,2 y un pH de 4,2. En presencia de maltosa, la fase estacionaria se alcanzó a las 15 h de incubación con una DO_{600} de 1,84 y un valor de pH de 5,1. Cuando se suplementó el medio con lactosa, la fase estacionaria se retrasó y el pH disminuyó hasta 4,7.

Los niveles de actividad PEP más elevados se obtuvieron en presencia de glucosa (0,12 mU mg⁻¹). En presencia de lactosa, la actividad PEP alcanzó valores de 0,09 mU mg⁻¹. Cuando se utilizó maltosa como fuente de carbono, la actividad PEP osciló entre 0,003 y 0,03 mU mg⁻¹. En este caso no se observó una disminución de la actividad PEP debida a la acidificación del medio de cultivo.

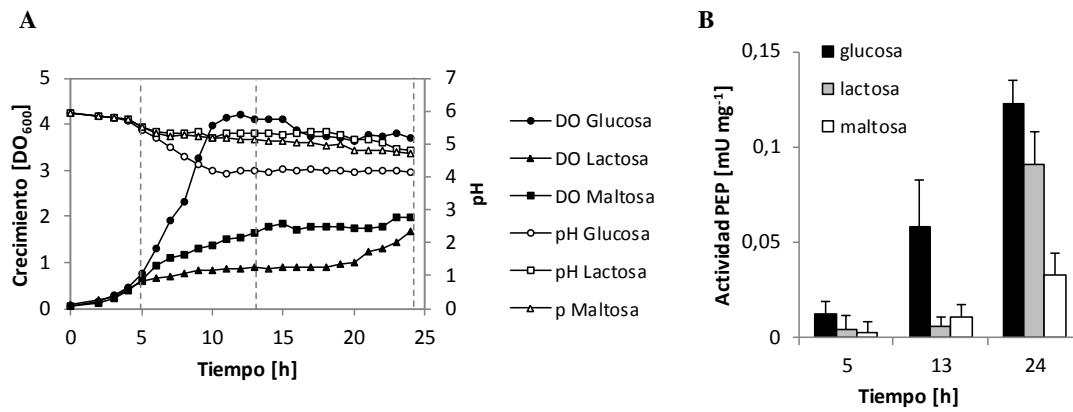


Figura 48. Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y en la producción de PEP *Sc* de la cepa *L. casei* IPLA1507. La cepa *L. casei* IPLA1507 se creció a 37°C en CFB con diferentes fuentes de carbono: glucosa, lactosa y maltosa. El panel A muestra las medidas de densidad óptica (DO_{600 nm}) y los valores de pH en intervalos de tiempo de una hora con cada fuente de carbono. Las líneas discontinuas señalan los puntos en los que se midió la actividad PEP. El panel B muestra la producción de PEP en tres puntos diferentes de la curva de crecimiento (5, 13 y 24 h) y en tres fuentes de carbono diferentes (glucosa, lactosa y maltosa). Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado. Se muestra el valor medio y la desviación estándar.

4. EFECTO DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD PEP *Sc* EXTRACELULAR

Aunque PEP *Sc* ha sido descrita como una enzima más activa y estable en condiciones gástricas, los pH bajos impiden la óptima activación del enzima, manteniendo niveles sub-óptimos de actividad (Shan y cols., 2004; Ehren y cols., 2008; Kabashima y cols., 1998; Gass y cols., 2007). Para conocer la influencia del pH en el enzima extracelular, se creció la cepa *L. casei* IPLA1507 en un biorreactor [CFB (0,5% glucosa)] y se ensayó la actividad PEP en el sobrenadante de los cultivos crecidos a pH libre y a diferentes valores de pH controlado: 5, 6 y 7 (**Figura 49**).

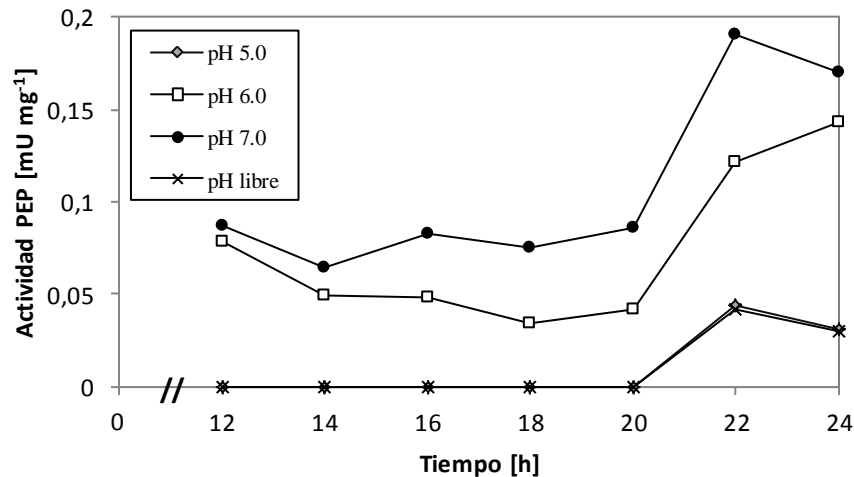


Figura 49. Producción de PEP *Sc* en la cepa *L. casei* IPLA1507 a diferentes pH. La cepa *L. casei* IPLA1507 se creció en un biorreactor tanto a pH libre, como diversos valores de pH controlado: pH 5, pH 6 y pH 7. La actividad PEP se determinó en el sobrenadante del cultivo celular.

La actividad a pH libre y a pH 5 fue similar, no habiéndose detectado actividad PEP hasta las 22 h de crecimiento, donde se alcanzaron 0,04 mU mg⁻¹. El cultivo crecido a pH libre alcanzó un valor mínimo de pH de 4,88 a las 10 h de crecimiento y así se mantuvo estable las 24 h de crecimiento. En los cultivos crecidos a pH 6 y a pH 7, la actividad PEP se detectó ya a las 12 h. A pH 6 la actividad PEP alcanzó un valor máximo de 0,14 mU mg⁻¹ a las 24 h, mientras que a pH 7 la actividad PEP alcanzó un máximo de actividad de 0,19 mU mg⁻¹ tras 22 horas de crecimiento.

5. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer

En la literatura se ha descrito que la actividad PEP *Sc* es incapaz de degradar el péptido 33-mer debido su gran longitud, siendo muy activa frente a péptidos más pequeños (Gass y cols., 2004). Sin embargo, con el fin de comprobar si la acción conjunta del hospedador (*L. casei* BL23) con la actividad PEP *Sc* harían posible la degradación de dicho péptido, se incubó la cepa *L. casei* IPLA1507 con el péptido 33-mer. Se prepararon las suspensiones celulares como se indica en materiales y

métodos (apartado 9.1) y la degradación del péptido 33-mer se monitorizó mediante HPLC durante 12 h de incubación (**Figura 50**).

La hidrólisis del péptido comenzó tras 8 h de incubación. Tras 12h de incubación la cepa *L. casei* IPLA1507 degradó un 75% del péptido.

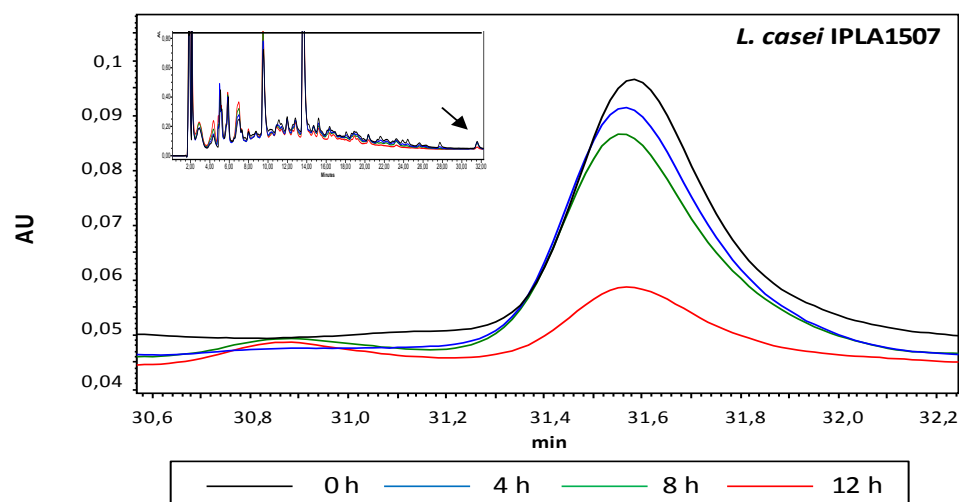


Figura 50. Hidrólisis del péptido 33-mer. Se incubó la cepa *L. casei* IPLA1507 (c) con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12 horas. Cada cuatro horas se recogieron alícuotas y la concentración del sustrato se monitorizó mediante análisis HPLC. El cromatograma muestra la degradación del péptido 33-mer a lo largo del tiempo. El cromatograma completo se observa en un cuadro con el sustrato señalado con una flecha.

6. RESISTENCIA AL ESTRÉS GASTROINTESTINAL

Con el objetivo de comprobar si la cepa *L. casei* IPLA1507 sería capaz de continuar secretando el enzima PEP *Sc* activa tras pasar por el TGI, se analizó la supervivencia celular y la actividad PEP en el modelo in vitro previamente descrito. Basándonos en los datos del capítulo VI, la cepa *L. casei* IPLA1507 fue resuspendida en leche. La **Figura 51** muestra la supervivencia celular de la cepa en respuesta al estrés G y GI a diferentes valores de pH. Ni la lisozima, ni la pepsina afectaron la viabilidad celular en el rango de pH de 3-5. A pH 2,1, el recuento bacteriano disminuyó 3,3 órdenes de magnitud, mientras que a pH 1,8 el recuento de colonias bajó 4,2 órdenes de magnitud. Durante la simulación del estrés gastrointestinal, el jugo intestinal causó una ligera reducción en la viabilidad celular tras 120 min de

incubación en la muestra proveniente del pH 3, lo que podría estar relacionado con el grado de severidad de la incubación gástrica previa. Las muestras provenientes de GI₂₀ y de GI₁₂₀ se inocularon en medio CFB y se ensayó la actividad PEP tras 6 horas de incubación, verificando que la cepa mantenía la capacidad de secretar PEP *Sc* activa.

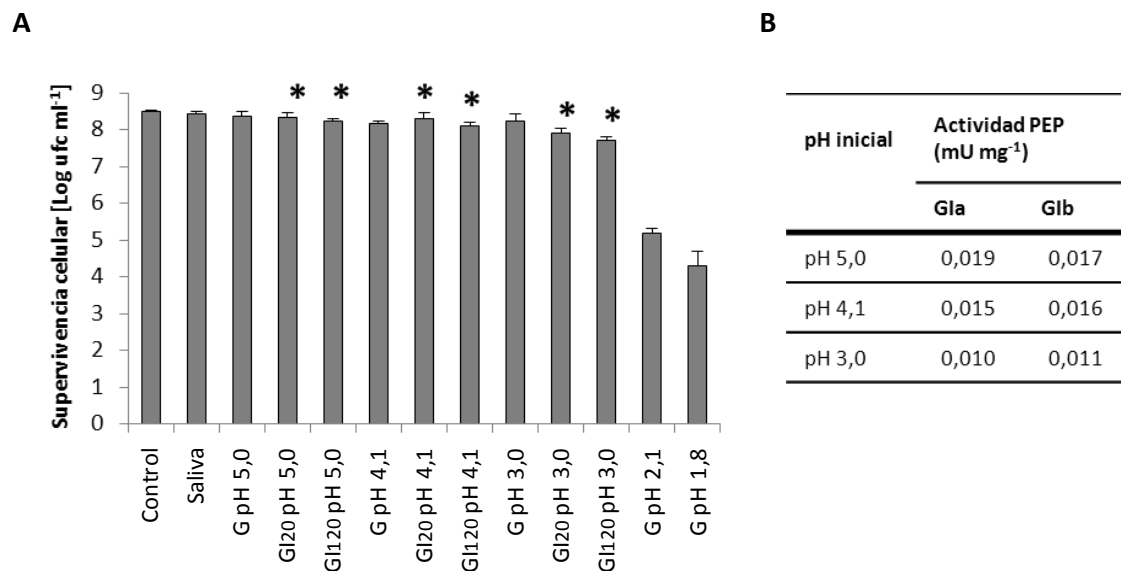


Figura 51. Supervivencia celular (A) y producción de PEP (B) de *L. casei* IPLA1507 en condiciones gastrointestinales. La cepa *L. casei* IPLA1507 se resuspendió en leche y se sometió a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* para determinar la supervivencia celular. Para simular el estrés gástrico (G), las muestras fueron incubadas con lisozima y pepsina a valores de pH decrecientes. Para simular el estrés gastrointestinal (GI), las muestras provenientes de los pH 5, pH 4,1 y pH 3 fueron incubadas posteriormente con sales biliares y enzimas pancreáticos durante 20 (GI₂₀) y 120 (GI₁₂₀) minutos. Las muestras provenientes de GI₂₀ y de GI₁₂₀ (*) fueron usadas como inóculo en un medio fresco. Tras 6 horas de crecimiento, se ensayó la actividad PEP en el sobrenadante de los cultivos celulares.

CAPÍTULO IX - GENERACIÓN DE UN *L. casei* RECOMBINANTE DE GRADO ALIMENTARIO QUE PRODUCE EL ENZIMA PEP *Sc* INTRACELULARMENTE

1. GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO INTEGRATIVO QUE EXPRESA EL GEN *pepSc* INTRACELULARMENTE.

Para generar el plásmido integrativo, se utilizó el plásmido de expresión intracelular pIPLA1258 (**Tabla 7, Figura 43**) descrito en el capítulo VII, y el plásmido pIPLA1501 (**Tabla 7**) descrito en el capítulo VIII. A partir del plásmido pIPLA1501 se clonó el gen *pepSc* como un fragmento *XbaI-NcoI* de 2,2 kb en el plásmido integrativo pIPLA1258, que había sido digerido con los mismos enzimas de restricción. Se transformó *E. coli* con la mezcla de ligación y se seleccionaron los transformantes en LB con ampicilina. Se comprobó la correcta clonación del gen *pepSc* mediante análisis de restricción. El plásmido obtenido se denominó pIPLA1504 (**Figura 52**).

2. INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO pIPLA1504 EN EL CROMOSOMA DE *L. casei* BL23 Y DEPURACIÓN DEL ADN DE GRADO NO ALIMENTARIO

Se electroporó la cepa *L. casei* BL23 (**Tabla 6**) con el plásmidos pIPLA1504. Se seleccionaron los transformantes obtenidos en MRS con eritromicina, se comprobó la correcta integración del vector mediante PCR y la cepa resultante se transformó con el plásmido replicativo pEM94 (**Tabla 7**), para eliminar el ADN de

Se recogieron los cultivos celulares en tres tiempos diferentes (5, 13 y 24 h) y se ensayó la actividad PEP en los ELC. A pesar de haber obtenido el mejor crecimiento en presencia de glucosa, los valores más altos de actividad se registraron tras 24 h de crecimiento en presencia de lactosa (5,2 mU mg⁻¹). En presencia de maltosa la actividad PEP alcanzó 1,7 mU mg⁻¹. Cuando se utilizó la glucosa como fuente carbono, la actividad PEP disminuyó a lo largo de la curva de crecimiento, desde 3,2 hasta 1,6 mU mg⁻¹ (**Figura 53**).

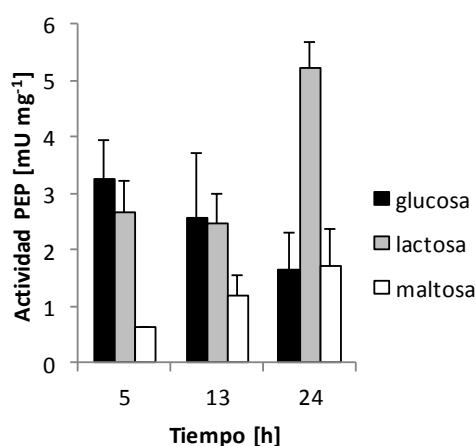


Figura 53. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de PEP *Mx* en la cepa *L. casei* IPLA1504. Se muestra la actividad PEP registrada en tres puntos diferentes de la curva de crecimiento (5, 13 y 24 h) y en tres fuentes de carbono diferentes (glucosa, lactosa y maltosa). Los ensayos enzimáticos fueron realizados por triplicado. Se muestra el valor medio y la desviación estándar.

4. PROTEÓLISIS DEL PÉPTIDO 33-mer

Con el objetivo de comprobar si la cepa *L. casei* IPLA1504 es capaz de hidrolizar el péptido inmunogénico, se incubó con el péptido 33-mer (25,5μM) durante 12 h a 37°C. La degradación del péptido se monitorizó mediante HPLC (**Figura 54**).

La cepa *L. casei* IPLA1503 fue capaz de degradar completamente el péptido inmunogénico tras 12 horas de incubación y no se observaron productos de degradación en el cromatograma (**Figura 54**).

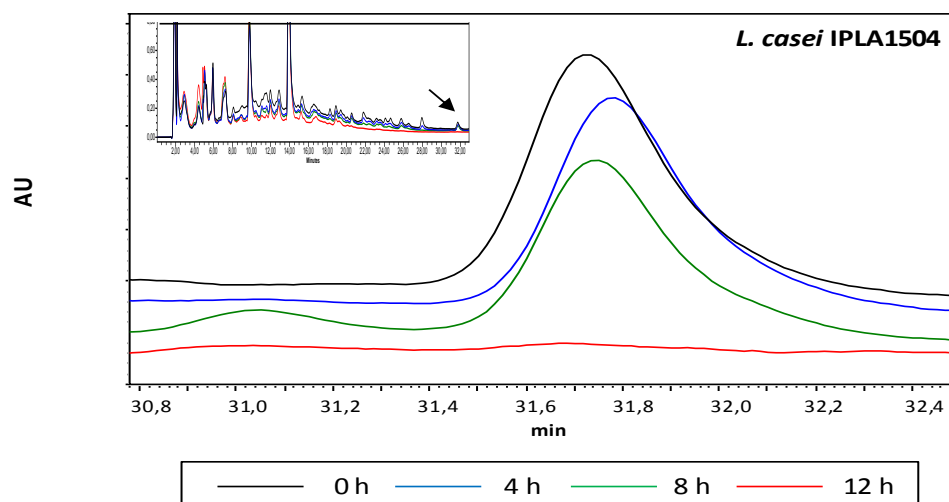


Figura 54. Hidrólisis del péptido inmunotóxico 33-mer. La cepa *L. casei* IPLA1503 se incubó con el péptido 33-mer (25,5 μ M) durante 12h. Cada 4h se recogieron alícuotas y la concentración del sustrato se monitorizó mediante análisis HPLC. El cromatograma muestra la degradación del péptido 33-mer a lo largo del tiempo. El cromatograma completo se observa en un cuadro con el sustrato señalado con una flecha.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la actualidad, el trigo es uno de tres cultivos de cereales más importantes a nivel mundial, con una cosecha anual de 600 millones de toneladas (Shewry, 2009). El gluten es un conjunto de proteínas presentes en el grano de trigo y se utiliza como materia prima o aditivo alimentario en un 80% de los alimentos que consumimos. Su secuencia aminoacídica rica en residuos de prolina y glutamina, le proporciona una buena capacidad de absorción de agua, retención de gas, cohesividad, viscosidad y elasticidad, características que favorecen la elaboración de pan y lo convierten en un ingrediente único en la elaboración de multitud de productos (Wieser, 2007). Sin embargo, no todo en el trigo son ventajas. Aproximadamente un 1 % de la población mundial desarrolla una intolerancia alimentaria al gluten, la EC (Green y Cellier, 2007). Hoy en día representa una de las enfermedades genéticas más comunes (Green y Cellier, 2007). Sin embargo, el único tratamiento que existe actualmente para la EC es seguir una estricta DSG durante toda la vida de paciente, por lo que es necesario y urgente el desarrollo de nuevas terapias alternativas o complementarias a la DSG que mejoren la calidad de vida de los pacientes celíacos. En los últimos años se han propuesto numerosos tratamientos que se encuentran en diferentes fases de investigación, como por ejemplo la terapia enzimática oral, que se basa en la administración de enzimas específicos de prolina y glutamina, para acelerar la degradación del gluten durante el proceso digestivo en el TGI (Bethune y Khosla, 2012). Los enzimas se pueden obtener de origen animal, vegetal o microbiano, sin embargo, la producción de

enzimas a partir de microorganismos presenta ciertas ventajas: Es más barato, se obtiene una producción a gran escala con un rendimiento predecible y una disponibilidad continua. Además, la enorme versatilidad de microorganismos disponibles proporciona un elevado número de enzimas diferentes (García y cols., 2002). Por lo tanto, se propusieron la PEP *Mx* y la PEP *Sc* como candidatas para la hidrólisis de los péptidos del gluten (Shan y cols., 2004). Sin embargo estos microorganismos no pueden ser incluidos en alimentos, por lo que el enzima debe de ser purificada para su posterior administración. Dado que las BAL se consideran en general microorganismos GRAS, algunas especies están consideradas como QPS por la EFSA, forman parte de nuestra alimentación, así como de nuestra microbiota intestinal, junto al hecho de que poseen un sistema proteolítico muy extenso y variado, en la presente Tesis Doctoral hemos propuesto a las BAL como candidatas ideales para completar la hidrólisis de los péptidos del gluten en el TGI y más concretamente para degradar el péptido más inmunogénico del gluten (33-mer). Con el fin de alcanzar dicho objetivo se han seguido dos estrategias: 1) La búsqueda en nichos ecológicos variados de BAL silvestres con capacidad de degradar el péptido 33-mer y 2) la generación de BAL recombinantes mediante biología sintética que sinteticen enzimas específicas para la hidrólisis de los péptidos del gluten.

1. BÚSQUEDA DE BAL SILVESTRES

1.1. Desarrollo de un medio de cultivo adecuado para seleccionar bacterias con actividad gliadinasas

Los medios de cultivo pueden ser selectivos y/o diferenciales. Los medios selectivos poseen alguna característica que tan solo permite el crecimiento de determinados microorganismos, como por ejemplo la adición de antibióticos al medio para seleccionar cepas resistentes (Starliper, 2008). Los medios diferenciales suelen tener un compuesto o ingrediente que identifica una característica particular de un grupo microbiano y los diferencia del resto. Se pueden utilizar para identificar enzimas que degraden una variedad de sustratos, incluyendo proteínas (p. ej. gelatina, caseína, tirosina o elastina) o carbohidratos complejos como el almidón. A menudo se observan zonas aclaradas alrededor de las colonias indicando una reacción positiva (Starliper, 2008). Por ejemplo, el medio de agar sangre permite

detectar microorganismos con actividad hemolítica, debido a la lisis de las células sanguíneas presentes en el medio (Yeoh y cols., 2009). En algunos casos el medio puede ser selectivo y diferencial, como por ejemplo el medio para *Flavobacterium columnare* (Bullock y cols., 1986) que incorpora sulfato de neomicina como antibacteriano selectivo y gelatina como carácter diferencial, puesto que las cepas gelatinasa positivas forman un halo claro alrededor de la colonia (Starliper, 2008).

En la literatura se encuentran descritos diferentes medios de cultivo que contienen gluten o gliadina entre sus componentes principales (Bernardo y cols., 2009; Gerez y cols., 2006; Lale y Gadre, 2010; Morris y cols., 1997; Zamakhchari y cols., 2011). Sin embargo presentan ciertos inconvenientes, o son muy complicados de preparar, o no se encuentran bien descritos o se obtiene un medio no homogéneo debido a la insolubilidad de la gliadina en agua, lo que dificulta su uso como ingrediente en la elaboración de un medio de cultivo. Se ha descrito que un tratamiento ácido suave de la gliadina incrementa su solubilidad, debido a la desaminación de los residuos de glutamina, con la consecuente liberación de amonio (Vickery, 1923) y la interrupción de puentes de hidrogeno. El tratamiento ácido también suscita la hidrólisis de los enlaces peptídicos, generando péptidos de bajo peso molecular, incrementando la solubilidad de las proteínas y su capacidad de emulsión (Vickery, 1922; Holme y Briggs, 1959; Wu y cols., 1976; Mimouni y cols., 1994). Si el tratamiento ácido es prolongado y se realiza a temperatura de hervido, se produce la hidrólisis total de las proteínas con la consecuente liberación de aminoácidos libres (Vickery, 1922).

El objetivo en este trabajo era solubilizar la gliadina sin alcanzar un grado de hidrólisis elevado, para poder utilizarla como sustrato para proteasas y peptidasas bacterianas. Una degradación elevada con la consecuente liberación de aminoácidos, restaría selectividad al medio de cultivo, puesto que el crecimiento bacteriano se basaría en la utilización de los aminoácidos libres. El tratamiento aplicado obtuvo un aumento del 18% de proteína solubilizada, que se corresponde con pequeños péptidos de menos de 5 kDa. Resultados similares habían sido obtenidos con harina de trigo, donde la hidrólisis genera oligopéptidos hidrofílicos y solvatados que aumentan la solubilidad de la muestra (Kong y cols., 2007). También se comprobó el

aumento de amonio que se relaciona con la desaminación de glutamina, corroborando los resultados expuestos por Vickery en 1922. Por lo tanto, el incremento de la solubilidad de la gliadina habría sido debido tanto a la hidrólisis de enlaces peptídicos como al proceso de desaminación.

Al incorporar el hidrolizado obtenido (AHG) a una solución acuosa que contenía sales minerales, vitaminas y fuente de carbono, se obtuvo un medio de cultivo homogéneo, sin grumos ni partículas, con la fracción proteica solubilizada. Para evaluar el comportamiento de AHG como sustrato se utilizó pronasa, una proteasa general con actividad gliadínasa conocida (Bietz y Rothfus, 1971). Tanto la correlación lineal obtenida entre la concentración de pronasa y el diámetro del halo en AHG-M, como la obtenida en el análisis intercomparativo entre la degradación de AHG frente a una degradación equivalente de azocaseína con pronasa, demuestran que la formación del halo es debida a la hidrólisis de la gliadina y dependiente del nivel de actividad enzimática aplicada, reafirmando el uso de AHG como sustrato de enzimas con actividades gliadinasas.

En la composición del medio AHG-M se incluyeron vitaminas y sales minerales con el fin de permitir el crecimiento de bacterias exigentes nutricionalmente, siendo la única restricción, poseer la capacidad de degradar la gliadina. Los resultados con diferentes géneros y especies avalaron el uso de AHG-M como medio de cultivo. Al utilizar AHG-M como método de aislamiento de bacterias capaces de degradar la gliadina, a partir de una muestra de ensilado de trigo, se puso de manifiesto el carácter selectivo y diferencial del mismo. El carácter selectivo quedó demostrado al observar una disminución de varios órdenes de magnitud en el recuento bacteriano en AHG-M en comparación con el obtenido en el medio PCA. El hecho de tener que utilizar obligatoriamente la gliadina como fuente de nitrógeno inhibió el crecimiento de muchas bacterias. El carácter diferencial se puso de manifiesto al observar que solo algunas de las colonias presentaron un halo claro alrededor de la colonia. Los halos fueron visibles sin necesidad de teñir con los tradicionales colorantes de proteínas como el Azul de Comassie y el Negro amido, manteniendo la viabilidad celular y permitiendo el aislamiento de colonias directamente de las placas de agar. Los pases de

enriquecimiento en caldo AHG-M no solo provocaron una disminución en el recuento microbiano, sino que además hubo un incremento del porcentaje de colonias formadoras de halo de degradación, demostrado su utilidad como método de enriquecimiento de bacterias con esta capacidad.

La selección e identificación de aislados capaces de crecer y formar halo en AHG-M a partir de la muestra de ensilado de trigo, dio como resultado la obtención de cinco cepas pertenecientes al género *Bacillus*: Tres *B. amiloliquefaciens*, un *B. subtilis* y un *B. mojavensis*. Ya se había identificado una cepa de *B. subtilis* aislada de harina de trigo con capacidad para degradar la gliadina (Phromraksa y cols., 2008). Los *Bacillus* son considerados como una de las bacterias más proteolíticas de la naturaleza, poseen proteasas tan activas como la subtilisina, capaz de degradar sustratos proteicos muy diferentes como por ejemplo la caseína y la lisozima (Nishio y Hayashi, 1984). Este hecho quedó de manifiesto al observar los diferentes perfiles de hidrólisis obtenidos en el zimograma.

1.2. Selección de muestras para la obtención de BAL capaces de hidrolizar la gliadina

1.2.1. Masas fermentadas

Los productos de panadería se elaboran a partir de una masa fermentada compuesta principalmente de harina, agua y sal. La fermentación puede realizarse de manera tradicional con fermentos espontáneos y naturales, o de manera moderna utilizando levaduras de panadería comerciales. La fermentación tradicional, conocida como masa madre ácida o *sourdough*, incluye múltiples fermentaciones espontáneas donde coexisten asociaciones estables de BAL y levaduras. Se han descrito más de 50 especies de BAL, la mayoría pertenecientes al género *Lactobacillus* y más de 20 especies de levaduras, principalmente pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Candida* (De Vuyst y Neysens, 2005). Debido a la enorme adaptación de las BAL a los hábitats en los que se encuentran (Broadbent et al 2012; Makarova y cols., 2007; Toh y cols., 2013), se decidió buscar BAL capaces de degradar la gliadina en masas fermentadas, donde el gluten es la proteína mayoritaria.

