

## Exopolisacáridos de bacterias lácticas, ¿me quieren o no me quieren?

Rosa Aznar<sup>1</sup>, M. Teresa Dueñas<sup>2</sup>, Rufino Jiménez<sup>3</sup>, Paloma López<sup>4</sup> y Patricia Ruas-Madiedo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>, Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia /Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia, Avda. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia ([rosa.aznar@uv.es](mailto:rosa.aznar@uv.es))

<sup>2</sup>, Departamento de Química Aplicada, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizabal 3, 20018 San Sebastián ([mariateresa.duenas@ehu.es](mailto:mariateresa.duenas@ehu.es))

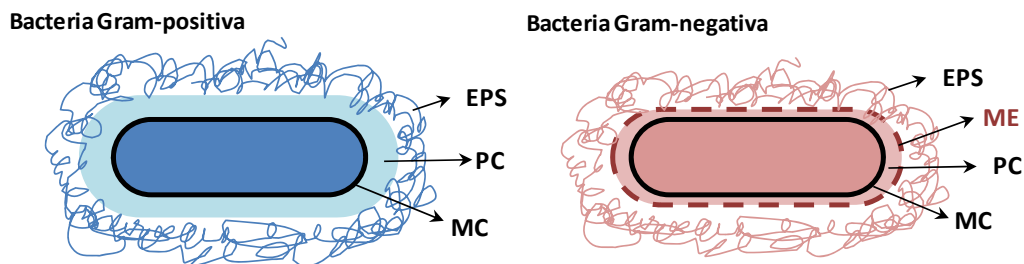
<sup>3</sup>, Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (IG)-CSIC. Avda. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla ([rjimenez@cica.es](mailto:rjimenez@cica.es))

<sup>4</sup>, Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid ([plq@cib.csic.es](mailto:plq@cib.csic.es))

<sup>5</sup>, Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)-CSIC. Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias ([ruas-madiedo@ipla.csic.es](mailto:ruas-madiedo@ipla.csic.es))

### ¿Qué son los exopolisacáridos de bacterias lácticas?

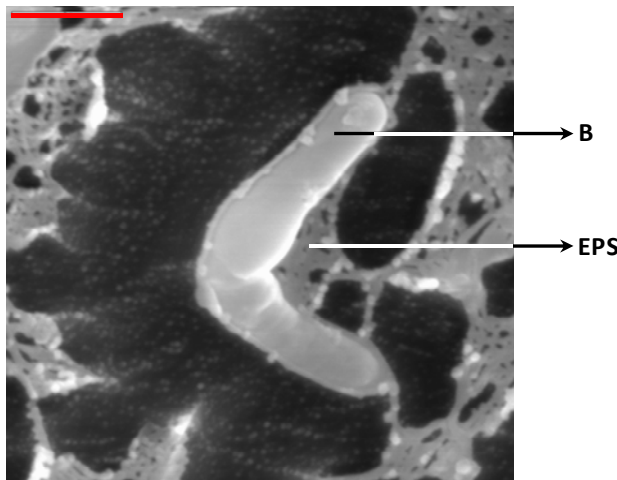
Las bacterias lácticas y las bifidobacterias se incluyen dentro de las bacterias Gram-positivas las cuales, tras aplicar el método de tinción diferencial desarrollado a finales del XIX por Christian Gram, mantienen el colorante primario (azul) y se distinguen de las Gram-negativas que pierden el color primario y se tiñen con el colorante secundario (rojo) debido a la diferente composición y organización estructural de su superficie (Figura 1).



**Figura 1:** Representación esquemática de la superficie de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. MC: membrana celular, PC: pared celular, ME: membrana externa, EPS: exopolisacáridos.

Fotografías de microscopio electrónico de transmisión muestran que externamente a la membrana celular, las bacterias Gram-positivas presentan una única capa de grosor variable (10 a 80 nm; 1 nm = 0,000001 mm) de pared celular compuesta por peptidoglicano (un polímero de carbohidratos unidos mediante cadenas de péptidos) de la cual pueden sobresalir otras estructuras (por ejemplo, polisacáridos tipo ácidos teicoicos o proteínas tipo “pili”). Sin embargo en las Gram-negativas se distinguen dos capas finas, una de ellas es una delgada capa de peptidoglicano y rodeándola se localiza la membrana externa de la que sobresaldrían también otros tipos de estructuras. Además, ambos tipos de superficies bacterianas pueden estar rodeadas de otra capa más externa constituida por polímeros de monosacáridos; son los polisacáridos exocelulares o **exopolisacáridos (EPS)**.

