

MICROBIOLOGÍA

01 Relación entre los resultados metagenómicos de la microbiota fecal y la población real de microorganismos

Hevia A¹, Foroni E², Sánchez B¹, Bottacini F², Martín R³, Milani C², Gueimonde M¹, Ventura M², Margolles A¹

¹Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Paseo Río Linares s/n. 33300 Villaviciosa. Asturias. ²Laboratory of Probiogenomics, Department of Genetics, Biology of Microorganisms, Anthropology and Evolution. University of Parma, Parma, Italy. ³INRA, UMR 1319 MICALIS-Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé humaine, Pôle Ecosystèmes: Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte, Domaine de Vilvert, Bât 440 R-2 78352, Jouy en Josas, France.

El presente estudio se planteó con objeto de comprobar si los resultados que se obtienen por técnicas metagenómicas reflejan la población real de microorganismos en heces. Para ello, se contaminaron heces de ratas libres de gérmenes con una mezcla de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y con una arquea. Dicha mezcla incluyó cantidades conocidas de 10 cepas de las siguientes especies: *Bifidobacterium longum*, *Collinsella intestinalis*, *Blautia coccooides*, *Ruminococcus productus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli*, *Prevotella copri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Methanobrevibacter smithii*. Se utilizaron cuatro métodos diferentes de extracción de ADN de heces, basados en kits comerciales. Las muestras de ADN se emplearon para obtener amplificaciones del gen del ARNr 16S y los amplicones se secuenciaron utilizando un secuenciador Ion PGM. Los resultados obtenidos indican que algunas especies, como *F. prausnitzii*, *C. intestinalis* y *B. thetaiotaomicron*, se sobrestiman en este tipo de análisis, mientras que la proporción de otras, como *B. longum*, es mucho menor que la proporción real. Por otra parte, un tratamiento enzimático previo a la lisis de los microorganismos incrementa significativamente la proporción de bacterias Gram positivas, pero empeora la representatividad de los resultados obtenidos. Este estudio nos permite concluir que los análisis metagenómicos de la microbiota fecal generan resultados que presentan desviaciones muy importantes con respecto a la población real de los microorganismos presentes en heces.

05 The bifidogenic effect of galacto-oligosaccharides in rats is dependent on their structural characteristics

Marín-Manzano MC¹, Hernández-Hernández O², Rubio LA¹, Moreno FJ³, Sanz ML², Clemente A¹

¹Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain. ²Instituto de Química Orgánica General, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. ³Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), C/ Nicolás Cabrera, 9, Campus de Cantoblanco - Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

A comparative study to evaluate the resistance to gut digestion, fermentability and modulatory effect of gut microbiota in the

large intestine of growing rats (5 wk old) fed novel galacto-oligosaccharides (GOS) derived from lactulose (GOS-Lu) or commercially available derived from lactose (GOS-La) was performed. Rats were fed either a control (AIN-93G) or experimental diet containing 1% (wt:wt) of GOS-Lu or GOS-La for 14 d. Quantitative analysis of oligomers from dietary and ileal samples demonstrated that the trisaccharide fraction of GOS-Lu was significantly more resistant to gut digestion than that from GOS-La, whereas the disaccharide fraction of GOS-Lu was fully resistant to the extreme environment of the upper digestive tract. The low ileal digestibility rates of GOS-Lu was attributed to the great resistance of galactosyl-fructoses to mammalian digestive enzymes, highlighting the key role played by monomer composition and linkage type involved in the oligosaccharide chain. Di- and trisaccharides were completely fermented within the large intestine, enabling both GOS to have a potential prebiotic function. Indeed, the novel GOS-Lu exerted a stronger bifidogenic effect in large intestine than GOS-La, with the former having a significant and selective increase of *Bifidobacterium animalis*. In addition, both GOS types showed a significant increase in *Eubacterium rectale/Clostridium coccooides* population relative to control. These data support a direct relationship between patterns of resistance to digestion and bifidogenic properties of galacto-oligosaccharides¹.

Referencias:

- Hernández-Hernández O, Marín-Manzano MC, Rubio LA, Moreno FJ, Sanz ML, Clemente A. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affects their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *J Nutr* 2012; 142: 1232-1239.

07 Evaluación de características fenotípicas de relevancia probiótica para la elaboración de alimentos funcionales en cepas de *Lactobacillus* productoras de exopolisacáridos

Puertas A¹, Ibarburu I¹, Muñoz ME², Cervantes G¹, Gangoiti MV³, Prieto A⁴, Dueñas MT¹.

¹Dpto. de Química Aplicada, ²Dpto. de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Paseo Manuel de Lardizabal, 3, San Sebastián. ³Dpto. Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, 47 y 115 de La Plata, Argentina. ⁴Departamento de Biología Medioambiental, Centro Investigaciones Biológicas, (CSIC), Madrid.

Algunas bacterias lácticas producen exopolisacáridos (EPS), y están siendo utilizadas en la industria alimentaria con el fin de mejorar las características sensoriales y tecnológicas de varios productos fermentados. Además, se les ha atribuido a los EPS efectos beneficiosos para la salud humana.

En este trabajo se han estudiado 4 cepas procedentes de sidra ahilada, de las especies *Lactobacillus vini* (A19), *L. collinoides* (SN6) y *L. suebicus* (225 y 226). El análisis mediante HPLC-SEC de los EPS ha revelado que están constituidos por dos fracciones, una de alto peso molecular del orden de 10⁶ Da y otra del orden de 10⁴ Da. Los EPS son resistentes a degradación térmica, con capacidad de resistir ciclos de esterilización y temperaturas por encima de 200°C. En estas cepas se ha detectado la capacidad de formación de biofilm y se ha analizado la capacidad de adhesión al epitelio intestinal midiendo su hidrofobicidad en términos de adhesión a hidrocarburos. Estas cepas se han utilizado en la fermentación de tres matrices ali-

mentarias suplementadas con glucosa, detectándose crecimiento en leche (cepa A19), bebida de soja (A19 y SN6) y en la bebida de avena (todas las cepas). Los análisis reológicos han mostrado un aumento de viscosidad en las bebidas fermentadas. Finalmente, se ha evaluado la supervivencia al estrés gástrico y gastrointestinal de las cepas suspendidas en las tres matrices y en solución salina, evidenciándose efectos protectores de las matrices en los pHs más ácidos, así como en tratamientos que combinan pHs ácidos, sales biliares y enzimas digestivas.