A partir del análisis microbiológico de las masas fermentadas se obtuvieron recuentos bacterianos elevados en todas las muestras analizadas, similares a los obtenidos anteriormente en otros trabajos (Vera y cols., 2009). A lo largo de los pases de enriquecimiento en caldo AHG-M, se observa una disminución progresiva del número de bacterias, lo que indica que se estaba llevando a cabo una selección de aquellas bacterias capaces de crecer en AHG-M, y por lo tanto, potencialmente capaces de degradar la gliadina. La masa fermentada industrial procedente de España dio resultados diferentes al resto de muestras analizadas, se obtuvieron los recuentos bacterianos más bajos y no se observó el proceso selectivo en el medio AHG-M, puesto que el recuento fue similar en todos los medios y condiciones ensayadas. El hecho de ser una masa industrial fermentada con levaduras comerciales disminuye la biodiversidad microbiana de la muestra, que quedó patente en el bajo recuento obtenido en todos los pases.

En las placas de AHG-M se observaron dos fenotipos, unas colonias formaban halo y otras no. Se seleccionaron 48 aislados que poseían ambas características y se identificaron molecularmente, revelando que el 89,6% (43) eran BAL. Mediante la técnica de PFGE se determinó que eran 20 cepas diferentes de BAL, pertenecientes a las especies *L. casei* (15), *Ln mesenteroides* (4) y *L. plantarum* (1). Si bien *L. plantarum* es una especie habitual en las masas fermentadas, *Ln mesenteroides* y *L. casei* no lo son tanto (De Vuyst y Neysens, 2005; De Vuyst y cols., 2009; Minervini y cols., 2014). La presencia de especies pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Weisella* se asocia a fermentaciones tempranas, lo que podría explicar la poca biodiversidad obtenida (Corsetti y cols., 2007). En la harina de trigo hay cuatro carbohidratos principales: maltosa, sacarosa, fructosa y glucosa. Las poblaciones microbianas presentes en las masas fermentadas forman asociaciones no competidoras, donde especies como *Lactobacillus sanfranciscensis* utilizan preferentemente la maltosa y otras como *L. plantarum* fermentan glucosa y fructosa prioritariamente (De Vuyst y cols., 2009). Es interesante destacar, que a pesar de haber añadido maltosa al medio AHG-M tal y como recomiendan Vera y cols. (2009), no se obtuvo ningún aislado perteneciente a la especie *L. sanfranciscensis*, una de las especies que se detectan con mayor frecuencia en este tipo de muestras (De

Vuyst y Neysens, 2005; De Vuyst y cols., 2009; Minervini y cols.). Este resultado podría ser dependiente del origen, el procesado y las panaderías donde se elaboraron las masas, puesto que se ha demostrado que existe una estricta correlación geográfica entre las especies de BAL obtenidas en las masas fermentadas (De Vuyst y cols., 2009) tal y como se detectó en el análisis PFGE realizado.

1.2.2. Contenido ruminal bovino

Los rumiantes, son animales exclusivamente herbívoros que consumen grandes cantidades de material vegetal. Han desarrollado un aparato digestivo anterior, que se encuentra dividido en cuatro compartimentos. En el primero de ellos, el rumen, se lleva a cabo una fermentación anterior al intestino, donde se produce la hidrólisis de los materiales de la pared celular vegetal y la degradación de proteínas, mediante un proceso microbiano muy complejo y eficiente. Los rumiantes poseen una microbiota simbiote muy compleja que se caracteriza por tener una elevada densidad poblacional y una amplia diversidad, donde coexisten bacterias, protozoos, hongos y arqueas (van Soest, 1994). La microbiota ruminal ejerce una intensa actividad proteolítica y desaminadora de aminoácidos. Se estima que comprende varios cientos de especies bacterianas y al menos 30 son predominantes, alcanzando valores de 10^{11} células bacterianas por ml (Miron y cols., 2011). De hecho, algunos trabajos proponen disminuir esta intensa proteólisis microbiana, para que el propio rumiante pueda utilizar parte del nitrógeno proveniente de la dieta (Wallace y Cotta, 1988, Broderick y cols., 1991).

Por lo tanto, el contenido ruminal es una fuente de microorganismos con capacidades metabólicas únicas, adaptados a la degradación continua de sustratos complejos. Es por ello que se decidió buscar cepas de BAL con actividades gliadinasas en un ambiente tan peculiar como el contenido ruminal bovino. Cabe destacar que es la primera vez que se describe el aislamiento de cepas de BAL ruminales con capacidad para degradar gliadina.

En el medio genérico PCA se obtuvieron recuentos totales de 10^7 - 10^8 ufc ml⁻¹, un poco por debajo de trabajos previos que describen recuentos de 10^8 - 10^{10} ufc ml⁻¹ (Perry y Briggs, 1958; Wilson y Briggs, 1954). En MRSm y AHG-M estos recuentos disminuyeron un orden de magnitud, demostrando que no todas las

bacterias presentes en la muestra pueden crecer en estos medios. En el primer pase de enriquecimiento en caldo AHG-M se observó una disminución de los recuentos microbianos, señalando el proceso selectivo del medio. Sin embargo, en el segundo pase, los recuentos aumentaron un orden de magnitud, lo que podría ser debido a la adaptación de los microorganismos al medio AHG-M.

Al igual que con las muestras de masas fermentadas, se seleccionaron 17 aislados. Al identificarlos molecularmente se obtuvo que un elevado porcentaje, el 76,5 % de estos aislados (13), pertenecían a la especie *L. casei*. La técnica de PFGE demostró que se trataba de 9 cepas diferentes. Ya se conocía la presencia de BAL en el contenido ruminal bovino y en concreto de cepas pertenecientes a la especie *L. casei* (Perry y Briggs, 1958; Jensen y cols., 1956). Este grupo bacteriano es altamente dependiente de la dieta consumida por el rumiante, aumentando considerablemente con buenos pastos y dietas ricas en almidón (Sadet-Bourgeteau y cols., 2010; Jensen y cols., 1956).

1.3. Caracterización de las cepas silvestres

1.3.1. Seguridad de las cepas: Comprobando su resistencia a antibióticos

Un criterio muy importante a la hora de evaluar la bioseguridad de los cultivos bacterianos destinados para consumo como aditivos alimentarios, es comprobar la ausencia de resistencias antimicrobianas adquiridas (Visozo y cols., 2006). Generalmente se consumen en elevadas proporciones, por lo que el estrecho contacto con otras bacterias presentes en el intestino humano o animal es una condición excelente para la transferencia horizontal de genes con la ayuda de transposones conjugativos y plásmidos (Teuber y cols., 1999). Para poder ser incluidas en alimentos deben ser sensibles a un amplio espectro de antibióticos. Por lo tanto, se comprobó la resistencia de las 29 cepas de BAL aisladas en este trabajo a nueve antibióticos diferentes.

Una cepa de *L. plantarum* y cuatro *L. casei* fueron estrictamente sensibles a todos los antibióticos ensayados, según los cortes propuestos por el panel de la EFSA (2012). Sin embargo, los 24 *L. casei* restantes están en el límite del corte propuesto para cloranfenicol. Hay que tener en cuenta que debido a los graves

efectos secundarios del cloranfenicol (daño en la médula ósea y anemia aplásica), su uso en humanos está prácticamente restringido a infecciones muy graves como la fiebre tifoidea (Shukla y cols., 2011). Además, el hecho de que la distribución de estas 24 cepas en cloranfenicol forme una típica campana de Gauss, junto a que esos valores de CIM ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$) son aceptados para especies de *Lactobacillus* muy cercanas como p.ej. *L. plantarum*, podría indicar que no se trata de una resistencia adquirida, sino de una resistencia intrínseca de este grupo poblacional (EFSA 2012).

1.3.2. Sistema proteolítico: gliadinasas, peptidasas y degradación del 33-mer

La secuencia aminoacídica de las gliadinas está compuesta por un elevado porcentaje de residuos de prolina dispuestos en secuencias repetidas, que le confieren una inusual resistencia a la hidrólisis por los enzimas gastrointestinales (Wieser, 2007), por lo que se acumulan en el lumen intestinal y desencadenan las respuestas inmunitarias de la EC en individuos predispuestos (Sollid, 2002; Di sabatino y Coraza, 2009; Shan y cols., 2002). El medio de cultivo AHG-M no solo nos permitió aislar y seleccionar aquellos microorganismos capaces de degradar la gliadina, sino que nos proporcionó información sobre la actividad gliadinasa. El hecho de que ninguno de los sobrenadantes de los cultivos celulares formaran halo de degradación nos indica que la actividad o actividades involucradas no son extracelulares, sino que se encontrarían en el interior celular o bien en el exterior, pero ancladas a la superficie celular. Además, no se ha observado una asociación entre el fenotipo de crecimiento en AHG-M y el fenotipo de formación del halo, por lo que podrían estar implicadas actividades diferentes en cada fenotipo.

Trabajos previos realizados por otros autores, demostraron que una degradación eficaz de los péptidos del gluten requiere la participación de diferentes actividades (De Angelis y cols., 2006; De Angelis y cols., 2009; Di Cagno y cols., 2002). En la mezcla probiótica VSL#3, formada por 8 cepas de BAL, se identificaron los enzimas prolina iminopeptidasa (PepI), aminopeptidasa N (PepN) y A, dipeptidasa, prolinasa, prolidasa (PepQ), dipeptidil peptidasa IV (PepX), tripeptidasa y endopeptidasa (PepO) (De Angelis y cols., 2006). VSL#3 es capaz de hidrolizar las gliadinas y los péptidos del gluten tras 24 h de fermentación. Esta

capacidad de hidrólisis se pierde cuando las cepas se ensayan por separado, sugiriendo que ninguna de las cepas contiene el conjunto de peptidasas necesarias para la hidrólisis (De Angelis y cols., 2006). En otro trabajo diferente, a partir de una mezcla de lactobacilos capaces de hidrolizar el gluten, se purificaron 9 peptidasas y se propuso que para degradar completamente el péptido 33-mer son necesarias al menos tres: PepN, PepX y PepO (De Angelis y cols., 2009).

Por lo tanto, se cuantificaron diferentes actividades peptidasa específicas de prolina (PepX, PepI, PepQ, PepO, PEP) y la aminopeptidasa N en las 29 cepas seleccionadas en este trabajo. Los resultados muestran que prácticamente todas las cepas analizadas presentan niveles variables de actividad PepX, PepI, PepQ y PepN. En ninguna de las cepas analizadas se detectó PepO ni PEP. Si bien las BAL poseen varias actividades específicas de prolina, todas ellas liberan aminoácidos o dipéptidos en los extremos de los oligopéptidos. Sin embargo, hasta el momento en BAL no hay evidencias de una actividad que hidrolice enlaces peptídicos de residuos internos de prolina situados en péptidos largos, como la actividad PEP (Savijoki y cols., 2006). Esta actividad se encuentra sobretodo en bacterias Gram negativas como *M. xanthus* y *S. capsulata* (Gass y Khosla, 2007; Kabashima y cols., 1998), y ha sido propuesta como posible terapia enzimática oral para la EC (Gass y cols., 2005).

Cinco de las 29 cepas fueron capaces de hidrolizar completamente el péptido inmunogénico 33-mer tras 24 h de incubación. Aunque De Angelis y cols. (2006, 2009) habían descrito que PepO era una actividad indispensable en la hidrólisis del péptido, en las cepas seleccionadas en este trabajo no se detectó la actividad PepO, lo que sugiere la presencia de otras actividades implicadas en la hidrólisis de los péptidos del gluten.

Un 33,3% de las cepas provenientes del contenido ruminal y un 10% de las provenientes de las masas fermentadas, fueron capaces de degradar completamente el péptido 33-mer en las condiciones ensayadas, demostrando que en el contenido ruminal bovino se aisló un mayor porcentaje de BAL capaces de degradar el péptido.

Finalmente se seleccionaron dos cepas, *L. casei* IPLA12038 (masas fermentadas) y *L. casei* IPLA12046 (contenido ruminal), debido a la elevada

degradación del péptido 33-mer. Aunque ambas cepas presentaron actividad PepX, PepI, PepQ y PepN, no poseían los niveles de actividad más elevados, sugiriendo la posibilidad de tener otras actividades peptidasa diferentes implicadas en la degradación del péptido. Tras 8 h de incubación, *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* IPLA12046 habían degradado más del 80% y del 60% del péptido, respectivamente. Puesto que para el ensayo se habían utilizado 195 ppm de péptido 33-mer, tras 8 h de incubación habían degradado unas 156 ppm y 117 ppm del péptido. Teniendo en cuenta que este péptido constituye aproximadamente el 1,25 % del gluten (Comino y cols., 2012), esta cantidad equivaldría aproximadamente a 12.480 ppm y 9.360 ppm de gluten. Además, no se observaron nuevos productos de hidrólisis en los cromatogramas. Considerando que el consumo de gluten diario en un estudio de una población Holandesa fue de 13,1 g (van Overbeek y cols., 1997) y que ambas cepas fueron sensibles a los antibióticos ensayados, excepto *L. casei* IPLA12038 que sobrepasó ligeramente el corte establecido para cloranfenicol, estas cepas podrían hidrolizar las trazas diarias de gluten presentes en los alimentos.

1.3.3. Capacidad de las cepas L. casei IPLA12038 y L. casei IPLA12046 de sobrevivir bajo las condiciones simuladas del TGI

Los péptidos inmunotóxicos se acumulan en el lumen intestinal, por lo que este debería de ser el lugar de acción de las enzimas degradadoras. Por lo tanto, se estudió la capacidad de las cepas seleccionadas de sobrevivir al paso por el TGI y alcanzar las condiciones intestinales como células metabólicamente activas. Se comprobó el efecto de la lisozima, la pepsina, la bajada de pH, las sales biliares y los enzimas pancreáticos en un sistema continuo de simulación del TGI en las dos cepas seleccionadas, *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* IPLA12046 (Fernández de Palencia y cols., 2008). Las cepas se resuspendieron en leche como matriz alimentaria, puesto que es el método habitual de consumo de BAL. Además, se ha descrito que la leche ejerce un efecto beneficioso sobre la protección del cultivo celular (Conway y cols., 1987; Charteris y cols., 1998; Wang y cols., 2012), tal y como se demostró en este trabajo con la cepa *L. casei* IPLA1506. Ambas cepas demostraron una buena resistencia al estrés gastrointestinal. Resistieron el estrés gástrico durante los pH 5, 4,1 y 3, y disminuyeron 4 órdenes de magnitud solo en las

condiciones más extremas, pH 2,1 y pH 1,8, manteniéndose en 10^4 - 10^5 ufc ml⁻¹. La adición de sales biliares y enzimas pancreáticos apenas afectaron a la viabilidad celular. Esta buena resistencia podría estar relacionada con el origen de ambas cepas.