Los EPS bacterianos pueden estar organizados estructuralmente de forma compacta, formando una cápsula que presenta uniones muy fuertes a otros componentes de la superficie celular y permanece unida a la misma. Generalmente estas cápsulas polisacáridicas (CPS) se detectan como zonas claras que rodean a la bacteria cuando ésta se visualiza al microscopio óptico mediante tinción negativa (tinta China, por ejemplo). Sin embargo, otros tipos de EPS no tienen una organización tan compacta y se mantienen unidos de forma débil a la superficie celular o son liberados al medio extracelular formando una matriz de EPS, la cual es de grosor más o menos variable según la solubilidad en el agua del polímero que la compone (Figura 2). Atendiendo a su composición química



**Figura 2:** Cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B) rodeada de una matriz de EPS visualizada mediante microscopía electrónica de barrido cryo-SEM. Barra 2  $\mu\text{m}$ .

y a su modo de síntesis, los EPS de bacterias lácticas se dividen en homopolisacáridos (HoPS) los cuales están compuestos por un único tipo de monosacárido y hay un único enzima implicado en su síntesis, y los heteropolisacáridos (HePS) que están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, que pueden llevar unidos otras moléculas, y en su síntesis y polimerización están implicados varios enzimas. Estos están codificados por genes que se encuentran agrupados en el genoma.

Según el tipo de monosacárido presente, los HoPS se subdividen en fructanos (compuestos por fructosa) y glucanos (compuestos por glucosa). Según el tipo de enlace ( $\alpha$  o  $\beta$ ) y la posición que ocupa el carbono del enlace principal, existe una gran variedad de polímeros que reciben distintos nombres y son producidos por distintos miembros de las bacterias lácticas (Tabla 1) aunque, hasta el momento, no se ha descrito ninguna bifidobacteria productora de HoPS. Los enzimas implicados en la síntesis de  $\beta$ -fructanos y de  $\alpha$ -glucanos son miembros de la familia de las glicosil-hidrolasas (GH), específicamente fructansacarasas (familia GH68) y glucansacarasas (familia GH70, según la clasificación de la web CAZY “Carbohydrate-Active Enzymes”: <http://www.cazy.org>). Utilizando el disacárido sacarosa [ $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranósido] como sustrato estos enzimas transfieren una glucosa o una fructosa a un  $\alpha$ -glucano o un  $\beta$ -fructano en formación, respectivamente. Estos enzimas llevan a cabo la polimerización de los HoPS en el exterior de la bacteria productora. En el caso de los  $\beta$ -glucanos, la síntesis del polímero es llevada a cabo por otro tipo de

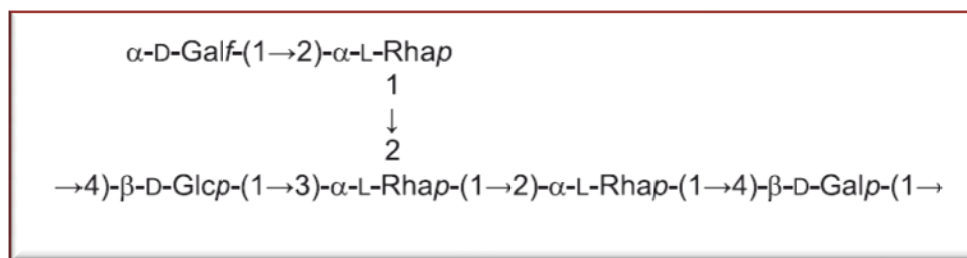
enzima denominado glicosiltransferasa (GTF) mediante un mecanismo que aún no ha sido completamente elucidado.

**Tabla 1.** Tipos más frecuentes de homopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.

HoPS	Enlace predominante ( $\geq 50\%$ )	Ejemplos de especies productoras
<b><math>\alpha</math>-glucano</b>		
Dextrano	$\alpha$ -D-Glucp (1 $\rightarrow$ 6)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus parabuchneri</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus salivarius</i>
Mutano	$\alpha$ -D-Glucp (1 $\rightarrow$ 3)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus downei</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>
Aternano	$\alpha$ -D-Glucp (1 $\rightarrow$ 6) / $\alpha$ -D-Glucp (1 $\rightarrow$ 3)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Reuterano	$\alpha$ -D-Glucp (1 $\rightarrow$ 4)	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<b><math>\beta</math>-glucano</b>		
	$\rightarrow 3)[\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$	<i>Lactobacillus diolivorans</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>Oenococcus oeni</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<b><math>\beta</math>-fructano:</b>		
Levano	$\beta$ -D-Frup (2 $\rightarrow$ 6)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Streptococcus sobrinus</i> <i>Streptococcus salivarius</i>
Tipo Inulina	$\beta$ -D-Frup (2 $\rightarrow$ 1)	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Streptococcus mutans</i>