11 Evaluación *in vitro* de la actividad prebiótica de galactooligosacáridos (GOS) puros comparados con una mezcla comercial de GOS

Rodríguez-Colinas B¹, Kolida S², Baran M², Ballesteros AO¹, Rastall RA², Plou FJ¹

¹Grupo de Biotatálisis Aplicada, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, 28049 Madrid (brcolinas@icp.csic.es)

²Food Microbial Sciences Unit, School of Chemistry, Food Biosciences and Pharmacy, University of Reading, Reading, UK

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos no digeribles con reconocida capacidad prebiótica, cuya síntesis a partir de lactosa puede ser catalizada por α -galactosidasas de distintos orígenes. No existen apenas estudios sobre la influencia del tipo de enlace glicosídico o del grado de polimerización de estos compuestos en su actividad prebiótica.

En nuestro trabajo, y empleando distintas α -galactosidasas, se purificaron una serie de GOS a partir de mezclas de reacción, concretamente 6-*O*-galactosil-lactosa, 4-*O*-galactosil-lactosa, y una mezcla de alolactosa y 6-galactobiosa. Se estudió su efecto en cultivos *batch* anaerobios inoculados con heces humanas, en los que se realizó control de pH, durante 24 horas. Los resultados se compararon con un GOS comercial (Bimuno[®]), que está formado por una mezcla heterogénea de carbohidratos. Los compuestos ensayados se caracterizaron mediante cromatografía HPAEC-PAD.

Se estudiaron los cambios en las poblaciones bacterianas utilizando sondas específicas mediante la técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*) y en la formación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *short chain fatty acids*).

Los sustratos ensayados aumentaron significativamente el número de bifidobacterias y lactobacilos. Los cambios en la producción de SCFA se correlacionaron con las variaciones en las poblaciones bacterianas. Para la comparación de los distintos GOS se utilizó el paquete estadístico SPSS (IBM).

12 Assessment of the fermentability of xylooligosaccharides from solid waste barley by different strains of *Lactobacillus*

Gullón B^{1*}, Cardelle-Cobas A¹, Gullón P, Tavaría F¹, Parajó JC^{2,3} and Pintado M¹

¹CBQF/ Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

²Department of Chemical Engineering, University of Vigo, Galicia, Spain

³CITI-Tecnopole, San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, Spain

*Corresponding author: Beatriz Gullón Estévez:

bgullon@uvigo.es/bgullon@ucp.porto.pt

The importance of human intestinal microbiota in maintaining host health is well known. Probiotics, prebiotics and the combination of these two components (synbiotic) can contribute to support an adequate balance of the bacterial population in the human large intestine. Xylooligosaccharides (XOS) show potential as ingredients for functional foods, and have been classified as "emerging prebiotics" owing to their potential for this type of applications, even if they still lack strong scientific evidence.

In this work, fermentations with five pure strains of *Lactobacillus* were carried out using purified XOS from spent waste barley as the sole carbon source. Bacterial growth was evaluated at 620 nm by means of a microplate reader during 48 h of incubation at 37°C. Maximum growth rates (μ_{max}) were calculated. Viable counts, metabolism products and pH evolution along 48 h were also evaluated as indicators of fermentation extension. In general, all the strains tested were able to utilize XOS when they were used as sole carbon source. For comparative purposes, additional experiments were carried out using FOS as positive control.

Different trends in the use of XOS according to the strain tested were found. All lactobacilli were able to grow in the medium supplemented with XOS, and it was also observed that some *Lactobacillus* strains showed higher growth rate in XOS than in FOS. These preliminary results confirm that XOS obtained from spent waste barley could be used to support the *in vitro* growth of selected lactobacilli strains.

Acknowledgements: Alejandra Cardelle-Cobas thanks Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) for a postdoctoral grant (EX2009-0061). Patricia Gullón and Beatriz Gullón was provided by postdoctoral fellowships ref. SFRH/BPD/79942/2011 and SFRH/BPD/79941/2011, respectively, issued by FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia).

17 Crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en preparados para lactantes en presencia de probióticos

García-Iborra M[®] R, Peso-Echarri P, González-Bermúdez CA, Martínez-Graciá C.

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo 30100, Murcia.

Cronobacter sakazakii es considerado un patógeno oportunista emergente que ha producido meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante en recién nacidos con bajo peso, inmunodeprimidos y prematuros menores de 36 semanas. Los preparados deshidratados para lactantes han sido relacionados con este microorganismo debido a su elevada osmotolerancia. Una propuesta para contrarrestar la acción del patógeno es la selección de probióticos específicos que puedan frenar el crecimiento del patógeno.

Se estudió el crecimiento de *Cronobacter sakazakii* inoculado (10^3 ufc/ml del producto final) a un preparado de continuación en polvo con y sin presencia de bacterias probióticas en una concentración de 10^7 ufc/ml (*Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus rhamnosus*). La inoculación se realizó una vez rehidratada la fórmula infantil con agua estéril, siendo almacenada a temperatura ambiente y a 37°C. El microorganismo patógeno no fue inhibido en el primer caso, pero a 37°C disminuyó significativamente su crecimiento a partir de las 24 h, no detectán-

dose tras 48 h de almacenamiento. Esta inhibición del crecimiento se relacionó claramente con una bajada muy acusada del pH del preparado lácteo por el crecimiento de los probióticos. El crecimiento y supervivencia de ambos probióticos cuantificados de forma conjunta fue semejante durante el almacenamiento a ambas temperaturas, sin embargo *Bifidobacterium infantis* creció de forma selectiva a 37°C en detrimento de *Lactobacillus rhamnosus*.

18 Incorporación de bacterias lácticas a recubrimientos comestibles

López de Lacey AM, López Caballero ME, Gómez Guillén MC, Montero P
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN (CSIC) C/ José Antonio Novais, 10. 28040 Madrid

Las películas y coberturas a base de gelatina obtenida a partir de piel de pescado (subproducto de la industria procesadora) constituyen una alternativa a la comúnmente utilizada gelatina de mamíferos, y es perfectamente adecuada para recubrimientos en productos del mar. La aplicación de recubrimientos es ventajosa ya que diversas sustancias antioxidantes y/o antimicrobianas pueden adicionarse a la formulación, mejorando su funcionalidad. En esta línea, la incorporación de bacterias lácticas a un recubrimiento comestible puede dar lugar a un envase potencialmente bioactivo, contribuyendo a la estabilidad de los alimentos. El objetivo del presente trabajo fue la aplicación de recubrimientos de gelatina con *Bifidobacterium animalis sub. lactis* a filetes de pescado y posterior evaluación de su actividad durante la conservación en refrigeración. También se aplicó alta presión isostática para ver el efecto de tratamientos combinados. Los resultados mostraron que si bien la presencia de bacterias reduce en cierta medida los índices asociados con el deterioro del pescado, este efecto es mayor cuando se aplica conjuntamente con alta presión.