La cepa *L. casei* IPLA12038 proviene de una masa fermentada. Durante la fermentación de la masa se alcanzan valores de pH por debajo de 3,5, donde predominan bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* (De Vuyst y Neysens, 2005; Minervini y cols., 2014), lo que podría explicar la elevada resistencia de esta cepa al pH gástrico. Por el contrario, la cepa *L. casei* IPLA12046 proviene de una muestra de contenido ruminal bovino. Las condiciones ruminales favorecen el crecimiento de microorganismos, el pH oscila entre 5,5-7 con ligeras variaciones en función del tipo de alimentación, dietas ricas en almidón provocan una acidosis ruminal que disminuye el valor de pH por debajo de 5,5. Si bien este es un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano, el fuerte movimiento peristáltico del rumen desplaza a los microorganismos entre los distintos compartimentos del sistema digestivo, por lo que podrían estar parcialmente adaptados a un ligero estrés gastrointestinal (Owens y cols., 1998). Además, la especie *L. casei* se encuentra habitualmente en el sistema digestivo humano (Axelsson, 2004) y se ha demostrado en numerosas ocasiones su capacidad de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales (Curto y cols., 2011; Bao y cols., 2013; Sidira y cols., 2010; Tuohy y cols., 2007; Oozeer y sol., 2006; Yuki y cols., 1999).

1.3.4. Análisis del genoma de *L. casei* IPLA12038

El hecho de que la mayoría de los lactobacilos aislados en este trabajo posean un perfil de peptidasas muy similar, pero solo cinco fueron capaces de degradar eficientemente el péptido 33-mer, abre la posibilidad de que estas cepas posean otras peptidasas que no se hayan identificado en este trabajo. Por lo tanto, consideramos interesante la secuenciación completa del genoma de la cepa *L. casei* IPLA12038 y su comparación con otros genomas disponibles, con el objetivo de identificar aquellas actividades que pudieran estar implicadas en la hidrólisis de la gliadina.

En la presente Tesis Doctoral se ha secuenciado por primera vez el genoma de un *L. casei* proveniente de una masa ácida fermentada. El elevado número de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y aminoácidos es

una característica típica de la especie *L. casei*, utilizada para adaptarse con facilidad a nuevos ambientes y estilos de vida (Broadbent y cols., 2012; Toh y cols., 2013; Douillard y cols., 2013; Vogel y cols., 2011). Así como la presencia de 38 transposasas y secuencias móviles, que representa el 1,2% del genoma, facilitaría la adaptación a nuevos nichos proporcionando plasticidad al genoma (Vogel y cols., 2011). Se observa la presencia de genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos, frecuentes en cepas provenientes de masas fermentadas, puesto que mejoran la textura de la masa, alargan la vida útil del producto y su valor nutritivo (Tieking y cols., 2005). Sin embargo, difiere mucho de la BAL más frecuente en masas fermentadas, *L. sanfranciscensis*, que tiene un tamaño de genoma de 1,4 Mpb, en comparación con los 3,1 Mpb de *L. casei* IPLA12038 (Vogel y cols., 2011).

Se han hallado ocho genes pertenecientes al sistema inmunitario adaptativo CRISPR-Cas. Este sistema es utilizado por las bacterias para protegerse de bacteriófagos invasivos o ADN plasmídico. *L. casei* IPLA12038 posee 8 genes del sistema CRISPR-Cas, cuatro de ellos no se encontraron en el genoma de *L. casei* BL23. Es una característica demandada en el campo de la industria alimentaria, que lucha continuamente contra la infección por bacteriófagos (Horvath y Barrangou, 2010; Dupuis y cols., 2013).

En la **Tabla 19** se observa una amplia representación de la diversidad genética, ecológica y geográfica de la especie *L. casei*. *L. casei* IPLA12038 se encuentra entre los cinco genomas de *L. casei* de mayor tamaño, y es el segundo con mayor número de CDS, después de *L. casei* A2-362. Este resultado concuerda con que todos los *L. casei* aislados de plantas poseen el repertorio más diverso de genes accesorios específicos de cepa (Broadbent y cols., 2012). La comparación con los ocho genomas completos de *L. casei* realizada con el programa Mauve, señala que son genomas muy conservados. A pesar de ello, se observan numerosas regiones específicas y diferenciales para cada cepa.

Se ha descrito que en la especie *L. casei*, las mayores diferencias existentes entre cepas suelen encontrarse en los plásmidos, indicadores de la evolución de esta especie (Douillard y cols., 2013). *L. casei* IPLA12038 posee varios plásmidos, y

además presentó 366 CDS específicas que no se encuentran en el genoma de la cepa de referencia *L. casei* BL23, poniendo de manifiesto la gran diferencia existente entre ambas cepas. Lamentablemente, ninguna CDS exclusiva de *L. casei* IPLA12038 estaba anotada como peptidasa o proteasa. Sin embargo, 284 de estas CDS específicas estaban anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida, abriendo la posibilidad de identificar en un futuro las posibles actividades implicadas en la hidrólisis de la gliadina.

Tabla 19. Características principales de 18 genomas de *L. casei*. Adaptado de Broadbent y cols., (2012).

Cepa	Origen	Cobertura	Nº contigs	Nº de pb totales	%GC	Plásmido	CDS	tRNAs
ATCC 334	Queso suizo	8x	2	2.924.325	46,6	1	2.643	59
M36	Queso Cheddar	19x	78	3.152.126	46,3		3.001	57
UW1	Queso Cheddar	21x	143	2.865.538	46,4		2.826	54
UW4	Queso Cheddar	22x	122	2.758.298	46,4		2.689	57
Zhang	Koumiss	6x	2	2.898.335	46,4	1	2.723	59
BD-II	Koumiss	381x	2	3.127.288	46,3	1	3.069	59
LC2W	Producto lácteo	98x	2	3.077.434	46,3	1	3.019	58
Lc-10	Producto lácteo	24x	76	2.951.397	46,4		2.780	58
Lpc-37	Producto lácteo	133x	150	3.075.253	46,3		2.861	58
BL23	Desconocido	34x	1	3.079.196	46,3	0	2.977	60
12A	Ensilado de maíz	23x	28	2.885.619	46,4		2.702	57
21/1	Ensilado de maíz	26x	75	3.215.878	46,2		3.080	57
32G	Ensilado de maíz	17x	42	3.011.496	46,4		2.920	57
A2-362	Vino	24x	167	3.361.266	46,1		3.262	58
UCD174	Vino	25x	116	3.071.637	46,4		3.020	57
T71499	Sangre humana	30x	55	3.000.122	46,2		2.796	57
CRF28	Sangre humana	24x	57	3.036.548	46,3		2.911	54
IPLA12038	Masa fermentada	40x	120	3.151.760	46,2	varios	3.144	60

2. GENERACIÓN DE BAL RECOMBINANTES

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo en numerosas ocasiones, las PEP han sido seleccionadas como posibles agentes terapéuticos para tratar la EC (Gass y cols., 2005; Shan y cols., 2004). Actualmente se están estudiando con más

detalle la PEP *Sc* y la PEP *Mx* por proceder de microorganismos no patógenos, por lo que su uso como fármaco sería más conveniente (Kabashima y cols., 1998; Gass y cols., 2005), pero la desventaja de estos microorganismos es que no pueden ser incluidos en alimentos, por lo que el enzima tiene que ser producida y purificada para su posterior administración. Shan y cols. (2004) ya expresaron los genes en *E. coli* y purificaron PEP *Mx* y PEP *Sc*. Sin embargo, *E. coli* tampoco es una bacteria que se pueda incorporar en un alimento, por eso consideramos el uso de cepas de BAL como hospedadores para la expresión heteróloga de *pepMx* y *pepSc*. Las BAL son microorganismos seguros que forman parte de nuestra alimentación y son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria (De Vos, 2011). Se ha demostrado su prometedor uso como productoras de proteínas heterólogas, tanto para aplicaciones experimentales como comerciales (Nouaille y cols., 2003; Wells y Mercenier, 2008; Bermúdez-Humarán y cols., 2013; Daniel y cols., 2011; del Rio y cols., 2010). Además el uso de BAL proporciona importantes ventajas frente a *E. coli*: No producen endotoxinas, producen cantidades muy bajas de exoproteínas nativas y su genoma es más pequeño que el genoma de *E. coli* (Kunji y cols., 2003). Estas características proporcionan una mejora en la producción heteróloga *in vivo* y en su uso como vehículo de suministro de vacunas, ya que hay menos proteínas contaminantes cuando se utilizan BAL como hospedadores (Kunji y cols., 2003; Wells y Mercenier, 2008; Bermúdez-Humarán y cols., 2013). Hasta la fecha, *Lactococcus* y *Lactobacillus* han sido los dos géneros principales de BAL utilizados para la producción de moléculas recombinantes (Wells y Mercenier, 2008; Bermúdez-Humarán y cols., 2013; de Azevedo y cols., 2013). Por lo tanto, decidimos generar cepas recombinantes de *Lc. lactis* y *L. casei* que produzcan PEP *Mx* y PEP *Sc*, con el objetivo de complementar la acción de los enzimas gastrointestinales e hidrolizar los péptidos del gluten hasta aminoácidos libres en el duodeno.

2.1. Sistemas de clonación

2.1.1. Sistema NICE

Inicialmente seleccionamos *Lc. lactis* como bacteria hospedadora y el sistema NICE, por ser uno de los más eficientes en BAL, para la expresión de los genes heterólogos de interés (De Ruyter y cols., 1996; Kuipers, 1998). Se construyeron dos

cepas de *Lc. lactis* NZ9000 recombinantes que expresaban los genes *pepSc* (*Lc. lactis* IPLA1509) y *pepMx* (*Lc. lactis* IPLA1510). La actividad PEP fue 4,4 veces superior en la cepa *Lc. lactis* IPLA1510, por lo que fue seleccionada para estudios posteriores. Ya había sido descrito que PEP *Mx* posee una mayor especificidad y afinidad por el sustrato cromogénico Suc-Ala-Pro-pNa que PEP *Sc* (Shan y cols., 2004), lo que explicaría la elevada diferencia de actividad entre ambas cepas.

Una vez optimizadas las condiciones de inducción (2,5 ng ml⁻¹ de nisina durante 3 h de incubación), se analizó la capacidad de hidrolizar el péptido 33-mer. Cuando el cultivo celular de *Lc. lactis* IPLA1510 fue inducido con nisina, la cepa hidrolizó un 80% del péptido inmunogénico tras 24 h de incubación. Sin embargo, el mismo cultivo celular sin inducir, utilizado como control negativo del experimento, degradó un 4% en 24 h. El sistema de transporte en *Lc. lactis* se encuentra muy estudiado, y los transportadores descritos no aceptan péptidos tan largos como el 33-mer, por lo que es probable que no pueda ser transportado al interior celular (Mazé y cols., 2010; Savijoki y cols., 2006). En consecuencia, suponemos que se debió de producir una lisis celular, al menos parcial, que habría permitido la liberación de PEP *Mx* al exterior, y por lo tanto, la degradación del péptido 33-mer.

2.1.2. Sistema de integración de grado alimentario

La expresión de genes de interés en plásmidos, como el sistema que acabamos de describir, presenta tres grandes desventajas: 1) La inestabilidad de los genes por estar clonados en un vector que debe de ser mantenido continuamente con la adición del antibiótico de selección, 2) la expresión inducible dependiente de la concentración de nisina disponible en el entorno y 3) poseer marcas de resistencia a antibióticos y ADN de grado no alimentario procedentes del vector, características todas ellas que restringen su posible uso en alimentos. También cabe destacar, que *Lc. lactis* no es el hospedador ideal para nuestro objetivo, ya que es poco resistente al paso por el TGI. Además, dado que el tamaño del péptido inmunogénico es ligeramente superior al límite de los transportadores de péptidos descritos en BAL, nos planteamos ir un paso más allá y conseguir la producción extracelular de PEP. Por lo tanto, para solventar estos problemas nos enfrentarnos a una serie de retos:

1) Utilizar *L. casei* como hospedador, 2) Integrar establemente en su cromosoma los genes *pepMx* y *pepSc*, 3) Mantener el estatus de grado alimentario de las cepas recombinantes, 4) Producir constitutivamente los enzimas en cantidad suficiente y 5) Producir los enzimas intra y extracelularmente.

Los tres primeros desafíos los hemos resuelto utilizando el sistema de integración de grado alimentario desarrollado en nuestro grupo (Martín y cols., 2000; Martín y cols., 2004; Martín y cols., 2011). Mediante el uso de este sistema, se integraron los genes *pepMx* y *pepSc* en el cromosoma de la cepa *L. casei* BL23 bajo el control del promotor constitutivo del gen *apf* de *L. crispatus* (Martín y cols., 2011). Además, la fusión traduccional del péptido señal del gen *apf* en el extremo amino, permitió la secreción de las proteínas al exterior celular. Hay que destacar que ninguna de las PEP descritas hasta el momento son extracelulares, todas ellas han sido descritas como enzimas intracelulares o periplásmicas (Shan y cols., 2004). Su elevado tamaño, de aproximadamente 78 kDa (Gass y Khosla, 2007) podría afectar a la producción, solubilidad, plegamiento y secreción del enzima al exterior celular. En consecuencia, dirigir estas proteínas tan grandes a través de la membrana y obtener un plegamiento adecuado con una buena cantidad y actividad enzimática supuso realmente un reto importante. Se obtuvieron cuatro cepas de *L. casei* recombinantes que produjeron PEP *Mx* y PEP *Sc* activas, como demostraron los valores de actividad frente al sustrato cromogénico, tanto en el citoplasma como secretadas al exterior celular.

Además de producir la proteína, es importante obtener la máxima actividad posible. En BAL se había descrito la influencia de la fuente de carbono en la expresión heteróloga, por lo que se ensayó la actividad en glucosa, lactosa y maltosa. Se observó que en la mayor parte de los casos fue en presencia de lactosa donde se obtuvieron los mejores niveles de actividad. Sin embargo, se decidió dar más importancia al elevado crecimiento obtenido en glucosa, que facilita el trabajo en el laboratorio, obteniendo masas celulares más elevadas en tiempos menores. Se seleccionó glucosa para experimentos posteriores.

