



ÁREA TEMÁTICA

TRANSGÉNICOS
(NOVEDADES,
LEGISLACIÓN, MÉTODOS)

I CONGRESO

Madrid, 9-11 de marzo de 2005

LA CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS GÉNICAS DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA ENTEROCINA A (ENTA) AL PÉPTIDO SEÑAL DE LA ENTEROCINA P (ENTP), PERMITEN LA CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN FUNCIONAL DE LA ENTA EN CEPAS DE LACTOCOCCUS LACTIS DE ORIGEN LÁCTEO

Hernández P, Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Citti R, Sánchez J, Basanta A, Gómez B, Herranz C, Cintas LM
Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid.

Objetivos: Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de origen ribosomal producidos por numerosos organismos, incluyendo las bacterias ácido-lácticas (BAL). Las bacteriocinas purificadas o las BAL productoras de bacteriocinas podrían utilizarse, solas o en combinación con otras barreras, para asegurar la calidad higiénica y sanitaria de muchos alimentos. La enterocina A (EntA) es una bacteriocina producida por *E. faecium* PLBC21 con una potente actividad antilisteria. Sin embargo, la utilización de enterococos como productores de bacteriocinas debe evaluarse con cautela porque numerosos aislados del género *Enterococcus* codifican factores potenciales de virulencia y poseen genes de resistencia a antibióticos. Las bacteriocinas producidas por enterococos podrían producirse en otras bacterias lácticas de grado alimentario (GRAS), más seguras desde un punto de vista higiénico-sanitario. Durante el desarrollo de este trabajo, la construcción de quimeras génicas del gen estructural de la EntA al péptido señal de la enterocina P (EntP), producida por *E. faecium* P13, han permitido la clonación y producción funcional de la EntA en cepas de *L. lactis* de origen lácteo.

Material y métodos: El trabajo realizado ha consistido en la: (1). Obtención de insertos de clonación mediante la amplificación por PCR del péptido señal de la EntP y del gen estructural y de inmunidad de la EntA (2). Generación de fragmentos génicos (quimeras), resultantes de la complementación génica y amplificación por PCR, de los insertos previamente citados (3). Clonación de los insertos generados en el vector de expresión de promotor constitutivo pMG36c. (4). Transformación de cepas competentes de *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 y de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y DPC5598 con los plásmidos recombinantes, pMP15 y pMP10i, obtenidos previamente. (4). Detección y cuantificación de la producción de EntA de los sobrenadantes de las cepas de *L. lactis*, mediante un ELISA indirecto no competitivo (ELISA-NCI) y determinación de su actividad antimicrobiana mediante un ensayo microbiológico en placas microtituladoras (EPM).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las experiencias realizadas han permitido la obtención de cepas recombinantes de *L. lactis* productoras de EntA y de cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5598 co-productoras de nisina A y EntA. La producción de EntA por las cepas de *L. lactis* fue mayor que la producida por la cepa silvestre de *E. faecium* PLBC21, pero su actividad antimicrobiana específica fue ligeramente menor. Todas las cepas recombinantes de *L. lactis* pueden mostrar su utilidad como agentes de seguridad frente a *L. monocytogenes* y otros patógenos de interés en diversos derivados lácteos, así como su potencial como modelo molecular de producción y secreción de otras bacteriocinas y péptidos de interés (antígenos vacunales, mediadores inmunológicos, etc.) en BAL u otros hospedadores de interés alimentario.

CLONACIÓN, PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE LA ENTEROCINA P, UNA BACTERIOCINA DE ENTEROCOCCUS FAECIUM P13, EN PICHIA PASTORIS

Pablo Hernández P, Gutiérrez J, Criado R, Martín M, Citti R, Sánchez J, Basanta A, Gómez B, Herranz C
Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid.

Objetivos: La producción de bacteriocinas como péptidos antimicrobianos de amplio espectro de acción es común en las bacterias ácido-lácticas (BAL), microorganismos reconocidos como seguros (GRAS) en la industria alimentaria. La enterocina P (EntP) es una bacteriocina de la subclase IIa, producida por *E. faecium* P13. El gen estructural (entP) codifica la EntP como un pre-péptido de 71 aminoácidos, con un péptido señal de 27 aminoácidos y la bacteriocina madura (EntP) de 44 aminoácidos. La EntP es una bacteriocina que inhibe el desarrollo de numerosas bacterias alterantes y patógenas de los alimentos como *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *C. botulinum* y *S. aureus*, lo que posibilita su utilidad como aditivo antimicrobiano natural de los alimentos. Sin embargo, la utilización de enterococos como productores de bacteriocinas debe evaluarse con cautela porque numerosos aislados codifican factores potenciales de virulencia y poseen genes de resistencia a antibióticos. Por razones de seguridad e higiene alimentaria se considera conveniente la clonación, producción y secreción de la EntP, en otros hospedadores más seguros.