19 Potencial probiótico y tecnológico de *Bifidobacterium infantis* INIA P737

Rodríguez E, Peiróten A, Arqués JL, Medina M
Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, Ctra. de la Coruña Km. 7, 28040 Madrid. minguez@inia.es

La cepa *Bifidobacterium infantis* INIA P737, aislada de leche materna, se ha seleccionado para estudiar *in vitro* distintas características probióticas y tecnológicas para su empleo potencial en la industria láctea. *B. longum* BB536 y *B. animalis* Bb-12, se incluyeron como cepas de referencia.

B. infantis INIA P737 sobrevivió al paso por el tracto gastrointestinal *in vitro* con descensos inferiores a los observados para *B. longum* BB536 a pH 2 en leche y presentó una capacidad alta para formar biofilms en presencia de un 0,2% de oxgall. *B. infantis* INIA P737 creció en leche a 37°C, alcanzando niveles superiores a los de las cepas comerciales estudiadas y produjo olor agradable a caramelo en la leche fermentada y "fenotipo ropy" en presencia de sacarosa. Su supervivencia a -80°C/21 d, a la liofilización y al almacenamiento del líofilo a 6°C/21d fue semejante o superior a la de las cepas comerciales de referencia. En leche, su población descendió 1,94 unidades logarítmicas tras el almacenamiento a 4°C/28 d en presencia de oxí-

geno, siendo su supervivencia superior a la observada en *B. longum* BB536.

Como conclusión, *B. infantis* INIA P737 es capaz de resistir el paso por el tracto gastrointestinal en leche y formar biofilms en presencia de oxgall, lo que favorece su potencial permanencia en el intestino. Es capaz de crecer en leche y sobrevivir en condiciones de refrigeración, liofilización y congelación por periodos prolongados, lo que sería de utilidad para su empleo en la industria láctea para el desarrollo de productos lácteos funcionales.

20 Evaluación de la actividad antimicrobiana de una combinación de probióticos frente a *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados para lactantes.

Candel-Pérez C, García-Alonso J, Martínez-Graciá C
Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo 30100, Murcia.

Los microorganismos *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* se han visto implicados en brotes de sepsias y meningitis en lactantes vinculados, en algunos casos, al consumo de fórmulas lácteas en polvo contaminadas. Además de su papel en la modulación de la microbiota intestinal, los probióticos añadidos a las fórmulas infantiles podrían desempeñar una acción importante contrarrestando la contaminación por patógenos, disminuyendo de este modo el riesgo de infección.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de una combinación de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium infantis* para inhibir el crecimiento de *C. sakazakii* y *S. enterica* en fórmulas lácteas reconstituidas. Para ello, las fórmulas (con o sin probióticos) se inocularon con *C. sakazakii* o *S. enterica* (10⁵ ufc/ml) y fueron incubadas a 30 o a 40°C durante 72 horas. Al inicio y tras 4, 16, 24, 48 y 72 horas se tomaron alícuotas de las fórmulas para sembrarlas en los medios de cultivo selectivos correspondientes y determinar el crecimiento de las diferentes bacterias estudiadas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la presencia de probióticos es capaz de inhibir el crecimiento de *C. sakazakii* pero ineficaz para inhibir el de *S. enterica*.

21 La proteínasa de pared celular de Lactobacilos es un factor de supervivencia con actividad antiinflamatoria

Bäuerl C¹, Coll Marqués JM¹, Monedero V¹, Zúñiga M¹, Hörmannspurger G², Haller D² y Pérez Martínez G^{1*}

¹Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia, Spain. ²Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Freising, Germany

Los probióticos encuentran en el hábitat intestinal una intensa competencia de otros microorganismos además de enfrentarse a un arsenal de proteínas con actividad antibacteriana secretadas por la mucosa como respuesta a estímulos proinflamatorios. Recientemente hemos demostrado que las proteínasas de pared contribuyen a explicar el efecto probiótico antiinflamatorio de ciertos Lactobacilos. Aquí, se compara la actividad proteolítica de diversas cepas de *Lactobacillus casei/paracasei*, *L. bulgaricus*, así como un probiótico comercial (VSL#3) y cepas

de *L. paracasei* con gran actividad proteolítica o en las que se ha inactivado el gen *prtP*. Los resultados confirman que la actividad de la proteinasa PrtP se correlaciona con la capacidad de la cepa para inactivar la quimioquina proinflamatoria IP10 en cultivos celulares. Además, el análisis del genoma de diversas cepas de *L. casei/paracasei* ha mostrado que esta especie también codifica dos proteinasas más de la misma familia, *prtR1* y *prtR2*, si bien se expresan con menor intensidad. Por tanto, los lactobacilos probióticos intestinales al hidrolizar citoquinas proinflamatorias por la acción de la proteinasa PrtP, de una parte mejoran sus posibilidades de supervivencia evitando la inducción de síntesis de proteínas con actividad antibacteriana en el epitelio, al tiempo que ejercen un claro efecto antiinflamatorio sobre el huésped.

27 Expression of genes implicated in mucus binding of *Lactobacillus pentosus* MP-10 “isolated from naturally-fermented aloreña green table olives” under different conditions

Abriouel H, Gálvez A, Redondo Punzano J, Martínez Cañamero M, Omar NB

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain.

Lactobacillus pentosus plays an important role in the preparation of many fermented foods, such as fermented milks, cheeses, breads, cereals, and vegetables, especially table olives. This bacterium has also been reported to elicit probiotic effects. Binding capacity is often the main criterion used to investigate the probiotic characteristics of bacteria. In this study, we focused on *L. pentosus* MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives. This bacteria exhibits several probiotic and nutritional properties, such as phytase, tannase, bile salt hydrolase, stackyose, raffinose degradation capacity, and antimicrobial activity against various pathogens, such as *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*. Annotated genome analysis of *L. pentosus* MP-10 revealed the presence of genes encoding surface proteins implicated in adherence to the intestinal mucosa like glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) reported in *L. plantarum* LA318 cells and which adhere tightly to human colonic mucin (Kinoshita *et al.*, 2008), adhesion exoprotein reported in *L. gasserii* 202-4, and type 4 prepilin protein reported in *L. plantarum* JDM1 which is involved in pilus formation and other functions. The expression of genes implicated in mucus binding was investigated by real time PCR under different conditions and the results obtained showed that the expression of most of the genes involved in mucus binding could be influenced by pH, temperature, salt concentration and also by mucin concentration. The data suggested that the regulation of the expression of genes implicated in mucus binding in *L. pentosus* MP-10 under different conditions occurred to ensure survival and colonization both in fermentation and stomach conditions.