Al analizar la actividad enzimática de las PEP extracelulares a diferentes valores de pH, se detectó un comportamiento diferente entre ambos enzimas. En el

caso de PEP *Mx* no se detectó actividad por debajo de pH 5, pero se obtuvieron buenos niveles de actividad a pH 7. Sin embargo, con PEP *Sc* no se observaron grandes variaciones de actividad en los diferentes pH ensayados. Estos resultados coinciden con trabajos previos que describen la PEP *Sc*, como la PEP más activa y estable en condiciones gástricas (pH ácido y presencia de pepsina), mientras que PEP *Mx* es precisamente muy susceptible a estas condiciones ambientales (Shan y cols., 2004; Ehren y cols., 2008; Kabashima y cols., 1998; Gass y cols., 2007; Gass y Khosla, 2007; Gass y cols., 2005). Sin embargo, PEP *Sc* es un enzima muy activo frente a los péptidos más pequeños del gluten (menores de 30 aminoácidos), pero es incapaz de degradar el péptido inmunotóxico 33-mer, debido a su tamaño (Gass y cols., 2004). Estas dos características, resistencia a pH ácido e imposibilidad de degradar el 33-mer, fueron tenidas en cuenta por Gass y cols. (2007), que realizaron una combinación sinérgica de PEP *Sc* con la endoproteasa EP-B2, de forma que el conjunto de ambas enzimas fue capaz de degradar el gluten en condiciones gastrointestinales. La endoproteasa hidroliza los péptidos más grandes, mientras que PEP *Sc* degrada lo más pequeños (Gass y cols., 2007). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, hemos generado un *L. casei* recombinante, de forma que el hospedador potencia y complementa la actividad PEP *Sc*, obteniendo una degradación completa del péptido 33-mer. Este resultado se confirma al compararlo con la cepa recombinante *L. lactis* IPLA1510, que aun produciendo una mayor cantidad de PEP, la velocidad de degradación del péptido fue mucho menor, reflejando la importancia del hospedador en la hidrólisis del péptido 33-mer.

En el caso de PEP *Mx*, a pesar de ser susceptible a las condiciones gástricas, su elevada actividad a pH 7 y el hecho de ser bastante resistente a los enzimas pancreáticos (Shan y cols., 2004), hacen de este enzima una candidata ideal para hidrolizar los péptidos del gluten en su sitio de acción, el duodeno, donde hay un pH 6,0-7,0. En este caso es necesario el desarrollo de un sistema de transporte que proteja al enzima a través del TGI, tal y como trataron de realizar Gass y cols. (2005) utilizando cápsulas de recubrimiento entérico. En el presente trabajo, células vivas de *L. casei* actúan como sistema de transporte protegiendo al enzima a lo largo del paso por el TGI y asegurando su producción en el lugar de acción, el duodeno.

Esta estrategia evita los tediosos y costosos pasos previos de síntesis y purificación del enzima. Además, aunque había sido demostrado previamente que PEP *Mx* degrada el péptido 33-mer en fragmentos de 4 a 7 aminoácidos (Shan y cols., 2004), *L. casei* IPLA1506 fue capaz de degradar completamente el péptido 33-mer, no habiéndose detectado mediante la técnica LC-MS péptidos más pequeños producto de la degradación. Este resultado sugiere que la degradación inicial del péptido 33-mer por PEP *Mx* sería una actividad que limitaría la velocidad de la reacción, pero en cuanto se realiza la hidrólisis interna del péptido, los transportadores y las peptidasas de la cepa hospedadora eliminarían rápidamente los productos de PEP *Mx*. Es bien conocido que el sistema proteolítico de las BAL posee diferentes transportadores de oligopéptidos, así como una batería de peptidasas intracelulares. Los resultados obtenidos indican que el péptido 33-mer sería demasiado largo para que *L. casei* BL23 pueda transportarlo al interior celular intacto (Mazé y cols., 2010; Savijoki y cols., 2006), de forma que la actividad PEP *Mx* extracelular degradaría parcialmente el péptido 33-mer en el medio extracelular y los péptidos resultantes, más pequeños, ya podrían ser transportados al interior celular donde serían finalmente degradados a aminoácidos.

Las cepas recombinantes generadas en el presente trabajo podrían ser utilizadas para detoxificar el gluten de la dieta de los enfermos celíacos. Fueron capaces de degradar totalmente 100 ppm del péptido 33-mer tras 12 h de incubación, que es aproximadamente la cantidad que tendrían 8.000 ppm de gluten. Considerando un consumo diario normal de gluten de 13,1 g, estas cepas podrían ser una terapia útil para hidrolizar el péptido inmunotóxico presente en las trazas diarias de gluten presente en los alimentos, puesto que hemos demostrado que estas cepas no solo son capaces de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*, sino que además, mantienen la capacidad de secretar la PEP de manera activa (van Overbeek y cols., 1997). Es importante destacar el papel que juega la leche en la supervivencia celular. En estudios preliminares con las células resuspendidas en medio de cultivo o en solución salina la supervivencia fue mucho menor (datos no mostrados). Muchos estudios han demostrado que la capacidad de

las BAL de sobrevivir a las condiciones del TGI es considerablemente mejorada por la leche (Conway y cols., 1987; Charteris y cols., 1998; Wang y cols., 2012).

Sin embargo, a pesar de haber obtenido actividad tanto con el sustrato cromogénico, como con el péptido 33-mer con las cuatro cepas de *L. casei* recombinantes construidas, la cepa *L. casei* IPLA1506 es la que reúne las características más prometedoras: posee los niveles de actividad extracelular más elevados, degradó completamente el péptido 33-mer tras 12 h de incubación sin dejar productos tóxicos de la degradación, y además necesitó un menor tiempo de incubación para producir PEP tras las condiciones intestinales que la cepa *L. casei* IPLA1507. *L. casei* IPLA1506 actúa como vector, transportando el enzima PEP *Mx* a las condiciones intestinales. De esta forma solventa las desventajas del enzima al protegerla de las condiciones gástricas, y potencia sus beneficios al complementar la hidrólisis del péptido 33-mer y asegurar su secreción en el duodeno, sabiendo que PEP *Mx* es resistente y estable durante más de 1 h a los enzimas pancreáticos (Shan y cols., 2004).

Nuestros estudios sugieren que tanto la cepa silvestre *L. casei* IPLA12038, como la cepa recombinante *L. casei* IPLA1506 serían buenos candidatos para realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* en modelos de EC, como por ejemplo los ensayos realizados con macacos sensibles al gluten, con los que se ensayaron nuevas terapias enzimáticas como la de la endoproteasa B2 de cebada (Bethune y cols., 2008). También se han utilizado ratas recién nacidas sensibilizadas con INF- γ y alimentadas con gliadina para evaluar la administración de una cepa de *Bifidobacterium longum* (Laparra y cols. 2013). Para nuestro propósito, los ratones serían unos buenos candidatos debido a su corta vida, a los avances en su manipulación genética y a la capacidad de alterar radicalmente su microbiota intestinal. Además, se ha demostrado un efecto adyuvante de *L. casei* en un modelo murino de sensibilidad al gluten (D'Arienzo y cols., 2008), así como el potencial de *L. casei* de reducir la enteropatía específica de gliadina en este mismo modelo (D'Arienzo y cols., 2011). De hecho, la administración de *L. casei* reduce la atrofia vellositaria y la homeostasis anormal de la mucosa intestinal.

3. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral abren la puerta a una nueva terapia alternativa para la EC basada en el uso de BAL como fuente de enzimas para hidrolizar los péptidos inmunotóxicos del gluten. Se trata de una primera aproximación que revela aplicaciones prometedoras de las BAL en el campo de la EC. En un futuro se podría ensayar combinaciones de cepas que degraden los péptidos en un tiempo menor. Otra opción prometedora sería la combinación de las dos estrategias desarrolladas en este trabajo, clonando el gen que codifica la PEP *Mx* en la cepa seleccionada de masas fermentadas, *L. casei* IPLA12038. También se podrían expresar en una misma cepa varios genes que codifiquen actividades enzimáticas específicas en la hidrólisis del gluten para conseguir un efecto sinérgico entre ellas, como por ejemplo la endoproteasa de cebada B2 (Bethune y cols., 2006), la prolil endoproteasa de *Aspergillus Niger* (Stepniak y cols., 2006) o las actividades específicas de glutamina aisladas de la cavidad oral de cepas de *Rhotia* (Zamakhchar y cols., 2011). Todas ellas son actividades con un interesante futuro en la degradación del gluten, y los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a la utilización de *L. casei* vivas como los vectores ideales para su producción en la mucosa intestinal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El objetivo de la presente Tesis Doctoral fue obtener cepas de BAL capaces de degradar el péptido inmunogénico 33-mer asociado con el desarrollo de la EC. De los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

Conclusión 1: El tratamiento ácido de la gliadina permitió aumentar su solubilidad, generando péptidos de bajo peso molecular pero no aminoácidos libres y permitiendo su uso como única fuente de nitrógeno en un medio de cultivo selectivo que denominamos AHG-M, con el que se seleccionaron bacterias con actividad gliadinasas.

Conclusión 2: El desarrollo de un zimograma que contiene hidrolizado ácido de gliadina como matriz permitió identificar distintas actividades enzimáticas implicadas en la degradación de la gliadina, obteniéndose distintos perfiles de hidrólisis para cada cepa analizada.

Conclusión 3: A partir de diez muestras de masas de harina fermentada se obtuvieron 15 cepas diferentes de *L. casei*, 1 de *L. plantarum* y 4 de *Ln. mesenteroides* capaces de crecer en AHG-M y de formar halo de degradación.

Conclusión 4: A partir de dos muestras de contenido ruminal bovino se obtuvieron 9 cepas diferentes de *L. casei* capaces de crecer y formar halo de degradación en el medio AHG-M.

Conclusión 5: Todas las cepas seleccionadas presentaron actividad PepQ, PepX y PepI. Todas las cepas seleccionadas a excepción de una cepa de *Ln. mesenteroides* presentaron actividad PepN. En ninguna de las cepas se detectó actividad PepO ni PEP.

Conclusión 6: Cinco de las cepas seleccionadas degradaron completamente el péptido inmunogénico 33-mer en las condiciones ensayadas, de las cuales *L. casei* IPLA12038 y *L. casei* IPLA12046 degradaron el 85% y el 70% del péptido respectivamente, tras 8 h de incubación. Ambas cepas son capaces de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.

Conclusión 7: Se ha secuenciado, ensamblado y analizado el genoma completo de *L. casei* IPLA12038, identificándose 25 CDS que codifican peptidasas y 22 que codifican proteasas. Además, se identificaron 366 CDS que no se encuentran en el genoma de la cepa de referencia *L. casei* BL23, 284 de las cuales están anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida.

Conclusión 8: Se han construido dos cepas recombinantes de *Lc. lactis*, *Lc. lactis* IPLA1509 y *Lc. lactis* IPLA1510, que expresan bajo el control del promotor inducible de la nisina los genes *pepSc* y *pepMx*, respectivamente. *Lc. lactis* IPLA1510 presentó una actividad PEP 4,4 veces más elevada que *Lc. lactis* IPLA1509 y fue capaz de degradar el 80% del péptido inmunogénico tras 24 h de incubación.

Conclusión 9: Se han construido dos cepas recombinantes de *L. casei* de grado alimentario, *L. casei* IPLA1504 y *L. casei* IPLA1507, con el gen *pepSc* integrado establemente en el cromosoma. *L. casei* IPLA1504 produce el enzima PEP Sc intracelularmente mientras que *L. casei* IPLA1507 la secreta al exterior celular. La acción sinérgica del enzima PEP Sc junto con el *L casei* permitió la degradación del péptido inmunogénico 33-mer. Además, la cepa *L. casei* IPLA1507 sobrevivió a las condiciones del TGI simuladas *in vitro* y fue capaz de continuar secretando el enzima de manera activa.

Conclusión 10: Se han construido dos cepas recombinantes de *L. casei* de grado alimentario, *L. casei* IPLA1503 y *L. casei* IPLA1506, con el gen *pepMx* integrado

establemente en el cromosoma. La cepa *L. casei* IPLA1503 produce la enzima PEP *Mx* en el citoplasma celular, mientras que *L. casei* IPLA1506 la secreta al sobrenadante. Ambas cepas fueron capaces de degradar el péptido 33-mer.

Conclusión 11: La cepa *L. casei* IPLA1506 sobrevivió a las condiciones del TGI simuladas *in vitro* y fue capaz de continuar secretando el enzima de manera activa. Además, *L. casei* IPLA1506 fue capaz de degradar completamente el péptido inmunogénico tras 12 h de incubación, sin generar productos de hidrólisis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams MR, Marteau P.** 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food, *Int. J. Food Microbiol.* 27, 263-264.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389- 3402.
- Alvarez MA, Herrero M, Suárez JE.** 1998. The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates in gram-positive and gram-negative bacteria. *Virology* 250(1):185-193.
- Arranz E, Garrote JA.** 2010. [Immunology of celiac disease]. *Gastroenterol Hepatol.* 33(9):643-51.
- Axelsson L.** 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: *Lactic acid bacteria Microbiological and functional aspects*. Third edition. 1-66. Editado por Salminen P, von Wright A, Ouwehand A. Ed Marcel Dekker, New York.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O.** 2008. The RAST server: Rapid annotation using subsystem technology. *BMC genomics* 9:75

- Bao S, Zhu L, Zhuang Q, Wang L, Xu PX, Itoh K, Holzman IR, Lin J.** 2013. Distribution dynamics of recombinant *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract of neonatal rats. *PLoS One*. 8(3):e60007.
- Belderok B.** 2000. Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr*. 55(1):1-86.
- Bermúdez-Humarán LG, Aubry C, Motta JP, Deraison C, Steidler L, Vergnolle N, Chatel JM, Langella P.** 2013. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr Opin Microbiol*. 16(3):278-83.
- Bermúdez-Humarán LG, Aubry C, Motta JP, Deraison C, Steidler L, Vergnolle N, Chatel JM, Langella P.** 2013. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr Opin Microbiol*. 16(3):278-83.
- Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, León AJ, Calvo C, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A, Sanz Y, Arranz E.** 2009. Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa *Gut*. 58:886–887.
- Bertani G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 62:293-300.
- Bethune MT, Khosla C.** 2012. Oral Enzyme Therapy for Celiac Sprue. *Methods in Enzymology*, Volume 502, 242-266
- Bethune MT, Strop P, Tang Y, Sollid LM, Khosla C.** 2006. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol*. 13(6):637-47.
- Bietz, JA, Rothfus JA.** 1971. Differences in amino acid sequences of gliadin and glutenin. *Cereal Chem*. 48, 677-690.
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*. 11(5), 731-753.
- Bolotin A, Mauger S, Malarme K, Ehrlich SD, Sorokin A.** 1999. Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76(1-4):27-76.
- Boucher I, Parrot M, Gaudreau H, Champagne CP, Vadeboncoeur C, Moineau S.** 2002. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. 68(12):6152-61.