En el caso de los HePS, los monosacáridos que se encuentran de forma más habitual, tanto en bacterias lácticas como en miembros del género *Bifidobacterium*, son glucosa, galactosa y ramnosa. También se detectan con cierta frecuencia monosacáridos N-acetilados (N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina) y, de forma poco abundante, fucosa y manosa. Estos azúcares pueden a su vez estar modificados por otros componentes orgánicos o inorgánicos (acetilo, glicerol, fosfato, etc). Cada HePS está constituido por unidades repetitivas formadas por distintas combinaciones de los componentes descritos anteriormente. En general, estas unidades repetidas se caracterizan por tener una estructura monosacáridica central de la que pueden salir cadenas laterales, presentándose múltiples combinaciones (en función del tipo de enlace y posición del carbono, así como de

la posición que ocupa el carbono del enlace de la cadena lateral). Por ello, hasta la fecha se han descrito numerosas unidades repetidas compuestas desde 2 a 8 monosacáridos y se están describiendo continuamente nuevas estructuras. A modo de ejemplo ilustrativo, en la Figura 3 se muestra la unidad repetida de uno de los EPS (de alto peso molecular, aproximadamente  $1 \times 10^6$ Da) sintetizado por la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 [Leivers S., Hidalgo-Cantabrana C., Robinson G., Margolles A., Ruas-Madiedo P. y Laws A. (2011) *Carbohydrate Research*, **346**, 2710-17].



**Figura 3:** Estructura del HePS sintetizado por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1.

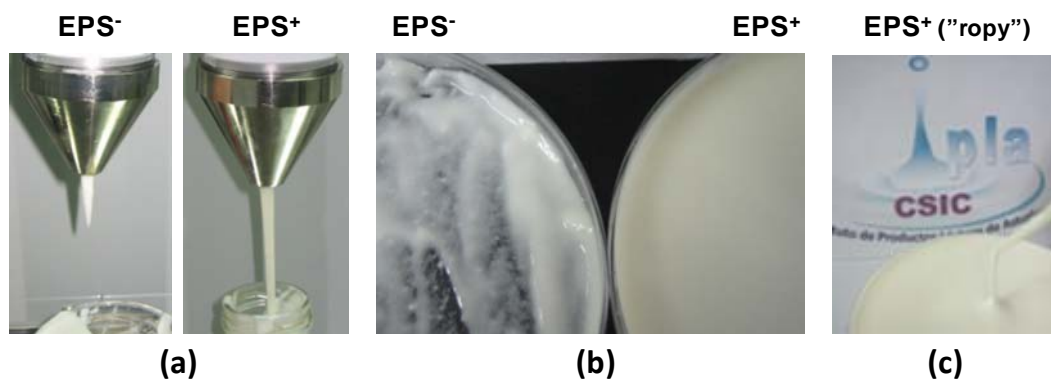
Gal, galactosa; Glc, glucosa; Rha, ramnosa; *p*, anillo piranosa; *f*, anillo furanosa

El interés de la investigación y caracterización de los números EPS descritos hasta la actualidad en las bacterias lácticas se debe a su relación con la modificación, bien sea positiva o negativa, de las propiedades sensoriales (principalmente viscosidad, textura y estructura) de los alimentos fermentados en los que se encuentran estas bacterias productoras de EPS. Más recientemente, se ha suscitado un renovado interés en el estudio de estos biopolímeros puesto que se les atribuyen posibles efectos beneficiosos para la salud. Por ello se ha ampliado el ámbito de búsqueda de cepas productoras de EPS a otros ecosistemas, distintos de los alimentos, como el tracto gastrointestinal (TGI) de animales (incluido el humano). Y, en parte, ésta es la razón por la que se están estudiando cepas productoras de EPS en bifidobacterias, las cuales no se encuentran de forma natural en los alimentos pero sí en el TGI animal. El grupo de investigación del IPLA que pertenece a la RedBAL está caracterizando las propiedades funcionales de lactobacilos y principalmente de bifidobacterias aislados del TGI, tanto por su posible aplicación tecnológica en la elaboración de productos lácteos como por su capacidad para conferir efectos beneficiosos para la salud. Aunque, hasta el momento, las evidencias científicas de los EPS en relación directa con la salud son escasas y la mayoría de ellas han sido obtenidas mediante estudios *in vitro*, es un campo de estudio muy activo y con proyección futura. Estos polímeros están también presentes en la superficie de cepas denominadas probióticas que “*son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador*” (definición de la FAO/WHO, 2001, consensuada en castellano por la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos <http://www.sepyp.es>). Por

tanto, los EPS podrían estar relacionados con la capacidad de algunos probióticos para interactuar con nuestro organismo una vez que estas bacterias incluidas en los denominados “alimentos funcionales” son ingeridas en la dosis adecuada. Aunque uno de los principales retos que aún queda por resolver en este campo de la investigación es responder a la pregunta: las bacterias probióticas, bien las ingeridas o las residentes habituales del TGI, ¿son capaces de producir EPS *in vivo* en este complejo nicho ecológico?