32 *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels

Bosch M¹, Fuentes MC¹, Auidvert S¹, Bonachera MA¹, Peiró S², Cuñé J¹

¹AB-BIOTICS SA, Masia Can Fatjó del Molí, s/n, 08290, Cerdanyola del Vallès, Spain. ²Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. Av. Joan XXIII, s/n, 08028, Barcelona, Spain

Hypercholesterolemia holds a key role in the development and progression of coronary artery disease. There are two major sources of cholesterol in the human body: biosynthesis by the liver and absorption by the intestines. A recent and more effective therapeutic strategy is to treat both sources of cholesterol simultaneously. There are different drugs available to treat this condition but they are often expensive and can have undesirable side effects. This is the reason why the role of lactic acid bacteria to be used as probiotics to reduce cholesterol levels was investigated. Three *Lactobacillus plantarum* strains (CECT 7527, 7528 and 7529) were isolated and characterized. *In vitro* and *in vivo* tests were carried out in order to demonstrate their functionalities. All the strains showed high ability to survive at gastro-intestinal tract conditions and to adhere to intestinal cells. Regarding lipid metabolism, the strains especially when they were combined, showed a great production of bile salt hydrolase, the enzyme responsible for bile salt deconjugation during enterohepatic circulation of bile salts, which would reduce biosynthesis of cholesterol by the liver. Moreover, the strains assimilated cholesterol directly from the medium, which would indicate their ability to reduce dietary cholesterol. Part of the cholesterol present in the medium was removed via binding it onto the bacterial cellular surface. Finally, the three strains, but specially CECT 7529, produce large quantities of propionic and butyric acids. Combined, these characteristics confirm that these strains could be excellent candidates to reduce high blood cholesterol levels acting both in endogenous and dietary cholesterol.

33 Workflow of isolation and functional characterization of Ordesa’s probiotic strain collection

Cifuentes GC, Martín FJ, Rodríguez-Palmero M, Puigjaner J, Rivero M, Moreno JA.

Departamento de Investigación, Grupo Ordesa. Barcelona. Spain

The intestinal microbiota is an important factor for health and the evolution of diseases in humans and animals. For this reason efforts have focused in the use of different techniques to isolate and characterize bacteria with probiotic properties that could be used as preventive agents. This study describes the workflow followed by Ordesa Group to create its own probiotic strains collection by isolating more than two hundred probiotic strains from human samples, including human milk, and feces of breastfeeding mothers and their babies. The biodiversity of these strains was evaluated through several molecular biology techniques, including sequencing of the gene 16S RNA, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), and also biochemical tests, including API CH50 and API ZYM, catalasa test, oxidase test, aminopeptidase test, fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) activity and Gram strain.

The genetic data obtained has been used to elaborate phylogenetic trees to evaluate biodiversity, and the biochemical data has been used to improve phylogenetic trees by elaborating biodiversity dendograms in order to classify all Ordesa’s probiotics in groups of biodiversity. A clear representative probiotic strain has been identified for each biodiversity group. Currently

Ordesa is using all these representative probiotic strains in several *in vitro* and *in vivo* functional studies.

35 New prebiotics derived from lemon peel wastes: production and comparative evaluation of the prebiotic potential

Gómez B^{1,3}, Gullón B², Yáñez R^{1,3}, Alonso JL^{1,3*}, Parajó JC^{1,3}

¹Department of Chemical Engineering. Faculty of Science. University of Vigo (Campus Ourense). As Lagoas, 32004 Ourense, Spain. ²CBQF, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-072 Porto, Portugal. ³CITI-Tecnopole. San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, Spain.

Prebiotics are defined as non-digestible food ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon (mainly *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus sp.*). Due to the growing importance of prebiotic oligosaccharides, it is of interest to investigate the production of novel forms from readily available, renewable carbohydrate sources.

Lemon peel waste (LPW), a byproduct of the juice industry abundant in Spain among others, is rich in pectin and sugars. Pectin is a complex polysaccharide suitable as a starting material for obtaining a variety of non-digestible pectic-oligosaccharides (POS) with biological activity, including oligogalacturonides (OGalA), arabinooligosaccharides (AOS) and galactooligosaccharides (GaOS).

The aim of this work was the production of purified oligosaccharides mixtures from LPW by hydrothermal treatment. Under selected conditions POS mixtures rich in oligogalacturonides were obtained and their *in vitro* fermentability evaluated using fecal inocula. For comparative purposes, commercial prebiotics and lemon pectin were also included in this work.

36 Prebiotic potential of pectic oligosaccharides derived from sugar beet pulp

Gómez B^{1,3}, Gullón B², Martínez-Sabajanes M^{1,3}, Alonso JL^{1,3*}, Parajó JC^{1,3}

¹Department of Chemical Engineering. Faculty of Science. University of Vigo (Campus Ourense). As Lagoas, 32004 Ourense, Spain. ²CBQF, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-072 Porto, Portugal. ³CITI-Tecnopole. San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, Spain: xluís@uvigo.es

There is an increased interest on the production, evaluation and commercialization of new prebiotics with improved properties. Partial hydrolysis of pectin by chemical and/or enzymatic methods leads to the production of pectin-derived oligosaccharides (POS), which have been proposed as a new class of prebiotics.

This work deals with the production of pectin-derived oligosaccharides by hydrothermal treatment of sugar beet pulp (SBP) and the evaluation of their prebiotic potential.

Liquors containing mixtures of pectin-derived oligosaccharides were obtained by autohydrolysis of SBP and subjected to membrane processing to reduce the content of undesired compounds in the final product. As a result of the whole process, a refined product enriched in oligosaccharides (OS) was obtained with high selectivity (more than 99% of the main products were recovered).

The prebiotic potential of the refined product was then assessed by *in vitro* fermentation assays using fecal inocula. The consumption of oligosaccharides (OS), the generation of short chain fatty acids (SCFA) and the dynamics of selected bacterial groups (see below) were measured. As a result of the OS fermentation, significant increases of the populations were observed for *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Atopobium* and *Bacteroides-Prevotella*, but not for *C. histolyticum*. High amounts of SCFA were also generated in the medium, particularly acetic and butyric acids.