- Broadbent JR, Neeno-Eckwall EC, Stahl B, Tandee K, Cai H, Morovic W, Horvath P, Heidenreich J, Perna NT, Barrangou R, Steele JL.** 2012. Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics*. 5;13:533.
- Broderick GA, Wallace RJ, Ørskov ER.** 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (Tsuda T, Sasaki Y, Kawashima R, eds) Academic Press, London, 541-592
- Bullock GL, Shotts EB, Hsu TC.** 1986. Columnaris disease of fishes. Fish Disease Leaflet 72. US Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., 9 pp.
- Capozzi A, Vincentini O, Gizzi P, Porzia A, Longo A, Felli C, Mattei V, Mainiero F, Silano M, Sorice M, Misasi R.** 2013. Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response. *PLoS ONE* 8(6): e66561.
- Carr FJ, Chill D, Maida N.** 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28 (4):281-370.
- Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J.** 2005. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* (Oxford, England) ;21;16;3422-3
- Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgiliis S, Cucca F.** 2001. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens*. 58(6):402-6.
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A.** 2007. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 85(1):160-6.
- CCE.** 2009. REGLAMENTO (CE) No 41/2009 DE LA COMISIÓN de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial de la Unión Europea*. I.16/3.
- Chand N, Mihas AA.** 2006. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol*. 40(1):3-14.

- Charteris K, Morelli C.** 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 84(5):759-768.
- Chopin MC, Chopin A, Rouault A, Galleron N.** 1989. Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome. *Appl Environ Microbiol* ;55(7):1769-74.
- Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL.** 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:217-246.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR.** 2005. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 140(3):408-16.
- CODEX STAN 118 - 1979.** 2008. Norma del Codex relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten.
- Comino I, Real A, Vivas S, Síglez MÁ, Caminero A, Nistal E, Casqueiro J, Rodríguez-Herrera A, Cebolla Á, Sousa C.** 2012. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr* 95(3):670-677 doi:10.3945/ajcn.111.026708
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR.** 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70(1):1-12.
- Corsetti A, Settanni L, Valmorri S, Mastrangelo M, Suzzi G.** 2007. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiol.* 24, 592-600.
- Curry A.** 2013. Archaeology: The milk revolution. *Nature.* 500 (7460), 20-22.
- Daniel C, Roussel Y, Kleerebezem M, Pot B.** 2011. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology*, October 2011, Vol. 29, No. 10
- D'Arienzo R, Maurano F, Luongo D, Mazzarella G, Stefanile R, Troncone R, Auricchio S, Ricca E, David C, Rossi M.** 2008. Adjuvant effect of *Lactobacillus casei* in a mouse model of gluten sensitivity. *Immunol Lett* 119(1-2):78-83.
- D'Arienzo R, Stefanile R, Maurano F, Mazzarella G, Ricca E, Troncone R, Auricchio S, Rossi M.** 2011. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. *Scand J Immunol* 74(4):335-41.

- Darling AE, Mau B, Perna NT.** 2010. ProgressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss, and Rearrangement. *PLoS One.* 5(6):e11147.
- De Angelis M, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, Di Cagno R, Francavilla R, Gobbetti M.** 2009. Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) by sourdough lactobacilli and fungal proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2):508-18.
- De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I, Gobbetti M.** 2006. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta.* 1762:80–93.
- de Azevedo MS, Innocentin S, Dorella FA, Rocha CS, Mariat D, Pontes DS, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM.** 2013. Immunotherapy of allergic diseases using probiotics or recombinant probiotics. *J Appl Microbiol.* 115(2):319-33.
- De Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol.* 62(10):3662-7.
- de Vos WM, Vos P, Dehaard H, Boerrigter I.** 1989. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene* 85, 169-176.
- De Vos WM.** 2011. System solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microb. Cell. Fact.* 10:S2.
- De Vuyst L, Neysens P.** 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* 16, 43–56.
- De Vuyst L, Vrancken G, Ravyts F, Rimaux T, Weckx S.** 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbio.* 26. 666-675.
- del Rio B, Fuente JL, Neves V, Dattwyler R, Seegers JFML, Gomes-Solecki M.** 2010. Platform technology to deliver prophylactic molecules orally: An example using the Class A select agent *Yersinia pestis*. *Vaccine* 28(41):6714-6722.
- Dellaglio F, de Roissart H, Torriani S, Curk MC, Janssens D.** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En *Bactéries Lactiques*. Eds: H. de Roissart H., Luquet, F.M. Lorica, Paris, Francia.

- Denapaite D, Brückner R, Nuhn M, Reichmann P, Henrich B, Maurer P, Schähle Y, Selbmann P, Zimmermann W, Wambutt R, Hakenbeck R.** 2010. The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal?. *PLoS One.* 5(2), e9426.
- Detmers FJM, Kunji ERS, Lanfermeijer FC, Poolman B, Konings WN.** 1998. Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochem*, 37. 16671-16679.
- Detmers FJM, Lanfermeijer FC, Abele R, Jack RW, Tampe R, Konings WN, Poolman B.** 2000. Use combinatorial peptide libraries reveals the ligand binding properties of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97. 12487-12492.
- Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, eDe Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti M.** 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol.* 68:623–633.
- Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M.** 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33(1):1-10.
- Di Sabatino A, Corazza GR.** 2009. Coeliac disease. *Lancet.* 373:1480-1493.
- Douillard FP, Kant R, Ritari J, Paulin Lars, Palva A, de Vos WM.** 2013. Comparative genome analysis of *Lactobacillus casei* strains isolated from Actimel and Yakult products reveals marked similarities and points to a common origin. *Microb Biotechnol.* 6(5): 576–587.
- Dowd B, Walker-Smith J.** 1974. Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *Br Med J.* 2(5909):45-7.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16, 6127-6145.
- Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A.** 2006. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 41(4):408-19.
- Dupuis MÈ, Villion M, Magadán AH, Moineau S.** 2013. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nat Commun.* 2013;4:2087.

- EFSA**, 2013. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*. 11(11):3449.
- EFSA**. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal*;10 (6):2740.
- Ehren J, Govindarajan S, Morón B, Minshull J, Khosla C**. 2008. Protein engineering of improved prolyl endopeptidases for celiac sprue therapy. *Protein Eng Des Sel*. 21(12):699-707.
- Elliott DE, Summers RW, Weinstock JV**. 2007. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int J Parasitol*. 37: 457–464.
- FAO**, 2007. Report on functional foods. Food quality and standards service (AGNS).
- FAO/WHO**. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Joint FAO/WHO Working Group meeting, London Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002.
- Fasano A, Catassi C**. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 120:636-51
- Fasano A**. 2012. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 10(10):1096-100.
- Feldman M**. 2001. Origin of cultivated wheat. En: *The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding*. Bonjean A.P., Angus W.J. (Eds). Paris: Tec & Doc/Intercept Ltd. pp. 3-56.
- Fernández de Palencia P, López P, Corbó A, Peláez C, Requena T**: 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*, 227(5):1475-1484.
- Fernández M, Álvarez MA, Zuñiga M**. 2008. Proteolysis and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. En: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. (Mayo B, López P, Pérez-Martínez G. eds.) 89-136, Kerala, India: Research Signpost. Ed.
- Fernandez-Esplà MD, Garault P, Monnet V, Rul F**. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol*. 66:4772-4778.

- Foucaud C, Kunji ERS, Hagting A, Richard J, Desmazeaud M, Poolman B.** 1995. Specificity of peptide transport system in *Lactococcus lactis*: evidence of a third system which transport hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.* 177. 4652-4657.
- Frisoni M, Corazza GR, Lafiandra D, De Ambrogio E, Filipponi C, Bonvicini F, Borasio E, Porceddu E, Gasbarrini G.** 1995. Wheat deficient in gliadins: promising tool for treatment of coeliac disease. *Gut.* 36:375–378.
- Fuller R.** 1989. Probiotics in man and animals . *J Appl Bacteriol* 365-367.
- Fülöp V, Böcskei Z, Polgár L.** 1998. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*; 94(2): 161-170.
- Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A.** 2011. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes.
- Gallagher SR.** 2007. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. In: *Current Protocols in Cell Biology* 6.1.1-6.1.38. DOI: 10.1002/0471143030.cb0601s37. John Wiley & Sons, Inc.
- García M, Quintero R, López-Munguía A.** 2002. “Biotecnología alimentaria”. Editorial Limusa. p. 577-582.
- García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI.** 2007a. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*; 41(1): 1-24.
- Gass J y Khosla C.** 2007. Prolyl endopeptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 64,345-355.
- Gass J, Bethune M, Siegel M, Spencer A, Khosla C.** 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*; 133:472-480.
- Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I, Khosla C.** 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. *Biotechnol Bioeng* 92(6):674-84.
- Gass J, Vora H, Bethune MT, Gray GM, Khosla C.** 2006. Effect of barley endoprotease EP-B2 on gluten digestion in the intact rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 318(3):1178-86.
- Gerez CL, Rollán GC, de Valdez GF.** 2006. Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Lett Appl Microbiol.* 42(5):459-64.
- Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, Camarca A, Mazzeo MF, Costantini S, Salvati VM, Maurano F, Mazzarella G, Iaquinto G, Bergamo P, Rossi M.** 2007. Transamidation of

wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*. 133:780–789.

Gilbert C, Atlan D, Blanc B, Portalier R, Germond GJ, Lapierre L, Mollet B. 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 178:3059-3065.

Goossens F, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé S. 1996. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 34(1):17-22.

Green MR, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Green P, Cellier C. 2007. Celiac disease. *N Engl J Med.* 357(17):1731-43.

Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. 2012. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol.* 14;18(42):6036-6059.

Hamilton-Miller JM, Shah S. 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett Appl Microbiol.* 26(2):153-4.

Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. 2013. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients.* 5(6): 1869–1912.

Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(4):996-1003.

Holck A, Naes H. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J. Gen. Microbiol.*138:1353-1364.

Holme, J. & Briggs, D.R. 1959. Studies of the physical nature of gliadin. *Cereal Chem.* 36, 321-340.

Holmes GK. 2001. Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13(9):1057-60.

Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H. 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual.* The John Innes Foundation: Norwich, U.K.

- Horvath P, Barrangou R.** 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 8;327(5962):167-70.
- Hugenholtz J, Sybesma W, Nierop Groot M, Wisselink W, Ladero V, Burgess K, Piard Van Sinderen DJC, Eggink G, Smid E, Vera JL, Sesma F, Jansen T, Hols P, Kleerebezem M.** 2002. Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria for the production of Nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 217-235.
- Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, Koning F, Rottiers P, David CS, van Deventer SJ, Murray JA.** 2009. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of lactococcus lactis delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic abdegrees Dq8 transgenic mice. *J Immunol*. 183:2390–2396.
- Hunt KA, van Heel DA.** 2009. Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut*. 58(4):473-6.
- Huys G, D’Haene K, Cnockaert M, Tosi L, Danielsen M, Belen-Florez A, Mätö J, Axelsson L, Korhonen J, Mayrhofer S, Egervärn M, Giacomini M, Vandamme P.** 2010. Intra- and Interlaboratory Performances of Two Commercial Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Bifidobacteria and Nonenterococcal Lactic Acid Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 2567–2574.
- Informe de la RWGESPGN.** 1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child*. 65:909-911.
- IUBMB,** 1992. Enzyme Nomenclature 1992. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, San Diego.
- Janssen GR, Bibb MJ.** 1993. Derivatives of pUC18 that have *Bgl*II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene* 124(1):133-134.
- Je E, Jensen RG, Merilan CP, Smith KL.** 1956. The characteristics of some rumen lactobacilli. *J Bacteriol*. 1956 Aug;72(2):253-8.
- Kabashima T, Fujii M, Meng Y, Ito K, Yoshimoto T.** 1998. Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. *Arch Biochem Biophys*. 1;358(1):141-8.
- Kagnoff M.** 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*. 117(1):41-9.

- Kanatani A, Yoshimoto T, Kitazono A, Kokubo T, Tsuru D.** 1993. J. Biochem. 113, 790–796. Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme.
- Keech CL, Dromey J, Chen Z, Anderson RP, McCluskey J.** 2009. Immune tolerance induced by peptide immunotherapy in an HLA-DQ2-dependent mouse model of gluten immunity. *Gastroenterology*. 136:A355.
- Kleerebezem M, Vaughan EE.** 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Reviews of Microbiology* 3:269-290.
- Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G.** 2000. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology* 89(5), 815-824.
- Klöck C, Diraimondo TR, Khosla C.** 2012. Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 34(4):513-22.
- Koida M, Walter R.** 1976. Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J Biol Chem*; 251(23):7593-7599.
- Kok J, de Vos W.** 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria. En *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, pp. 169-210. Editado por: Gasson M, De Vos W. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Reino Unido.
- Kok J, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Ledeboer AM, Venema G.** 1988. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:231- 238.
- Kong X, Zhou H, Hua Y, Qian H.** 2008. Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *Eur Food Res Technol* (2008) 227:511–517.
- Kuipers OP, de Ruyter PGGA, Kleerebezem M, de Vos WM.** 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of biotechnology* 1998. 64. 15-21
- Kunji ER, Mierau S, Hagting A, Poolman B, Konings WN.** 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187-221.
- Kunji ER, Slotboom DJ, Poolman B.** 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1610(1):97-108.

- Kupper C.** 2005. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*. 128(4 Suppl 1):121-7.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lale G, Gadre R.** 2010. Enhanced production of gibberellin A4 (GA4) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37:297–306.
- Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Laparra JM, Olivares M, Sanz Y.** 2013. Oral administration of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 ameliorates gliadin-induced alterations in liver iron mobilisation. *Br J Nutr* 110(10):1828-36.
- Leenhouts KJ, Kok J, Venema G.** 1989. Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol*. ;55(2):394-400.
- Leon AJ, Garrote JA, Arranz E.** 2005. [Cytokines in the pathogeny of celiac disease]. *Med Clin (Barc)*. 15;125(13):508-16.
- Leroy F, de Vuyst L.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry *Trends in Food Science & Technology*. 15: 67–78.
- Lewis NR, Scott BB.** 2006. Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). *Aliment Pharmacol Ther*. 24:47-54
- Lionetti E, Catassi C.** 2011. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol*. 30(4):219-31.
- Lionetti P, Favilli T, Chiaravalloti G, Ughi C, Maggiore G.** 1999. Coeliac disease in Saharawi children in Algerian refugee camps. *Lancet*. 353:1189-1190.
- Ljungh A, Wadström T.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol*. 7:73- 89.
- Lo Curto A, Pitino I, Mandalari G, Dainty JR, Faulks RM, John Wickham MS.** 2011. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiol*. 28(7):1359-66.