### 😊 **EPS...me quieren en productos lácteos fermentados**

Las cepas de bacterias lácticas productoras de EPS (tipo HePS) se han aislado de numerosos productos lácteos fermentados naturales y aquellas capaces de conferir propiedades sensoriales (viscosidad y textura, Figura 4) adecuadas, se han seleccionado para su uso como “cultivos funcionales” en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, como el yogurt, kéfir y ciertas leches fermentadas escandinavas (villi, långfil).



**Figura 4:** Producto lácteo fermentado con cepas de *Streptococcus thermophilus* productoras de EPS (EPS<sup>+</sup>) y no productoras (EPS<sup>-</sup>). La viscosidad aparente (a) de la cepa EPS<sup>+</sup> es mayor que la cepa no productora y la leche fermentada con la cepa EPS<sup>+</sup> fluye de forma continuada a través de un embudo Posthumus. La textura (b) producida por la cepa EPS<sup>+</sup> es lisa y homogénea, en contraposición de la de la cepa EPS<sup>-</sup> que es granulosa y grumosa. Las cepas productoras de EPS con fenotipo “ropy” o pegajoso (c), el cual se detecta por la formación de un largo filamento cuando se introduce una punta en la leche fermentada, son las que confieren mejores propiedades sensoriales a las leches fermentadas ya que el EPS producido *in situ* durante la fermentación actuaría como espesante y viscosificante natural.

En los últimos años se está estudiando, y aplicando de forma eficaz, el uso de cepas productoras de HePS en la elaboración de queso con bajo contenido graso. De esta forma el EPS producido *in situ*, durante la etapa de coagulación y posteriormente durante maduración del queso, actúa como un espesante natural y un sustituto eficaz de la grasa, consiguiéndose un queso bajo en calorías con una textura y consistencia adecuadas. Por otro lado, se incrementa el rendimiento de producción dada la capacidad de alguno de estos EPS para retener agua. Sin embargo, la aplicación de estos polímeros purificados a partir de la bacteria productora como aditivo alimentario es poco factible dado su bajo rendimiento de producción, incluso en los medios óptimos de crecimiento. El rendimiento de producción de

los EPS varía según la cepa de bacteria láctica que los sintetiza; en general el rendimiento de HePS oscila entre 24 y 600 mg/L y únicamente en algunos casos excepcionales de HoPS (tipo dextrano o fructano) el rendimiento de producción de cepas específicas puede llegar a los 10 g/L, como el caso de *Lactobacillus reuteri* LB121. Otra excepción es el kefirán, el EPS presente en el kéfir, el cual se podría aislar en cantidades apreciables de este producto lácteo. Pero, generalizando, el rendimiento de producción de EPS de bacterias lácticas es bajo si se compara con el de otros polímeros de origen bacteriano que se emplean habitualmente como espesantes alimentarios (mayor de 20 g/L), por ejemplo el gellano o el xantano producido por las bacterias Gram-negativas *Sphingomonas paucimobilis* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente. En el caso de los EPS sintetizados por bifidobacterias los escasos datos existentes indican que su producción es aún menor que la de las bacterias lácticas. Esto puede ser debido a que la posible función de estos polímeros en los ecosistemas naturales en los que se encuentran las bacterias productoras (alimentos o TGI) es diferente. Finalmente, es necesario destacar que no todos los EPS producidos por bacterias lácticas son capaces de incrementar la viscosidad o de mejorar la textura y estructura de los productos lácteos fermentados en los que se encuentran. Esta capacidad depende de las características físico-químicas del EPS (composición química, estructura y tamaño) las cuales a su vez determinan el comportamiento de estos polímeros en solución acuosa (en el caso que nos ocupa, la leche tiene de media un 85% de agua) y su capacidad para interactuar con otros componentes de la leche (principalmente la caseína, que es la proteína láctea). En este sentido, las cepas con fenotipo “ropy”, que podríamos traducir por “filamentoso”, son tecnológicamente las más interesantes puesto que pueden conferir unas propiedades reológicas (viscosidad) y de textura muy deseables en la leche fermentada que se traduce en una sensación muy agradable en el paladar y, además, no confieren ningún aroma ni sabor indeseable al producto fermentado. Un ejercicio interesante cuando compramos en el supermercado leches fermentadas, por ejemplo yogurt, con 0% de materia grasa es leer su composición y comprobar si llevan o no espesantes. En este último caso, si no hay espesantes y la textura del producto es lisa, sin grumos, ligeramente viscosa, con poca sinéresis (o separación del suero lácteo) probablemente lleve en su formulación fermentos lácticos productores de EPS.