Material y métodos: El trabajo realizado ha consistido en: (1) Obtención de un fragmento de clonación (inserto JC) con la secuencia nucleotídica de la EntP; (2) Clonación de JC en un vector de expresión de levaduras con un péptido señal de secreción y bajo el control de un promotor inducible, para generar el plásmido pJC31; (3) El plásmido pJC31 fue purificado de *E. coli* DH5 α , linearizado por hidrólisis con ScaI e integrado por transformación en células competentes de *P. pastoris* X-33; (4) Selección fenotípica y genotípica de colonias de *P. pastoris* X-33 (pJC31) productoras de EntP; (5) Evaluación de la producción y actividad antimicrobiana de EntP de los sobrenadantes de la cepa recombinante de *P. pastoris* X-33t.

Resultados y conclusiones: La EntP producida por *E. faecium* P13 se ha clonado, producido y secretado en *P. pastoris*. La producción heteróloga de EntP por *P. pastoris* X33t, fue mayor y su actividad antimicrobiana específica más elevada, que la producción y actividad de dicha bacteriocina por la cepa silvestre de *E. faecium* P13. La purificación a homogeneidad de la EntP producida por *P. pastoris* X33t, permitió determinar que su tamaño molecular, evaluado por espectrometría de masas,

fue idéntico al de la EntP producida por *E. faecium* P13 lo que sugiere que la síntesis, procesado y secreción de dicha bacteriocina ocurre eficazmente en *P. pastoris*. La EntP es la primera bacteriocina con actividad biológica plena producida por *P. pastoris*. La producción industrial de numerosos enzimas y péptidos de interés farmacológico se basa en la utilización de *P. pastoris* como hospedador heterólogo. Por ello, no cabe duda de que la cepa recombinante de *P. pastoris* X-33t, constituye un avance más en la utilización de *P. pastoris* como productor heterólogo de otras bacteriocinas y péptidos de interés en la industria alimentaria.

EMPLEO DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-PEPTÍDICOS DE ESPECIFICIDAD PREDETERMINADA Y DE ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA), PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR ENTEROCOCCUS FAECIUM L50

Pablo Hernández P, Criado R, Gutiérrez J, Citti R, Martín M, Basanta A, Sánchez J, Gómez B, Herranz C, Cintas LM

Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid.

Objetivos: La utilización de las bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos se encuentra limitada por la disponibilidad de metodologías analíticas que permitan su detección y cuantificación en los alimentos. No obstante, la generación de anticuerpos frente a bacteriocinas y su empleo en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) apropiados puede permitir su detección/cuantificación de manera específica, sensible, rápida y eficaz. La elevada actividad antimicrobiana y amplio espectro de acción de *E. faecium* L50, debido a la producción de tres bacteriocinas, enterocinas L50 (EntL50A y EntL50B), enterocina P (EntP) y enterocina Q (EntQ), aconsejan su posible empleo en la bioconservación de alimentos en forma de cultivo iniciador y/o protector o el de sus bacteriocinas purificadas como aditivos alimentarios. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la detección y cuantificación de las enterocinas producidas por *E. faecium* L50 mediante la generación de anticuerpos policlonaes de especificidad predeterminada frente a péptidos sintéticos derivados de la secuencia aminoacídica conocida de la EntL50A, EntL50B, EntP y EntQ y el posterior desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) apropiados.