- Losowsky MS.** 2008. A history of coeliac disease. *Dig Dis.* 26(2):112-20.
- Louka AS, Sollid LM.** 2003. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 61(2):105-17.
- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kely C, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C.** 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 62(1):43-52.
- Lundin KE, Sollid LM.** 2014. Advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 30(2):154-62.
- Maguin E, Prévost H, Ehrlich SD, Gruss A.** 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* ;178(3):931-5.
- Makarova KS, Koonin EV.** 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 189(4):1199-208.
- Marietta EV, Murray JA.** 2012. Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol* 34(4):497-511.
- Martín MC, Alonso JC, Suárez JE, Alvarez MA.** 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl Environ Microbiol* 66, 2599-604.
- Martin MC, Fernandez M, Martin-Alonso JM, Parra F, Boga JA, Alvarez MA.** 2004. Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett* 237(2):385-91.
- Martin MC, Pant N, Ladero V, Gunaydin G, Andersen KK, Alvarez B, Martinez N, Alvarez MA, Hammarstrom L, Marcotte H.** 2011. Integrative expression system for delivery of antibody fragments by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 77(6):2174-9.
- Mayo B, van Sinderen D, Ventura M.** 2008. Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Current Genomics*, 9, 169-183
- Mazé A, Boël G, Zúñiga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beaufils S, Poncet S, Joyet P, Milohanic E, Casarégola S, Auffray Y, Pérez-Martínez G, Gibrat J-F, Zagorec M, Francke C, Hartke A, Deutscher J.** 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192(10):2647-2648.

- Medina M, De Palma G, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y.** 2008. Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm (Lond)*. 5: 19.
- Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N.** 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 125(3):730-45.
- Miladinov N, Kuipers OP, Topisirovic L.** 2001. Casitone-mediated expression of the *prtP* and *prtM* genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGIS29. *Arch. Microbiol.* 177, 54-61.
- Mimouni B, Raymond J, Merle-Desnoyers AM, Azanza JL, Ducastaing A.** 1994. Combined acid deamidation and enzymic hydrolysis for improvement of the functional properties of wheat gluten. *J. Cereal Science* 21, 153-165.
- Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M.** 2014. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int J food microbial* 171. 136-146.
- Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M.** 2001. Invited Review: Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci.* 84: 1294-1309.
- Morris ON, Kanagaratnam P, Converse VV.** 1997. Suitability of 30 Agricultural Products and By-Products as Nutrient Sources for Laboratory Production of *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai* (HD133). *J Invertebr Pathol.* 70(2):113-20.
- Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM, Calleja S, de Miera LE, Arroyo P, Casqueiro J.** 2012. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis.* 18(4):649-56.
- Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzù G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA.** 2006. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut.* 55(6):803-8.
- Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V.** 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res*, 2(1):102-111.

- Nyanga-Koumou AP, Ouoba LII, Kobawila SC, Louembe D.** 2012. Response mechanisms of lactic acid bacteria to alkaline environments: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 38(3):185-190.
- Oozeer R, Leplingard A, Mater DD, Mogenet A, Michelin R, Seksek I, Marteau P, Doré J, Bresson JL, Corthier G.** 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol.* 72(8):5615-7.
- Osborne TB.** 1924. The vegetable proteins. 2nd ed. London: Longmans.
- O'Sullivan E, Condon S.** 1999. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺ ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2287-2293.
- Ouwenhand AC, Salminen S, Isolauri, E.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 279-89.
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR.** 1998. Acidosis in cattle: a review. *J Anim Sci,* 76:275-286.
- Pastar I, Tonic I, Golic N, Kojic M, van Kranenburg R, Kleerebezem M, Topisirovic L, Jovanovic G.** 2003. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5802-5811.
- Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB.** 2007. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 26:757-766.
- Pederson JA, Mileski GJ, Weimer BC, Steele JL.** 1999. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 181:4592-4597.
- Perry KD, Briggs CAE.** 1957. The normal flora of the bovine rumen. IV. Qualitative studies of lactobacilli from cows and calves. *J. appl. Bact.* 20, 119.
- Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D.** 2011. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol. J.* 6, 1147-1161.
- Phromraksa P, Nagano H, Boonmars T, Kamboonruang C.** 2008. Identification of proteolytic bacteria from thai traditional fermented foods and their allergenic reducing potentials. *J Food Sci.* 2008 May;73(4):M189-95.

- Pinier M, Verdu EF, Nasser-Eddine M, David CS, Vézina A, Rivard N, Leroux JC.** 2009. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology*. 136:288–298.
- Polgar K, Patthy A.** 1992. Cleavage of the Lys196-Ser197 bond of prolyl oligopeptidase: enhanced catalytic activity for one of the two active enzyme forms. *Biochemistry*. 31, 10769-10773.
- Polgar L.** 1991. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. *Eur. J. Biochem*. 197, 441-447.
- Polgár L.** 1992b. Prolyl endopeptidase catalysis. A physical rather than a chemical step is rate-limiting. *Biochem J*; 283(Pt3): 647-648.
- Polgar L.** 2002a. The prolyl oligopeptidase family. *Cell. Mol. Life Sci*. 59, 349-362.
- Polgar L.** 2002b. Structure-function of prolyl oligopeptidase and its role in neurological disorders. *Curr. Med. Chem. Central Nerv.Syst. Agents* 2, 251-257.
- Poole JA, Barriga K, Leung DY, Hoffman M, Eisenbarth GS, Rewers M, Norris JM.** 2006. Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics*. 117(6):2175-82.
- Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, Sollid LM.** 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*. 173(3):1757-62.
- Rashtak S, Murray JS.** 2012. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 35: 768-781.
- Rawlings ND, Barret AJ.** 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*; 244: 19-6.
- Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M.** 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol*. 73:4499–4507.
- Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM.** 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 44, 256–264.
- Robinson J, Waller MJ, Fail SC, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG.** 2009. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research* 37, 1013-1017.

- Ross RP, Morgan S, Hill C.** 2002. Int J Food Microbiol. 15;79(1-2):3-16. Preservation and fermentation: past, present and future.
- Ruíz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R.** 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical Biochemistry 347, 333-335.
- Sadet-Bourgeteau S, Martin C, Morgavi DP.** 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. Vet Microbiol. 20;146(1-2):98-104.
- Sánchez B, Schmitter JM, Urdaci MC.** 2009. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. Lett Appl Microbiol 48(5):618-622.
- Sanz Y, De Pama G, Laparra M.** 2011. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. Int Rev Immunol.30(4):207-18.
- Sanz Y.** 2009. Novel perspectives in celiac disease Therapy. Mini-Reviews in Medicinal chemistry. 9,359-367.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A.** 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. BMC Med. 7;10:13.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P.** 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 71(4):394-406.
- Scheirlinck T, Mahillon J, Joos H, Dhaese P, Michiels F.** 1989. Integration and expression of alpha-amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. Appl Environ Microbiol 55(9):2130-7
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D.** 2009. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. Gastroenterology 137(6):1912-33.
- Senger S, Luongo D, Maurano F, Mazzeo MF, Siciliano RA, Gianfrani C, David C, Troncone R, Auricchio S, Rossi M.** 2003. Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. Immunol Lett. 88:127-134.

- Serror P, Ilami G, Chouayekh H, Ehrlich SD, Maguin E.** 2003. Transposition in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: identification of two thermosensitive replicons and two functional insertion sequences. *Microbiology*. ;149(Pt 6):1503-11.
- Setty M, Hormaza L, Guandalini S.** 2008. Celiac disease: risk assessment, diagnosis, and monitoring. *Mol Diagn Ther.* 12(5):289-98.
- Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C.** 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J.* 383(2):311-8.
- Shan L, Mathews II, Khosla C.** 2005. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics I catalysis and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3599-3604
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C.** 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 27;297(5590):2275-9.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C.** 2005. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res.* 4(5):1732-41.
- Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S y Mills EN.** 2002. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans.* 30(Pt 6):906-10.
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS.** 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1418):133-42.
- Shewry PR, Halford NG.** 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.* 53(370):947-58.
- Shewry PR.** Wheat. 2009. *J Exp Bot.* 60(6):1537-53.
- Shukla P, Bansode FW, Singh RK.** 2011. Chloramphenicol toxicity: A review. *J Med Sci.* 2:1313–1316.
- Sidira M, Galanis A, Ypsilantis P, Karapetsas A, Progaki Z, Simopoulos C, Kourkoutas Y.** 2010. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 19(4):224-30.

- Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, van Hijum SA.** 2012. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *J Bacteriol.* 194, 195-196.
- Sollid LM, Khosla C.** 2011. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med.* 269(6):604-13.
- Sollid LM.** 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2(9):647-55.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E.** 1989. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.* 1;169(1):345-50.
- Sollid LM, Jabri B.** 2013. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 13(4):294-302.
- Sollid LM, Khosla C.** 2005. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2(3):140-7.
- Southern EM.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Starliper CE.** 2008. General and specialized media routinely employed for primary isolation of bacterial pathogens of fishes. *J Wildl Dis.* 44(1):121-32.
- Steinkraus KH.** 2002. Fermentations in world food processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1:23- 32.
- Stepniak D, Koning F.** 2006. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol.* 2006 Jun;67(6):460-8.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F.** 2006. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291(4):G621-9.
- Stoven S, Murray JA, Marietta EV.** 2013. Latest in vitro and in vivo models of celiac disease. *Expert Opin Drug Discov* 8(4):445-57.
- Szwajcer-dey E, Rasmussen J, Meldal M, Breddam K.** 1992. Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp. *J. Bacteriol.* 174, 2454–2459.

- Tack GJ, van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EM, van Bergen J, Bonnet P, Vreugdenhil AC, Korponay-Szabo I, Edens L, von Blomberg BM, Schreurs MW, Mulder CJ, Koning F.** 2013. Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol.* 19(35):5837-47.
- Takala TM, Saris PE.** 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59. 467-471.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F.** 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:115-137.
- The MHC sequencing consortium.** 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature.* 28;401(6756):921-3.
- Tiekink M, Ehrmann MA, Vogel RF, Ganzle MG.** 2005. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:665-663.
- Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H.** 2013. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One.* 8;8(10):e75073.
- Troncone R, Ivarsson A, Szajewska H, Mearin ML y Members of European Multistakeholder Platform on CD (CDEUSSA).** 2008. Review article: future research on coeliac disease - a position report from the European multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA). *Aliment Pharmacol Ther.* 27(11):1030-43.
- Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L, McCartney AL, Gibson GR.** 2007. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J Appl Microbiol.* 2007;102(4):1026-32.
- van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ.** 1993. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut.* 34(11):1473-5.
- van den Broeck HC, van Herpen TW, Schuit C, Salentijn EM, Dekking L, Bosch D, Hamer RJ, Smulders MJ, Gilissen LJ, van der Meer IM.** 2009. Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biol.* 9:41.
- van Herpen TW, Goryunova SV, van der Schoot J, eMitreva M, Salentijn E, Vorst O, Schenk MF, van Veelen PA, Koning F, van Soest LJ, Vosman B, Bosch D, Hamer**

- RJ, Gilissen LJ, Smulders MJ.** 2006. Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*. 7:1.
- van Overbeek FM, Uil-Dieterman IG, Mol IW, Kohler-Brands L, Heymans HS, Mulder CJ.** 1997. The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(11):1097-9.
- Van Soest PJ.** 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press.
- Venalainen JI, Juvonen RO, Mannisto PT.** 2004. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur. J. Biochem*. 271, 2705-2715.
- Vera A, Rigobello V, Demarigny Y.** 2009. Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. *Food Microbiol*. 2009 Oct;26(7):728-33.
- Verdu EF, Armstrong D, Murray JA.** 2009. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: The “No Man’s Land” of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 104:1587-1594.
- Vergio F.** 1954. Anti-und Probiotika. *Hipocrates* 25: 116-119.
- Vickery HB.** 1923. A product of mild acid hydrolysis of wheat gliadin. *J. Biol. Chem*. 56, 415-428.
- Vieira J, Messing J.** 1991. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* 100:189-94.
- Vizoso Pinto MG, Franz CM, Schillinger U, Holzappel WH.** 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol*. 109:205-214.
- Vogel RF, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, Voget S, Angelov A, Böcker G, Liebl W.** 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb Cell Fact*. 30:10
- Walker MM, Murray JA.** 2011. An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*. 59, 166-179.
- Wallace RJ, Cotta MA.** 1988. Metabolism of nitrogen containing compounds. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson PN, ed) Elsevier Applied Science, London, 217-250
- Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerenyi TD.** 1971. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science*; 173(999): 827-829.

- Wang J, Zhong Z, Zhang W, Bao Q, Wei A, Meng H, Zhang H.** 2012. Comparative analysis of the gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang with and without fermented milk as a vehicle during transit in a simulated gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 163(5):357-365.
- Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol.* 189, 3256-3270.
- Wei M-Q, Rush CM, Norman JM, Hafner LM, Epping RJ, Timms P.** 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J Microbiol Methods* 21(1):97-109
- Wellner N, Marsh JT, Savage AW, Halford NG, Shewry PR, Clare Mills EN, Belton PS.** 2006. Comparison of repetitive sequences derived from high molecular weight subunits of wheat glutenin, an elastomeric plant protein. *Biomacromolecules.* 7(4):1096-103.
- Wells JM, Mercenier A.** 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008 May;6(5):349-62.
- Wells J.** 2011. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2:423-45.
- Wieser H.** 1996. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.* 412:3-9.
- Wieser H.** 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 24(2):115-9.
- Wilson MK, Briggs CAE.** 1954. The normal flora of the bovine rumen. I. Bacteriological methods for quantitative studies. *Vet. Record.*, 66, 187-188.
- Wu CH, Nakai S, Powrie WD.** 1976. Preparation and properties of acid-solubilized gluten. *J. Agric. Food chem.* 24, 504-510.
- Yarza I.** 2013. Pan casero. Recetas, técnicas y trucos para hacer pan en casa de manera sencilla. Larousse.
- Yeh E, Pinsky BA, Banaei N, Baron EJ.** 2009. Hair Sheep Blood, Citrated or Defibrinated, Fulfills All Requirements of Blood Agar for Diagnostic Microbiology Laboratory Tests. *PLoS One.* 4(7): 6141.