### **☹ EPS...No me quieren en bebidas alcohólicas fermentadas y en productos cárnicos elaborados**

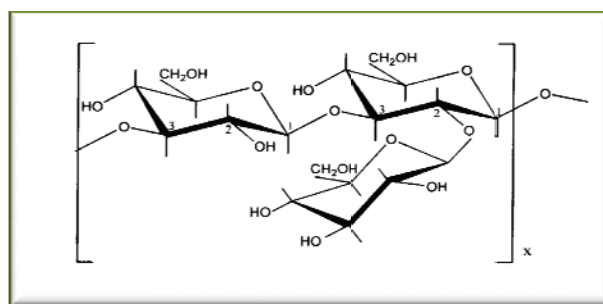
Los EPS que producen las BAL son beneficiosos en algunos alimentos, como las leches fermentadas según se indicó en el apartado anterior. Sin embargo, en otros alimentos tienen efectos negativos y su presencia representa una alteración del producto

invalidando su utilización comercial. Esta alteración se manifiesta como un aumento de viscosidad en alimentos líquidos como la leche, zumos de frutas y bebidas como la sidra o la cerveza. En productos cárnicos procesados “*ready to eat*” (RTE), como el jamón york, las salchichas tipo Frankfurt o el chopped, se reconoce por la presencia de una especie de “hilillos blancos” o “limos” en la superficie de los mismos. Además, la aparición de estos limos constituye uno de los primeros indicadores de alteración en los productos cárnicos envasados al vacío y refrigerados. Las especies de BAL que con mayor frecuencia se han aislado de productos con este tipo de alteración pertenecen al grupo de lactobacilos homofermentativos, o son miembros del género *Leuconostoc*. La carne constituye un excelente medio de cultivo para los microorganismos y de hecho las BAL se encuentran en la mayoría de las carnes y productos cárnicos, tanto frescos como curados, en números pequeños [10 unidades formadoras de colonia (ufc)/g]. En el caso de los productos envasados al vacío, o en atmósferas modificadas, y refrigerados, durante el almacenamiento tienen lugar cambios en la composición de la fase gaseosa. En consecuencia, las poblaciones bacterianas cambian seleccionándose aquellas especies de crecimiento lento que toleran el CO<sub>2</sub>, principalmente representadas por BAL que crecen a temperaturas de refrigeración como algunos leuconostocs (*Leuconostoc mesenteroides*) y lactobacilos (*Lactobacillus curvatus* / *Lactobacillus sakei*). El crecimiento limitado de estas bacterias no siempre implica el deterioro en la calidad de la carne. Pero pueden llegar a alcanzar niveles de 10<sup>8</sup> ufc/g y desencadenar alteraciones como sabores ácidos, malos olores, cambios de color, formación de gas, caída del pH y producción de limos (EPS). No obstante, la capacidad de producir EPS depende de cepa y de los sustratos (nutrientes) que encuentra disponibles para su crecimiento.

Las BAL también están presentes en la elaboración de sidra y vino, y al utilizar diferentes compuestos de los mostos (azúcares, ácidos, compuestos nitrogenados) mejoran las características organolépticas (sensoriales) de la bebida. De hecho las BAL llevan a cabo una de las más importantes transformaciones que ocurren durante la vinificación del vino tinto y en la elaboración de sidra natural, la denominada “fermentación maloláctica”, que consiste en la transformación del ácido L-málico en un ácido más débil como es el ácido L-láctico, disminuyendo la acidez de los mostos. Sin embargo, el desarrollo incontrolado de estas BAL puede tener consecuencias negativas debido a su capacidad para ocasionar diversas alteraciones que disminuyen la calidad de la bebida, tales como la acetificación y el “ahilado”. El “ahilado” o también denominado “aceitado” es ocasionado por ciertas cepas de bacterias lácticas que sintetizan EPS, que al ser excretados al medio extracelular aumentan la consistencia (viscosidad) de la bebida. Las bebidas ahiladas son rechazadas por el consumidor ya que al ser transvasadas presentan un aspecto aceitoso o “filante”. En la actualidad, esta alteración ocurre ocasionalmente en vinificación, y con mayor frecuencia en

la elaboración de sidra natural ya que en este último caso, en general, no se realizan tratamientos de estabilización microbiológica. La alteración puede ocurrir cuando la bebida está todavía en los tanques de fermentación, y se puede reducir la viscosidad mediante tratamientos de agitación mecánica. Sin embargo, en la mayoría de los casos la alteración se desarrolla en botella, haciéndose evidente después de semanas o meses del embotellado. La especie de BAL que más frecuentemente produce la alteración en vinificación es *Pediococcus parvulus*, si bien también se han encontrado cepas de *Oenococcus oeni* productoras de EPS. En la sidra natural vasca se han aislado cepas pertenecientes a estas especies, y además diversas especies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus diolivorans* y *Lactobacillus suebicus*).