39 Caracterización de prebióticos mediante técnicas analíticas

Fernández-Arrojo L¹, Rodríguez-Colinas B¹, Santos-Moriano P¹, Poveda A², Jiménez-Barbero J³, Ballesteros AO¹, Plou FJ¹

¹Grupo de Biocatálisis Aplicada, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, 28049 Madrid (lucia@icp.csic.es). ²Servicio Interdepartamental de Investigación, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid. ³Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid

Los fructooligosacáridos (FOS), la inulina, los galactooligosacáridos (GOS) y la lactulosa han sido catalogados como prebióticos con el aval de numerosos estudios científicos. Además, otros carbohidratos como los isomaltooligosacáridos (IMOS), los xilooligosacáridos (XOS) o la polidextrosa se comercializan como prebióticos en determinados países como Japón. Los prebióticos presentan ciertas ventajas tecnológicas (que no poseen los probióticos): pueden ser fácilmente adicionados a los productos alimentarios al ser solubles en agua, tienen poder edulcorante, son resistentes a temperaturas elevadas y poseen buenas propiedades organolépticas.

La mayoría de los prebióticos comercializados son mezclas heterogéneas de carbohidratos, en los que varía su composición, el grado de polimerización y el tipo de enlaces glicosídicos presentes; además, los monosacáridos y disacáridos residuales del proceso de fabricación determinan su grado de pureza. Para los estudios de la actividad prebiótica *in vitro* e *in vivo*, es conveniente conocer en la mayor medida posible la composición de la mezcla ensayada.

Para la caracterización de estas mezclas complejas estamos utilizando diferentes técnicas instrumentales: cromatografía iónica de alta resolución con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD), cromatografía de interacción hidrofílica con detector evaporativo de *light-scattering* (ILICH-ELSD). Para la purificación de los carbohidratos no identificados mediante el empleo de compuestos estándar, es muy útil la cromatografía semipreparativa de alta resolución (HPLC semiprep). El grado de polimerización de los productos purificados lo determinamos mediante espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS). Para determinar su estructura nos valemos de la resonancia magnética nuclear (RMN) bidimensional.

En este trabajo se mostrarán los resultados obtenidos con algunos FOS y GOS, tanto comerciales como obtenidos en nuestro laboratorio.

46 Aplicaciones “ómicas” en los avances en probióticos

Jiménez-Martín V, Jiménez-Pranteda ML, Aguilera M*

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. INYTA-CIBM. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimen-

tos. Centro de Investigación Biomédica. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Granada.

Los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para el huésped". Los estudios de investigación realizados sobre los probióticos y microbiota intestinal en los últimos años se han centrado en investigar la correlación entre las características moleculares específicas y su influencia en el estado de salud de los individuos. Muchos retos presentes y futuros se plantean para elucidar las bases moleculares de la interacción entre microorganismos probióticos y su hospedador que median efectos sistémicos de interés, junto con la posibilidad de realizar intervenciones nutricionales preventivas y terapéuticas específicas. Por otra parte, la evolución paralela de tecnologías "ómicas", con aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina, están siendo eficientemente transferidas a esta área de la microbiología molecular.

El presente trabajo recopila las aplicaciones "ómicas" generales y útiles: genómica, metagenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, fenómica y, recientemente integrómica e interactómica y sus aplicaciones posibles en modelos clínicos de interacciones de los microorganismos probióticos más estudiados, especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, con el hospedador humano.

Estas herramientas están generando grandes cantidades de datos que, una vez correctamente interpretados, se espera que mejoren y profundicen rápidamente en el conocimiento de fundamentos moleculares de los probióticos que desencadenan importantes procesos biológicos humanos, que actualmente no están claros.

El presente trabajo muestra la aplicación de tecnologías ómicas para explicar los efectos de los probióticos beneficiosos.

47 Estudio de la capacidad DAO-diamino oxidasa- de bacterias probióticas

Latorre ML¹, Relat J², Veciana T¹, Bosch J¹, Haro D², Marrero PF², Vidal MC¹.

¹Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, E-08028, Barcelona, España. ²Departamento de Nutrición y Bromatología. Campus de l'Alimentació de Torribera. Universidad de Barcelona. Avda. Prat de la Riba 171, E-08921, Barcelona, España

La histamina es una amina biológicamente activa, con numerosas funciones fisiológicas, y que se encuentra también en muchos alimentos. La histamina de los alimentos se metaboliza rápidamente a compuestos inactivos por el enzima diamino oxidasa (DAO) intestinal. La intolerancia a la histamina es un síndrome clínico provocado por la capacidad reducida de metabolizar la histamina exógena (2-3% población) debido a la baja actividad DAO de algunos individuos por causas genéticas, patológicas o farmacológicas. Este trastorno cursa normalmente con síntomas digestivos y cutáneos, y también puede estar relacionado con la aparición de crisis migrañosas.

Las bacterias probióticas podrían aportar enzima DAO a nivel intestinal que ayudaría a metabolizar la histamina exógena

reduciendo el riesgo de sufrir los síntomas asociados a la intolerancia histamínica.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la capacidad de reducir la histamina (actividad DAO) en cepas de bacterias lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*) aisladas de leches fermentadas.

De las cepas ensayadas, sólo la del probiótico *L. casei* mostró capacidad para reducir el contenido de histamina in vitro (24,3%). Para esta cepa se amplificó y posteriormente clonó en un vector de expresión (pRSET) la región del genoma potencialmente responsable de la actividad DAO (LCA2H_2383). Sin embargo, cuando se ensayó la actividad de este enzima *in vitro* no se observó degradación de histamina. Por tanto, se considera que la enzima responsable de la degradación de histamina no se encuentra en el ADNc, probablemente debido a que es una actividad localizada en un plásmido. Esta hipótesis está también en consonancia con el hecho de que la actividad amino oxidasa parece ser cepa dependiente.

Se necesitan más estudios para confirmar la hipótesis de que la actividad DAO se encuentra en un plásmido. Este conocimiento podría ser útil para identificar probióticos funcionales con capacidad de reducir los síntomas de la intolerancia histamínica.