Material y métodos: En este trabajo se ha procedido al: (1) Diseño, evaluación del potencial inmunógeno y síntesis como péptidos sintéticos de determinantes antigénicos específicos para cada bacteriocina: péptidos LR1 y LR2 (deducidos del extremo C-terminal de EntL50A y EntL50B, respectivamente), péptidos P1 y P2 (deducidos del extremo N- y C-terminal de EntP, respectivamente), péptido Q1 (deducido del extremo N-terminal de EntQ) y molécula completa de EntQ; (2) Conjugación de los péptidos a una molécula portadora (KLH), inmunización de lotes de 3 conejos/péptido y obtención de sus inmunoseros; (3) Detección de la presencia de anticuerpos policlonaes en los inmunoseros obtenidos; (4) Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los inmunoseros mediante un ensayo ELISA-NCI; (5) Detección de la presencia y cuantificación de las bacteriocinas de interés en los sobrenadantes de cultivos de *E. faecium* L50 y comparación con los generados mediante técnicas microbiológicas como la técnica de difusión en agar y los ensayos en placas microtituladoras.

Resultados y conclusiones: Los anticuerpos policlonaes obtenidos frente a los péptidos sintéticos LR1, LR2 y P2 y frente a la EntQ han permitido la identificación y diferenciación de las bacteriocinas EntL50A, EntL50B, EntP y EntQ, respectivamente, así como su cuantificación en sobrenadantes de *E. faecium* L50 desarrollado a diversas temperaturas, mostrando diferencias en su cinética de producción según la temperatura de incubación. Además, la sensibilidad y especificidad observadas con el ensayo NCI-ELISA constituyen una ventaja frente a las técnicas microbiológicas para la posible detección/cuantificación de estas bacteriocinas en los alimentos.

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DE USO TERAPÉUTICO EN PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

Cebadera Miranda E, Cámara Hurtado M

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Dpto. Nutrición y Bromatología II. Bromatología.

Resumen: La Ingeniería Genética permite el aislamiento, manipulación y recombinación de fragmentos de ADN. Esta tecnología, aplicada a la transformación de plantas, permite la obtención de vegetales modificados genéticamente que expresan proteínas de interés codificadas por el gen insertado. Estos vegetales en un principio, expresaban características simples codificadas por un solo gen, generalmente con un fin de mejorar las condiciones agronómicas. Actualmente, las plantas modificadas genéticamente se pueden utilizar con diversos fines.

Una aplicación importante que presentan este tipo de plantas es la obtención de sustancias de uso terapéutico, como es el caso de encefalinas, hirudina, interferón alfa, insulina, seroalbúmina humana, y dos de los medicamentos más costosos de la industria farmacéutica: el factor de crecimiento de macrófagos y la glucocerebrosidasa (proteína cuya carencia es responsable de una rara enfermedad autosómica recesiva, la enfermedad de Gaucher).

Otras de las sustancias de uso terapéutico obtenidas a partir de plantas modificadas genéticamente han sido las vacunas de nueva generación. La ingeniería genética permite aislar un gen de un organismo para introducirlo en otro, hecho que favorece el uso de esta herramienta tecnológica para introducir fácilmente ADN patógeno en el interior de organismos como bacterias, virus o plantas. De este modo, los organismos que incorporan el ADN patógeno se pueden emplear como fuente de producción de gran cantidad de proteína antigénica útil para su uso como vacunas.

Si nos basamos en un solo tipo de organismo capaz de incorporar ADN patógeno, en concreto las plantas, obtendremos las denominadas "Vacunas comestibles", término que suele aplicarse al uso como vacuna de las partes comestibles de las plantas modificadas genéticamente o infectadas con un virus vegetal, con el fin de que produzcan antígenos de un patógeno contra el cual se desea proteger a una persona o animal.

Como conclusión, la mayoría de los genes de cualquier origen se pueden expresar en sistemas heterólogos y así producir sustancias de uso terapéutico. Las plantas son un sistema de expresión ideal, ya que producen el material en mayor cantidad, más seguro y biológicamente más activo con el costo más bajo.

En el presente trabajo se plantea una revisión de las investigaciones realizadas hasta el momento para la obtención de diversos compuestos de uso terapéutico a partir de plantas modificadas genéticamente.

TRAZABILIDAD Y ETIQUETADO DE ALIMENTOS Y PIENSOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Alcalde Cazorla E, Cámara Hurtado M

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología.

El pasado abril de 2004 entraron en vigor las nuevas normativas sobre la trazabilidad y etiquetado de Organismos Modificados Genéticamente (OMG) en la Unión Europea (UE). Con esta normativa la Comisión Europea ha pretendido satisfacer las demandas de los consumidores y ONGs que pedían un mayor control y etiquetado de los OMG. Su redacción ha estado precedida de intensos debates entre partidarios y oponentes de la biotecnología y su discusión no ha estado circunscrita a la UE sino que ha influido en la legislación internacional al respecto, especialmente en el Protocolo de Cartagena que regula todos los movimientos transfronterizos de OMGs.