Como se ha indicado anteriormente, en general las BAL producen los EPS en niveles bastante bajos lo que dificulta su estudio y de hecho todavía constituyen un gran reservorio por explorar. El efecto beneficioso para la salud que ciertos EPS parecen ejercer ha impulsado su estudio en los últimos años. A la búsqueda de nuevos EPS producidos por BAL, se lleva a cabo un estudio entre varios grupos de investigación de la RedBAL, que incluye las BAL alterantes de productos cárnicos y de bebidas alcohólicas. Por el momento, la caracterización de los EPS producidos por *Lb. sakei*, *Lactobacillus plantarum* y *Leu. mesenteroides* aisladas de productos cárnicos, ha revelado que son  $\alpha$ -glucanos de tipo dextrano. Con respecto a la estructura de los EPS producidos por aislados de vino y sidra, todas las cepas estudiadas de la especie *P. parvulus* sintetizan un  $\beta$ -glucano idéntico, cuya unidad repetitiva está constituida por glucosa con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) en la cadena principal y ramificaciones de un único monosacárido en posición  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) [Figura 5, Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., and Gil-Serrano, A.M. (1997) *Carbohydrate Research*, **303**, 453-458)].



**Figura 5:** Estructura del  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucano sintetizado por *Pediococcus parvulus* 2.6.

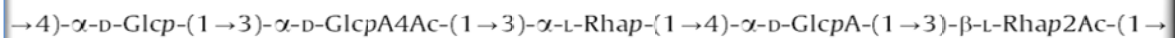
La síntesis de estos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos está controlada por un único enzima, una GTF unida a membrana, y en el caso de la cepa *P. parvulus* 2.6 se trata de una proteína de 567 aminoácidos y 65 kDa. Los aislados de sidra *Lb. diolivorans* G77 y *O. oeni* I4 sintetizan este



mismo  $\beta$ -glucano, pero además *Lb. diolivorans* sintetiza un  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucano ramificado en posición 2, y *O. oeni* produce heteropolisacáridos constituidos por galactosa, glucosa y ramnosa.

### 😊 EPS...y en vegetales fermentados???

Existe una gran diversidad de alimentos vegetales fermentados en cuya producción, las BAL (pertenecientes al género *Lactobacillus*, principalmente) desempeñan un papel esencial, produciendo ácido láctico a partir de los azúcares de la materia prima, lo que hace descender el pH del medio y de esa forma se impide el desarrollo de microorganismos indeseables (alterantes o patógenos). Muchas de estas bacterias aisladas de su medio natural poseen genes que codifican la producción de EPS y son capaces de sintetizarlos en el laboratorio, como es el caso de la cepa *Lactobacillus pentosus* LPS26 que produce un HePS cuya fracción de alto peso molecular está formada por una unidad repetida de cinco monosacáridos que presenta la particularidad de tener dos grupos acetilo en el ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y otro grupo acetilo en la  $\beta$ -L-ramnosa [Figura 6, Rodríguez-Carvajal, M.A., Sánchez, J.I., Campelo, A.B., Martínez, B., Rodríguez, A., and Gil-Serrano, A.M. (2008) *Carbohydrate Research*, **343**, 3066-3070].



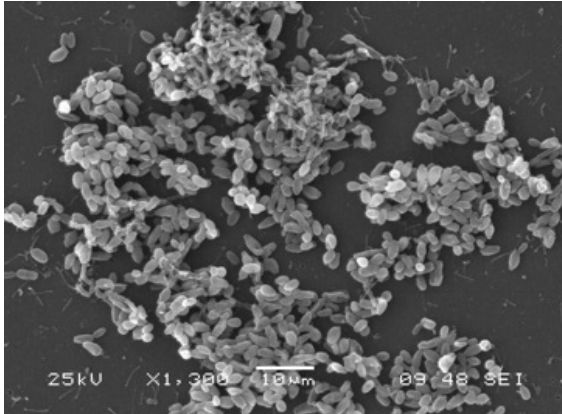
**Figura 6:** Estructura del HePS sintetizado por *Lactobacillus pentosus* LPS26.

Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; Rha, ramnosa; Ac, grupo acetilo; p, anillo piranosa

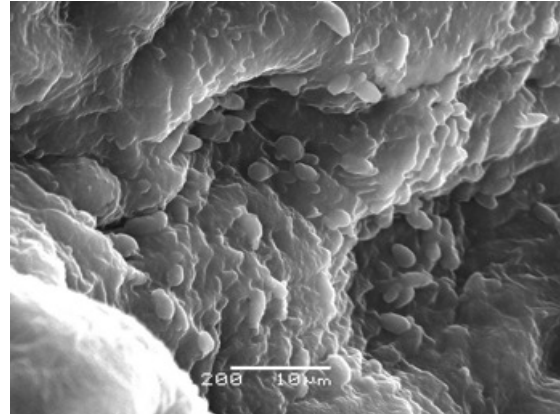
Sin embargo, el conocimiento acerca de la capacidad de esta cepa para producir el HePS en condiciones naturales de fermentación es muy escaso. Lo que sí es cierto es que, en aquellos pocos casos de fermentaciones de vegetales en los que se ha descrito la presencia de EPS, no parece que éstos afecten negativamente a las características sensoriales del producto final. Es el caso de las aceitunas fermentadas.

La producción de aceitunas verdes de mesa por fermentación láctica, es un proceso tradicional en el que las BAL (principalmente, las pertenecientes a la especie *Lb. pentosus*) y las levaduras juegan un papel fundamental. Las primeras, produciendo ácido láctico a expensas de los azúcares que contiene el fruto y, las segundas, proporcionando a las bacterias lácticas vitaminas del grupo B<sub>6</sub> y contribuyendo con su metabolismo, además, a las características sensoriales típicas del producto fermentado. Hasta hace poco tiempo se pensaba que lactobacilos y levaduras se desarrollaban aislados en las salmueras de fermentación. Sin embargo, hemos podido comprobar que ambos se asocian formando comunidades complejas denominadas “biofilms”. Dichos biofilms se forman tanto en las

superficies inorgánicas o abióticas (paredes del fermentador, Figura 7) como en las orgánicas o bióticas (aceitunas, Figura 8) que ofrece el proceso fermentativo. Uno de los aspectos más interesantes de estos biofilms es que los microorganismos aparecen embebidos en una matriz polimérica, probablemente de EPS, especialmente cuando se encuentran adheridos a la superficie de los frutos (Figura 8).



**Figura 7:** Biofilm de lactobacilos productores de EPS (filamentos) en una superficie abiótica (pared del fermentador de aceitunas) visualizado con microscopio electrónico. Barra 10 µm.



**Figura 8:** Biofilm de lactobacilos productores de EPS (matriz en forma de velo) en una superficie biótica (aceitunas) visualizado con microscopio electrónico. Barra 10 µm.

Separando los biofilms de la epidermis de la aceituna y sometiéndolos a un proceso con objeto de purificar dicha matriz hemos podido comprobar que está formada principalmente por EPS, cuya estructura estamos en proceso de determinar. ¿Quién produce el EPS: los lactobacilos, las levaduras o ambos? Probablemente, cuando se determine la estructura del



**Figura 9:** Salmuera “melosa” de aceituna fermentada debido a la producción de EPS

mismo podemos apuntar a uno u otro (o a ambos) grupo de microorganismos como responsable productor. Lo que sí es cierto es que un porcentaje muy alto de los lactobacilos aislados de estos biofilms (alrededor del 70-80%) producen EPS. Probablemente, sea este EPS el responsable de lo que se conoce con el nombre de salmuera “melosa” (Figura 9). En determinadas ocasiones, sobre todo cuando el proceso fermentativo está bastante avanzado (entre 45-60 días de fermentación), se puede

comprobar que las salmueras de fermentación se vuelven espesas y de color caramelo, como si fuera miel. De ahí su nombre. Las aceitunas, por otro lado, no presentan ningún tipo de alteración sensorial, conservando sus propiedades características de olor y sabor. Pues

bien, cuando sometemos esas salmueras a un proceso para purificar EPS, podemos obtener unos 600 mg de EPS liofilizado/L de salmuera. Si tenemos en cuenta que un fermentador industrial de aceitunas de 10.000 kg contiene aproximadamente 6.000 litros de salmuera, se podrían obtener más de 3 kg de EPS por fermentador. De esta forma, se aprovecharía un subproducto de la fermentación que de, otra forma, iría a parar a una balsa de evaporación. Y, ¿sería de utilidad este EPS? Aunque las investigaciones son muy recientes, todo apunta a que podemos buscarle un campo de aplicación en salud animal y humana.

En cantidades tan pequeñas como un 1% (peso/volumen) el EPS de salmueras de aceituna es capaz de adherirse *in vitro* a una cepa bacteriana (*Escherichia coli*) causante de diarreas en lechones. A esas pequeñas concentraciones, el EPS retarda sensiblemente el desarrollo de esta bacteria lo que, a falta de datos experimentales *in vivo* con los animales, augura una buena perspectiva de utilización en salud animal. Pero esas pequeñas cantidades de EPS son también suficientes para impedir de manera clara la adhesión de una bacteria patógena (*Listeria monocytogenes*) a la células del epitelio intestinal humano (denominadas Caco-2). En este caso, como en el anterior, las perspectivas futuras de aplicación en salud humana son esperanzadoras.