56 Evaluación del crecimiento de bacterias lácticas con propiedades probióticas en diferentes sustratos y su importancia en la salud humana

Montoya Campuzano OI, Salazar BC
Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín

El grupo de Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín, ha venido trabajando con probióticos, aislados con diferentes sustratos fermentados como: leche, col, fresas y de la vagina de una mujer sana, se comprobó su capacidad probiótica a pH de 2,5 y de 3%. Se aislaron, purificaron e identificaron con el kit API 50 CHLB, 11 cepas, entre ellas *Lactobacillus L. plantarum*, *L. brevis*, con los que se elaboró una bebida de avena fermentada, masas ácidas. Se observó actividad antibacteriana frente a *Salmonella* sp, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, siendo *L. plantarum* LPBM10 más efectivo. La bacteriocina se purificó y se caracterizó químicamente como péptido, siendo altamente termolabile y con mayor actividad a pH ácido sin afectar la presencia de proteinasa K, agentes quelantes o detergentes. Con el extracto crudo se observó una mayor vida útil en el queso antioqueño, filetes de Cachama y solomo redondo empacado al vacío. Se observó la viabilidad a *L. plantarum* LPBM10 en pulpa de uchuva, en uchuvas deshidratadas. Con dos tipos de gránulos de kéfir uno de consumo colombiano y el otro peruano, se ha estudiado su viabilidad en aguadepanela 37°C /8 horas, y caracterizado bioquímicamente sus aislados. Se pretende obtener un alimento funcional con la miel panelera mas probióticos de fácil acceso a los niños de bajos recursos con un alto índice de desnutrición. Se han inoculado a diferentes concentraciones de miel y gránulos, a distintas temperaturas, y días de inoculación, obteniéndose una excelente viabilidad tanto en el jugo como después de un proceso de secado.

61 Actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas sobre el desarrollo y toxigenénesis de *Clostridium botulinum* aislados de casos de botulismo del lactante

Fernández RA¹, Carbone ML¹, de Jong LIT¹, Pareja V¹, Sánchez ML²

¹Facultad de Ciencias Médicas (Área Microbiología) y ²Facultad de Ciencias Agrarias (Área Enología), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina: rafa.fernandez@fcm.uncu.edu.ar

El botulismo del lactante (BL) es una toxoinfección que se produce en menores de un año por colonización intestinal de *C. botulinum* (Cb) y toxigenénesis *in situ*. La toxina actúa principalmente en la placa mioneural bloqueando la liberación de acetilcolina con parálisis flácida y muerte por paro respiratorio. La exposición ambiental es una de las principales causas de ingreso de esporas a partir del suelo, su principal reservorio. Es probable que la colonización se deba, entre otras causas, a que la microbiota intestinal no ofrezca eficaz competencia al patógeno. Se estudió la inhibición *in vitro*, del desarrollo (ID) en agar MRS y toxigenénesis en caldo MRS, de cepas de Cb por bacterias ácido-lácticas (BAL). Se utilizaron 30 cepas de Cb de casos de BL seleccionándose 10 por toxigenicidad, y 9 de BAL de alimentos, suplemento dietario y formulaciones farmacéuticas. Por ID se eligieron las 5 cepas de Cb y 3 de BAL que exhibieron mayores halos de inhibición. En ensayos finales se utilizaron los 2 Cb y 2 BAL que en cocultivo en medio líquido revelaron mayor interferencia de la toxigenénesis demostrada por los tiempos de muerte de los animales inoculados. En las pruebas finales, con cocultivos en proporciones variables de Cb y BAL, las titulaciones de toxina (DL₅₀/ml) luego de incubar mostraron reducción significativa de los niveles de toxina (2 a 6 log), respecto a Cb en monocultivo. Estos resultados justifican evaluar la administración de probióticos a niños menores de 1 año de vida en la prevención del BL.

66 Efecto probiótico *in vitro* de cepas de *Bifidobacterium* en muestras fecales de niños prematuros

Arboleja S¹, Salazar N¹, Fernández N², Solís G², Margolles A¹, de los Reyes-Gavilán CG¹, Gueimonde M¹.

¹Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. IPLA-CSIC, Villaviciosa. ²Servicio de Pediatría, Hospital de Cabueñes, SESPA, Gijón. ³Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Central de Asturias, SESPA, Oviedo.

El establecimiento de la microbiota intestinal comienza con el nacimiento y juega un papel esencial en el desarrollo del intestino, sistema inmune y futura salud del individuo. El perfil microbiano de los niños nacidos a término, por parto vaginal y alimentados exclusivamente por leche materna (TLM) es el estándar de salud y es referencia para el desarrollo de fórmulas infantiles. Los niños prematuros tienen un retraso en el establecimiento y desarrollo de dicha microbiota debido a la edad gestacional, tiempo de estancia en el hospital, alimentación por fórmula, etc., por lo que constituyen una de las poblaciones que más se pueden beneficiar de la aplicación de probióticos desde sus primeros días de vida. En este estudio se ha llevado a cabo un análisis de la microbiota fecal de niños prematuros, por diferentes técnicas independientes de cultivo durante los tres primeros meses de vida y se ha visto una serie de alteraciones respecto a los TLM, que han marcado objetivos de modulación por la acción probiótica. Posteriormente, se probaron 16 cepas de *Bifidobac-*

terium en un modelo de cultivo en discontinuo para determinar su capacidad de contrarrestar dichas alteraciones. Tres cepas de *B. bifidum* aisladas de heces de niños y dos cepas de *B. breve* aisladas de leche materna, proporcionaron los cambios más favorables tanto en las poblaciones microbianas como en el perfil de ácidos grasos de cadena corta analizados. Dichas cepas pueden ser claras candidatas para continuar con su estudio en modelos más complejos con el fin de incluirlas en leches de fórmula para niños prematuros. Finalmente, nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo en el intestino inmaduro de los niños prematuros podría constituir también una diana importante para el desarrollo de estrategias de modulación del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal en estos niños.

67 Cepas de Lactobacilos y Bifidobacterias intestinales que deconjugan isoflavonas: ¿probióticos para la menopausia?

Delgado S, Noriega A, Cuesta I, Flórez AB, Mayo B.

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

Las isoflavonas son fitoestrógenos vegetales con potencial terapéutico, ya que poseen estructura y propiedades similares a los estrógenos humanos. En la naturaleza, las isoflavonas se encuentran en su mayor parte conjugadas con residuos de azúcares. En el intestino los componentes de la microbiota intestinal participan, fundamentalmente mediante sus actividades β -glucosidasa, en la liberación de las agliconas, compuestos más absorbibles y con mayor actividad estrogénica que las formas conjugadas.