- Yoshimoto T, Kanatani A, Shimoda T, Inaoka T, Kokubo T, Tsuru D.** 1991. J. Biochem. 110, 873–878. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene.
- Yuki N, Watanabe K, Mike A, Tagami Y, Tanaka R, Ohwaki M, Morotomi M.** 1999. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain *Shiota*, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. Int J Food Microbiol. 1;48(1):51-7.
- Zamakhchari M, Wei G, Dewhirst F, Lee J, Schuppan D, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ.** 2011. Identification of *Rothia* Bacteria as Gluten-Degrading Natural Colonizers of the Upper Gastro-Intestinal Tract. PLoS ONE 6(9): 24455.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

```

1  CCATGGCGTTA TCCAGCTACA CCGCAGAAC AAGTAGTTGA TAGGTTACAT GGTGTACAAG TTGCAGATCC ATATAGATGG TTAGAAGATG AAAAAGCTCC TGAAGTACAA ACATGGATCA CGGCACAAAA
   START
   M A Y P A T R A E Q V V D T L H G V Q V A D P Y R W L E D E K A P E V Q T W M T A Q
131 TGCATGCA CGTGAAGCAT TAGCAAAAGTT TCCAGGTCGT GRAAGCATTAG CAGCTAGATT CAAGAATTA TTCTACTACG ATTCGTATC AACACCTTCT CGTAGAAAAG CTCGTTTCTT TTATGTTAGA
   N A H A R E A L A K F P G R E A L A R F K E L F Y T D S V S T P S R R N G R F F Y V R
261 ACACAFAAG ATAAGGAAA GGCAATTTTA TATTGGCGTC AAGGTGAAAG TGGTCAAGAA AAGTATTAT TAGATCCAAA TGGATGGTCA AAAGATGGTA CAGTTAGTTT AGGAACITGG GCTGTATCTT
   T H K D K E K A I L Y W R Q G E S G Q E K V L L D P N G W S K D G T V S L G T W A V S
391 GGGATGGTAA ARAAGTTGCT TTGCACAAA AACCTAATGC ACCTGATGAA CGCATTTTAC ATGTTATTGA TGTAGATAGT GGTGAATGGT CTAAGSTAGA TGTATTGAA GGTGAAAGT ATGCAACGCC
   W D G K K V A F A Q K P N A A D E A V L H V I D V D S G E W S K V D V I E G G K Y A T
521 AAAATGGACT CCGTATTCAA AGGTTTCTA TTATGAATGG TTACCAACAG ATCCTAGTAT TAAAGTAGAT GAAGCTCCAG GTTATACAAAC GATTAGATAT CATACTTTAG GAACAGAACC ATCTAAAGAT
   P K W T P D S K G F Y Y E W L P T D P S I K V D E R P G Y T T I R Y H T L G T E P S K D
651 ACAGTAGTTC ATCAACGTAC GGGTATCCT ACTACATTTT TACAATCTGA TTTATCAGT GAUGAAAGT AITTAATCTG ATATATTTTA AGAGATGGT CAGAAAATGA TGTTTATGG AAGCGTCCAG
   T V V H E R T G D P T T F L Q S D L S R D G K Y L F V Y I L R G W S E N D V Y W K R P
781 GTGAAAAGGA TTTCAGATTA TTAGTTAAGG GAGTAGGTGC TAAATATGAA GTACATGCAT GGAAGGATCG TTTCTATGTT TTAAACAGATG AAGGTGCTCC ACGTCAAGA GTTTTCGAAAG TAGATCCAGC
   G E K D F R L L V K G V G A K Y E V H A W K D R F Y V L T D E G A P R Q R V F E V D P
911 AAAGCCTGCT AGAGCAAGTT GGAAAGAAAT TGTACCTGAA GATTCCTCAG CATCTTTTAT AAGTGTCTT AITGTAGTGG GACATTTTAT TTTAGAATAT TTAAAGGATG CTACTTCAGA AGTACGTTGT
   A K P A R A S W K E I V P E D S S A S L L S V S I V G G H L S L E Y L K D A T S E V R V
1041 GCACATTAAG AGGGTAAACC AGTTAGAACA GTACAATTAC CTGGAGTAGG TCCAGCTTCT AATTTAATGG GTTTAGAAGA TTTAGATGAT GCATTTATG TATTCAGGTC ATTCAGGACT CCACGTCAAA
   A T L K G K P V R T V Q L P G V G A A S N L M G L E D L D D A Y Y V F T S F T T P R Q
1171 TTTATAAAC ATCAGTAAAT ACGGAAAGA GTGAATTAAG GCCTAAAGTA GATGTTCCAA TGAATCCGTA ACAATATCAA GTTGAACAAG TATTTTATGC TAGTAAGGAT GGTACTAAG TACCAATGTT
   I Y K T S V S T G K S E L W A K V D V P M N P E Q Y Q V E Q V F Y A S K D G T K V P M
1301 CGTAGTTCAT CGTAGGATT TAAAAGAGA TGGTAAAGCA CCTACTTAT TATATGGATA TGGTGGATTC AATGTAATA TGGAACTTAA TTTCCGTTAG TCTATTTTAC CTTGGTTAGA TGCAGGTGGA
   F V V H R K D L K R D G N A P T L L Y G Y G G F N V N M E A N F R S S I L P W L D A G G
1431 GTTTATGCTG TAGCAAAATTT ACGTGGTGA GGTCAATATG GTAAAACATG CCAATGCA GGAAGATTAG ATPAAGAACA AAATGTATTC GATGATTC ATGCAGCTGC AGAATATTTA GTTCAACAAA
   V Y A V A N L R G G G E Y G K A W H D A G R L D K K Q N V F D D F H A A A E Y L V Q Q
1561 AGTATACACA ACCTAAGCGT TTAGCAATTT ATGGAGTTC TAATGGAGGT TTATTAGTAG GTGCTGCAAT GACGCAAGA CCAGAAATAT ATGGAGCTGT AGTTTGTGCA GTTCTTTTAT TAGATATGGT
   K Y T Q P K R L A I Y G G S N G G L L V G A M T Q R P E L Y G A V V C A V P L L D M
1691 TCGTTATCAT TTATTITGGAT CTGGTAGAAC GTGGATTCCA GAATATGGTA CTGCTGAAA GCCTGAAGAT TTCAAGACAT TACATGCATA TTCACCATAT CATCATGTTT GTCCAGATGT TAGATATCCT
   V R Y H L F G S G R T W I P E Y G T A E K P E D F K T L H A Y S P Y H H V R P D V R Y P
1821 GCITATTAA TGATGGCTGC AGATCATGAT GATCGTGTAG ATCCATATGCA TCCRAAGAAA TTCTTCTGCT CAGTACAAA TTCACCAGGT AATCCTGCTA CAGCATTATT ACGTATTGAA GCTAATGCAG
   A L L M M A A D H D D R V D P M H A R K F V A A V Q N S P G N P A T A L L R I E A N A
1951 GACATGGAGG TGCAGATCAA GTAGTAAAG CAATTTGAATC AAGTGTGAT TTATATTTCAT TTTTATTTCCA AGTTTATGAT GTACAAGGTG CACAAGGTG TGTAGTGGCA CAAGGACGT AATCTAGA
   G H G G A D Q V A K A I E S S V D L Y S F L F Q V L D V Q G A Q G V A A Q G R - S R
   XbaI
   -----
   STOP

```

Figura 54. Secuencias nucleotídica (negro) y aminoacídica (verde) del gen sintético *pepMx*. Se muestran el codón de inicio (START) y el de terminación (STOP), así como los sitios de restricción más relevantes (azul).

```

NcoI
+-----
1  CCATGGGCTAA TCGTTTATGG TTAGCAATGG CAGCTCCTTT AGCTTTAGCA ACACCAGTAG CTTTTGCACA AAGCCACCTT ACTTTAGCAA AAGATCAAGC TATGCCCTTCA TTACCACCTT ATCCAGCAAG
M A N R L W L A M A A P L A L A T P V A F A Q T P P T L A K D Q A M P S L P P Y P A
START
131 TCCTCAAGTA CCATTAGTTG AAGATCAATT CGGTGAAAAG GTTCTGTATC CTGTGGCTTG GTTAGAAGCA GATGTTAGAA CAGATGCTAA AGTACAGCT TGGGTTCAAG CACAATCTGC TTATACGGCA
S P Q V P L V E D H F G E K V S D P W R W L E A D V R T D A K V A A W V Q A W V Q A Q S A Y T A
261 GCTTATTAA AACAAATACC TGAAGGTGCA GCTTTAGAAA AGAGAAATGAA GGCATTAATT GATTTAGAAC GTTTCGGATT ACCACAACGT AGAGGTGCTT CTGTATTCTA TTCAATGGAAT AGTGGTTTAA
A Y L K Q L P E R A A L E K R M K A L I D Y E R F G L P Q R R G A S V F Y S W N S G L
391 TGAATCAAT ACAATTATTA GTTCGTCTGT CTGATGCACC AGTTGGTACG AAGGAAAG TTTTATTAGA TCCAAATACT TGGGCAAGG ATGGTGTAC AGCAATTAGAT GCTTGGGAC CTTCTGATGA
M N Q S Q L L V R P A D A F V G T K G R V L L D P N T W A K D G A T A L D A W A A S D
521 TGGTCGTTA TTAGCATATT CTGTTCAAGA TGGTGGATCA GATTTGGAAA CAGTAAAATT TGTAGGAGTT GCAGATGAAA AGCCTTTAGC TGAATGAAATTA AAGTGGTAA AGTTCAGTGG ATTAGCATGG
D G R L L A Y S V Q D G G S D W R T V K F V G V A D G K P L A D E L K W V K F S G L A W
651 TTGGTAATG ATGCTTTATT ATATTTCTGT TTGCGAAGC CAAAAGAAG TCAAGCATTC CAAGCATTAA ATTATAATCA AACGGTTTGG TTACATAGAT TAGTACTCC TCAATCAGCA GATCAACCAG
L G N D A L L Y S R F A E P K E G Q A F Q A L N Y N Q T V W L H R L G T P Q S A D Q P
781 TATTTGCTAC ACCTGAAITTA CCAAAACGTG GACATGGTGC AAGTGTCTCT TCAGATGGAA GATGGTGTGT TATTACGAGT TCTGAAAGTGA CTGATCTCTGT AAATACAGTA CATGTTGGCAC GTGTTAGAAA
V F A T P E L P K R G H G A S V S S D G R W V I T S S E G T D P V N T V H V A R V T
911 TGGTAAAATT GGACCTGTAA CGGCATTAAT TCCAGATTTA AAGGCTCAAT GGGATTTTGT AGATGGAGTT GGTGATCAAT TATGGTTCGT ATCTGGAGT GGTGCACCAT TAAAAAAGAT TGTACGTTGT
N G K I G P V T A L I P D L K A Q W D F V D G V G D Q L W F V S G D G A P L K K I V R V
1041 GATTTATCTG GTTCAACGCC TAGATTTGAT ACTGTAGTTC CAGAATCTAA GGAATTAATTA GAATCTGTAG GTATTCGAGG AAATCGTTTA TTCCGTTCTT ATATTCATGA TGCAAAATCA CAAAGTTTATG
D L S G S T P R F D T V V P E S K D N L E S V G I A G N R L F A S Y I H D A K S Q V L
1171 CTTTCGATTT AGATGGAAG CCTGCTGGTG CAGTATCTTT ACCAGGAATT GGTAGTGCAT CTGGTTTATC AGGACGTCCT GGTGATAGAC ATGCTTATTT AAGTTTTTC AAGTTCACCT AACCTGCAAC
A F D L D G K P A G A V S L P G I G S A S G L S G R P G D R H A Y L S F S S F T Q P A
1301 AGTATTAGCT TTAGATCCAG CTACGGCAAA AACAACGCCT TGGGAACCCAG TTTCATTAAC TTGATATCCA GCAGATTTCC GGTGATAACA AGTATTTTAT CCTTCAAAGG ATGGTACGAA GGTACCAATG
T V L A L D P A T A K T T P W E P V H L T F D P A D F R V E Q V F Y P S K D G T K V P M
1431 TTGATGTTCC GTAGAAAAGA TGCAAAAGGA CCATTACCTA CATTATTATA TGGTTATGGT GGATTCATG TAGCATTAAC TCCTTGGTGT TCAGCTGGTT TCATGACATG GATTGATAGT GGTGGAGCTT
F I V R R K D A K G P L P T L L Y G Y G G F N V A L T P W F S A G F M T W I D S G G A
1561 TCGCATTAGC TAATTTACGT GGTGGTGGTG AATATGGAGA TGCATGGCAT GATGCTGGTC GTAGAGATAA GAAGCAAAAT GTATTCGATG ATTTCAATGC AGCTGGTGAA TGGTTAATTG CAAATGGAGT
F A L A N L R G G G E Y G D A W H D A G R R D K K Q N V F D D F I A A G E W L I A N G
1691 AAGCCACGT CATGGTTTAG CTATTGAAAG TGGTTCTAAT GGAGGTTTAT TAATTTGGTC AGTAAACAAAT CAAAAGCCTG ATTTATTTCG AGCTGCATCA CCAGCAGTAG GTGTTATGGA TATGTTACGT
V T P R H G L A I E G G S N G G L L I G A V T N Q R P D L F A A S P A V G V M D M L R
1821 TTGATCAAT TCACGCTGG AAGATTTGG GTTGATGATT ATGGTTATCC AGAAAAGAA GCAGATTGGC GUGTATTACG TAGATATAGT CCTTATCATA ATGTAAGATC TGGTGTGTGAT TATCCAGAA
F D Q F T A G R Y W V D D Y G Y P E K E A D W R V L R R Y S P Y H N V R S G V D Y P A
1951 TTTTAGTAAC TACAGCTGAT ACAGATGATC GTGTAGTTCC TGGTCATTTCA TTAAGTATA CAGCTGCATT ACAAAAGGCT GCAATTTGTC CAAAAGCTCA TTTAATTCGT ATTTGAACTA GAGCAGGACA
I L V T T A D T D D R V V P G H S L K Y T A A L Q T A A I G P K P H L I R I E T R A G
XbaI
+-----
2081 TGGTATGGA AAGCCAAATG ATAAGCAAAAT TGAAGAAAAC GCAGATGTAC AAGCATTTT AGCTCATTT ACAGGTTTAA CCCCAGTCC TTAATCTAGA
H G S G K P I D K Q I E E T A D V Q A F L A H F T G L T P R P - S R
STOP

```

Figura 55. Secuencias nucleotídica (negro) y aminoacídica (verde) del gen sintético *pepSc*. Se muestran el codón de inicio (START) y el de terminación (STOP), así como los sitios de restricción más relevantes (azul).