La cadena agroalimentaria española se encuentra especialmente expuesta a la utilización de OMGs tanto desde la importación como por el cultivo de plantas modificadas genéticamente en nuestro país que se lleva a cabo desde 1998. En consecuencia estas normativas van a condicionar su forma de operar de forma significativa tanto para el comercio intra como extra-comunitario.

En el trabajo se plantea un análisis de toda la normativa tanto nacional, comunitaria e internacional que regula la trazabilidad y etiquetado de los OMG. Se parte de una revisión de los antecedentes de legislación nacional y europea acerca del etiquetado de alimentos y piensos modificados genéticamente previos a los nuevos reglamentos; y una revisión de la normativa generada en los tratados internacionales, especialmente la referida al Protocolo de Cartagena de Bioseguridad y El Codex Alimentarius. Se analiza en detalle el Reglamento (CE) nº 1830/2003 de Trazabilidad y etiquetado, comparando los nuevos requisitos frente a los anteriores y señalando los puntos necesarios de adaptación para el cumplimiento de la nueva normativa y finalmente se señalan las implicaciones que el etiquetado y trazabilidad de los OMG tiene sobre la coexistencia de las producciones de OMGs y los productos convencionales y ecológicos.

El conocimiento de esta normativa compleja es clave para un adecuado funcionamiento de la producción y comercialización de los productos agroalimentarios y puede ser un elemento clave en la competitividad del sector agroalimentario.

ACTITUD DEL CONSUMIDOR ESPAÑOL FRENTE A LOS ALIMENTOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Soler Marín A, Viedma Viedma I, Serrano Megías M, López Nicolás JM

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Católica San Antonio. Murcia.

Introducción: Al hablar de alimentos genéticamente modificados nos referimos a aquellos que han sido elaborados a partir de un organismo genéticamente modificado (OGM) (animales, vegetales, o microorganismos) o los que contienen algún ingrediente que proviene de alguno de estos OGM, incluyendo los aditivos. En la actualidad existe un rechazo generalizado ante los alimentos genéticamente modificados siendo mayor en Europa que en Estados Unidos. Los aspectos que repercuten en una mayor o menor percepción del riesgo y la seguridad alimentaria de estos productos son muchos y variados.

El futuro de los productos genéticamente modificados estará influenciado por cómo sea percibido por los miembros de la sociedad, es decir, los consumidores. Si una parte significativa de la sociedad percibe los productos genéticamente modificados como introductores de niveles de riesgo inaceptables dentro de sus vidas, y si los procesos utilizados para producirlos no son éticos, sería posible que las políticas públicas que se desarrollasen resulten barreras para el futuro de la investigación y el desarrollo de los alimentos genéticamente modificados.

Objetivos:

- Identificar los factores que influyen en la población española frente al consumo de alimentos modificados genéticamente.
- Valorar la percepción del consumidor frente a los alimentos modificados genéticamente.

Material y métodos:

- Encuesta para medir la actitud del consumidor frente a los alimentos modificados genéticamente .
- Muestra aleatoria de 520 individuos (34,5% hombres; 65,5% mujeres), con edades comprendidas entre los 15-84 años.
- Spss vs 12.0,

Discusión y resultados: Los resultados sobre el consumo de alimentos genéticamente modificados en la que las opciones de respuesta son (nunca, casi nunca, a veces, a menudo y diariamente), muestran como casi todos los consumidores afirman no consumirlos nunca o casi nunca. Entre los que afirman consumirlos, únicamente lo harían a veces.

Al analizar sobre la valoración que los consumidores conceden a los alimentos genéticamente modificados sobre su valor nutricional, su calidad y sus características organolépticas, todos los grupos de edad conceden a éstos un valor nutricional, una calidad y unas características organolépticas muy bajas, en una escala de 0 a 5 los valores se sitúan entre 1 y 2.

Aunque la mayor parte de la población afirma no haberlos consumido nunca o casi nunca, todos valoran negativamente estos alimentos. La valoración negativa de sus cualidades organolépticas en consumidores que afirman no consumirlos nunca refleja un gran desconocimiento y una actitud a priori muy negativa frente a este tipo de alimentos.