En este trabajo se ha estudiado la actividad β -glucosidasa de una colección de Lactobacilos y Bifidobacterias intestinales y su capacidad para deconjugar isoflavonas. La actividad β -glucosidasa se puso de manifiesto mediante distintos ensayos colorimétricos. En cepas seleccionadas se cuantificó la actividad en varias fracciones celulares tras crecimiento en sustratos inductores. En una cepa de *Bifidobacterium pseudocatenolatum* se investigó a nivel molecular el/los enzima/s responsable/s mediante zimografía y prospección de determinantes génicos en su genoma. El estudio de la deconjugación de isoflavonas se llevó a cabo mediante crecimiento de las cepas en presencia de precursores purificados, y los derivados activos se identificaron y cuantificaron por medio de TLC y HPLC. La conversión de isoflavonas se corroboró en leches comerciales de soja.

Como resultado del trabajo, se han seleccionado tres cepas de lactobacilos con buena capacidad para transformar los β -glucósidos de las isoflavonas y se han protegido bajo patente de invención (P201230152). Estas cepas podrían ser de interés en el diseño de alimentos funcionales a base de soja para el tratamiento y la prevención de los síntomas asociados a la menopausia.

68 Empleo de la técnica MALDI-TOF/TOF para la identificación taxonómica bacteriana y la diferenciación de cepas productoras de bacteriocinas

García-Cayuela T^{*}, Martínez-Cuesta MC, Barroso E, Bustos I, Peláez C, Requena T

Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM), CEI UAM+CSIC, Madrid, España: tomas.garcia@csic.es

La identificación taxonómica bacteriana basada en el perfil peptídico obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF es un método extremadamente rápido, sencillo y fiable, en comparación con otros métodos microbiológicos utilizados. Este método puede diferenciar más allá del nivel de especie, pudiéndose caracterizar las cepas a nivel de funcionalidad. Con objeto de validar y completar las identificaciones taxonómicas de nuestra colección de bacterias lácticas se utilizó la técnica MALDI-TOF/TOF empleando el programa de análisis Biotyper. Además, se empleó esta técnica para detectar en las cepas identificadas características probióticas de interés, como la producción de bacteriocinas.

Entre las cepas analizadas, los géneros mayoritarios identificados fueron *Lactobacillus* y *Lactococcus*. La correlación entre la identificación taxonómica mediante técnicas microbiológicas y bioquímicas y la técnica MALDI-TOF/TOF fue variable, dependiendo del grado de caracterización previo de las cepas. Asimismo, la fiabilidad de esta técnica para la identificación taxonómica a nivel de especie fue equivalente a la obtenida por secuenciación del gen 16sRNA. Por otro lado, se compararon los espectros peptídicos obtenidos entre cepas isogénicas de *Lactococcus lactis* que se diferencian en la capacidad de producir la lacticina 3147. La aparición de dos picos en los espectros de masa molecular 2850 Da y 3300 Da nos permitió detectar la producción de esta bacteriocina por las cepas analizadas. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la técnica MALDI-TOF/TOF no sólo para la identificación taxonómica sino para facilitar la evaluación del potencial beneficioso de bacterias probióticas.

69 Capacidad de *Lactobacillus plantarum* IFPL935 para favorecer el metabolismo colónico de flavan-3-oles

Barroso E, Van de Wiele T, Sánchez-Patán F, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV, Peláez C, Requena T, Martínez-Cuesta MC*
 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), (CSIC-UAM), CEI UAM-CSIC. C/ Nicolás Cabrera, 9, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049, Madrid, España
 *carmen.martinez@csic.es

La importancia de los polifenoles y en concreto de los flavan-3-oles en la salud está firmemente apoyada por distintos estudios científicos. La bioactividad de estos compuestos depende de su biodisponibilidad, absorción y metabolismo en el individuo. Así, la microbiota intestinal juega un papel esencial al transformar estos compuestos fenólicos en metabolitos con distinta bioactividad y significación fisiológica. La degradación bacteriana de los polifenoles se ve asimismo afectada por los efectos antibacterianos inherentes a estas moléculas.

Estudios previos *in vitro* realizados con incubaciones estáticas de cepas bacterianas puras han mostrado la capacidad del género *Lactobacillus* para crecer en presencia de extractos polifenólicos ricos en flavan-3-oles. *L. plantarum* IFPL935 mostró además el potencial enzimático necesario para metabolizar ciertos monómeros de flavan-3-oles y derivados galilados. Esta cepa destaca por la actividad enzimática, sólo descrita en ciertas bacterias intestinales, que inicia la rotura del anillo heterocíclico de monómeros de flavan-3-oles produciendo el difenilpropan-2-ol correspondiente. En este trabajo se ha evaluado el papel de *L. plantarum* IFPL935, como integrante de la microbiota intestinal, en el metabolismo de flavan-3-oles. Así, se han realizado incubaciones *in vitro* de IFPL935 y un extracto polifenólico de vino, junto

con una microbiota representativa de las distintas regiones del colon desarrolladas en un simulador de la microbiota intestinal humana (SHIME). Los metabolitos polifenólicos se determinaron por cromatografía líquida (UPLC).

Los resultados han mostrado que *L. plantarum* IFPL935 aumenta significativamente la producción de difenilpropan-2-ol, confirmando que aún en presencia de una microbiota colónica compleja esta cepa puede iniciar el metabolismo de los flavan-3-oles hacia metabolitos con mayor significación biológica.

72 Actividad anti-*Listeria* de *Enterococcus faecium* LJx4, un potencial probiótico aislado de leche materna, y su influencia en el aroma de quesos frescos

Cárdenas N¹, Peirotén A², Calzada J², Rodríguez JM¹, Medina M², Fernández L¹

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

Los enterococos están presentes de forma natural en muchos productos lácteos, donde juegan un papel fundamental en la maduración y el desarrollo del *flavour* de los mismos. Además, después de los lactobacilos, los enterococos son las bacterias que se emplean con mayor frecuencia como probióticos. Sin embargo, su empleo es controvertido debido a que algunas cepas pertenecientes a este género están dotadas de factores de virulencia propios de patógenos oportunistas y pueden presentar resistencia a antibióticos. Por otra parte, en los últimos años se ha descrito que *Enterococcus faecium* es una especie comensal habitual en la microbiota de la leche de mujeres sanas.

Dada la competitividad de los enterococos, este trabajo tuvo como objetivo investigar la utilidad en la industria láctea de *E. faecium* LJx4, una cepa aislada de leche materna con potencial probiótico y carente de determinantes de virulencia. Para ello, se evaluó su eficacia como cultivo bioprotector para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* SA1 en leche en polvo reconstituida y en queso, así como su contribución al desarrollo del aroma en queso mediante el análisis de los compuestos volátiles por SPME-GC/MS. La presencia de *E. faecium* LJx4 disminuyó en 3 unidades logarítmicas la presencia de *L. innocua* SA1 en sustratos lácteos, en relación al control, y aumentó significativamente la concentración de 2-propanona, etanol y acetoina, compuestos que tienen una incidencia positiva en el aroma de los quesos. En conclusión, *E. faecium* LJx4 tiene potencial para ser empleada como cultivo bioprotector y/o adjunto en la elaboración de queso.

73 Evaluación de *Lactobacillus plantarum* para optimizar la biodisponibilidad de flavanonas de zumos cítricos

García-Cayuela T¹, Bustos I^{1*}, Barroso E¹, Vallejo F², Tomás M², Martínez-Cuesta MC¹, Peláez C¹, Tomás-Barberán FA², Requena T¹

¹Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM), CEI UAM-CSIC, Madrid, España. ²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura CEBAS (CSIC), Murcia, España.

*irene.bustos@csic.es

Las flavanonas de los cítricos constituyen uno de los principales grupos de polifenoles ingeridos en la dieta de los países

desarrollados a través del consumo de frutos cítricos en fresco y de zumos. La biodisponibilidad de estas flavanonas es relativamente baja y está afectada por su solubilidad y metabolismo. Así, la microbiota intestinal juega un papel esencial en la biotransformación de las flavanonas mediante actividades ramnosidasas y glucosidasas hasta metabolitos con mayor biodisponibilidad. En este estudio se ha llevado a cabo la evaluación del metabolismo de flavanonas de zumo de naranja por microorganismos productores de ramnosidasas y glucosidasas.

Se realizó el análisis de actividades β -glucosidasa y α -L-ramnosidasa en 20 cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias, encontrándose solo actividad α -L-ramnosidasa en *Lactobacillus plantarum* y algunas cepas de *Lactobacillus casei*. Las cepas que tenían actividad α -L-ramnosidasa también fueron positivas para la actividad β -glucosidasa. *L. plantarum* IFPL935 destacó como la cepa con las mayores actividades enzimáticas estudiadas por lo que se evaluó su capacidad para metabolizar naringina, rutina, hesperidina y neohesperidina. Los resultados reflejaron la capacidad de *L. plantarum* IFPL935 para formar hesperetina y quercetina a partir de hesperidina y rutina, respectivamente. La transformación de flavanonas a compuestos más biodisponibles también se observó tras la incubación de *L. plantarum* IFPL935 en zumo de mandarina.

La capacidad metabólica de *L. plantarum* IFPL935 frente a diversos compuestos polifenólicos avala la evaluación de esta cepa como probiótico para aumentar la biodisponibilidad y la actividad biológica a nivel sistémico de estos compuestos.

77 Galactosylated derivatives of chitosan obtained through amide formation: influence on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth

Cardelle-Cobas A¹, Ruiz-Matute A², Martins M¹, Tavaría FK¹, Pintado MME¹, Corzo N^{2*}

¹Centro de Biotecnología e Química Fina (CBCF)/Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Dr. António Bernardino de Almeida, P-4200-072 Porto, Portugal. ²Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. CIAL (CSIC-UAM). Nicolás Cabrera 9, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. *nieves.corzo@csic.es

Glycosylation of chitosan with lactobionic acid (LA) through amide formation gives rise to branched derivatives with modified properties compared to that of native chitosan. LA is resistant to digestive enzymes, being fermented by the intestinal flora. On the other hand, chitosan presents antimicrobial properties due to the presence of free amino groups. In this sense, chitosan modification with LA could give rise to derivatives with lower antimicrobial activity and new properties. In this work, the effect of chitosan-LA derivatives on *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. growth has been studied. Furthermore, the influence of molecular weight (MW) and substituted amino groups on chitosan fermentability has been evaluated.

Chitosan derivatives, with different molecular weights (MW) (140 and 9 kDa) but with similar degree of substitution (DS \approx 15%) were prepared. Fermentations with pure strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were carried out using the purified derivatives as the sole carbon source, and bacterial growth was evaluated at 620 nm.

Galactosyl chitosan derivatives with higher MW (140 kDa) were not used as carbon source by the bacteria whereas those with lower MW (9 kDa) were fermented by the strains tested. Chitosans used as controls were not used by the tested bacteria. This

indicates that modification with LA could be a new way to obtain fermentable carbohydrates based on chitosan. However, special attention must be paid to large molecules since they do not seem to be fermented by the bacteria. Although more studies are necessary to further prove their possible prebiotic effect, this study could constitute a first step to amplify chitosan use as a functional ingredient.

Acknowledgements: This work was financed under the projects AGL 2008-00941/ALI, Consolider Ingenio 2010, Fun-C-Food, CSD2007-00063, Ana I. Ruiz-Matute thanks her JAE Doc contract from CSIC. Alejandra Cardelle-Cobas thanks Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECyT) for a postdoctoral grant (EX2009-0061).

78 Effect of pH upon viability of probiotic strains when in contact with fruit pulps

Rodrigues C¹, Sousa S¹, Pinto A¹, Brandão T¹, Silva J¹, Pintado M¹, Silva C¹, Morais A¹, Teixeira P¹, Gomes A¹, Almeida D^{2,3*}

¹CBQF-Escola Superior de Biotecnologia-Universidade Católica Portuguesa-ESB/UCP, Porto, Portugal. ²Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal. ³Frulact, Maia, Portugal.

*dalmeida@fc.up.pt

In recent years many probiotic-containing products have been developed, being dairy and dried products the main vehicles for probiotic intake. Fruit juices have also been studied, with less good results, probably due to their low pH values, as well as to the presence of other components, adverse to the survival of the probiotic strains. In order to pinpoint possible reasons therefore, in this study we tried to evaluate the effect of the fruit pulp pH upon the survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* BB-12. Two fruit pulps, with different pH values, were used, namely lemon (pH=2.5) and avocado (pH=6.5), and their pH was adjusted (to 2.5, 4.5 and 6.5), in order to access the effect upon probiotic survival over one week storage. Viability was evaluated at 0, 3 and 7 days. Results showed that, although the pH value is indeed important, it is not the only reason for low viability of probiotics when incorporated in fruit pulps. Viability was, as expected, the highest when the pulps had a pH value of 6.5. At 4.5, avocado still had considerable viable cell numbers after one week contact with the pulp, while for lemon, at the same pH, no probiotics were detected after 3 days. At 2.5, for both pulps, no viable cells were detected after only 3 days. These results indicate that, although pH is important, other constituents of the fruits are also responsible for the degree of survival of probiotics in fruit matrices.