Nuestro próximo objetivo de investigación consiste en comprobar que esos EPS suponen una barrera efectiva que impida o retarde la adhesión de microorganismos patógenos a las células intestinales animales y humanas, contribuyendo de esa manera a la salud de potenciales consumidores de este producto microbiano.

### **Nuevas aplicaciones de los EPS en el campo de la salud**

En los apartados anteriores ha quedado claramente recogida la función beneficiosa o negativa de los EPS sintetizados por las BAL sobre las propiedades organolépticas de los alimentos y bebidas fermentadas. Además, como también se ha indicado, los EPS bacterianos pueden incidir beneficiosamente en la salud humana, en esta sección nos vamos a centrar en su posible papel como agentes prebióticos e inmunomoduladores.

Aún no existe una definición consensuada por la comunidad científica internacional sobre los compuestos prebióticos; una de las más utilizadas indica que son “*ingredientes fermentados selectivamente que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud y el bienestar del hospedador*” (la microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos que viven en nuestro TGI). Entre los prebióticos cabe destacar que los oligosacáridos (consumidos en nuestra dieta a través principalmente de los vegetales, cereales y legumbres), los cuales no somos capaces de digerir y llegan más o menos intactos al colon (intestino grueso), son el prototipo de agentes prebióticos. Un ejemplo de este tipo es la inulina, un fructo-

oligosacárido (FOS) que se encuentra de forma natural en la achicoria, bardana, ajo, puerros, etc., y su nombre procede del helenio (*Inula helenium*) la primera planta de la que se purificó. La inulina es un  $\beta$ -D-Frup (2→1) con un bajo grado de polimerización, es decir con un número pequeño de moléculas de fructosa (entre 3 a 60). También es habitual encontrarla como ingrediente prebiótico de algunos alimentos funcionales. En este contexto, y según se indicó en la Tabla 1, los EPS sintetizados por BAL, que tienen similar composición química pero son de tamaño mucho más grande, podrían ser el sustrato para generar estos compuestos prebióticos en el colon, donde tendrían el potencial de modular los componentes de la microbiota intestinal con capacidad de metabolizar estos biopolímeros. Es decir, promoverían el crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon y este efecto podría redundar en una mejora del estado inmune del hospedador humano. Además, los oligosacáridos tienen un valor calorífico bajo (“no engordan”), no son carcinogénicos y tienen asociado un bajo riesgo de infecciones y diarrea. Los pioneros en la investigación y producción de oligosacáridos en los alimentos han sido los japoneses. Sin embargo, actualmente Estados Unidos y Europa se han convertido en líderes de la producción de oligosacáridos, debido al bajo coste de producción a partir de materias primas baratas y fáciles de obtener (Tabla 2), procedentes generalmente de plantas.

**Tabla 2.** Tipos más frecuentes de oligosacáridos no digeribles y su materia prima de obtención mediante distintos procesos químicos (trans-glicosilación, hidrólisis, isomerización o extracción) que origina moléculas con distintos enlaces y grados de ramificación. Glu, glucosa; Fru, fructosa; Gal, galactosa; Xyl, xilosa.

Materia prima	Oligosacárido	Estructura molecular
Almidón	Ciclodextrina	(Glu) <sub>n</sub>
Almidón	Gentiooligosacáridos	(Glu) <sub>n</sub>
Almidón	Isomaltooligosacáridos	(Glu) <sub>n</sub>
Almidón	Maltooligosacáridos	(Glu) <sub>n</sub>
Almidón (soja)	Oligosacáridos de soja	(Gal) <sub>n</sub> -Glu-Fru
Sacarosa	Glicosilacarosa	(Glu) <sub>n</sub> -Fru
Sacarosa	Isomaltulosa (palatinosa)	(Glu-Fru) <sub>n</sub>
Sacarosa	Fructooligosacáridos (FOS)	(Fru) <sub>n</sub> -Glu
Sacarosa	Rafinosa	Gal-Glu-Fru
Sacarosa	Estaquiosa	Gal-Gal-Glu-Fru
Sacarosa/Lactosa	Lactosacarosa	Gal-Glu-Fru
Lactosa	Lactulosa	Gal-Fru
Lactosa	Galactooligosacáridos (GOS)	(Gal) <sub>n</sub> -Glu
Xilano	Xilooligosacáridos (XOS)	(Xyl) <sub>n</sub>

Actualmente, los EPS producidos por bacterias lácticas están siendo investigados como potenciales agentes prebióticos para su posterior introducción en el mercado. Esto es debido al hecho de que la diversidad de las rutas metabólicas de las BAL permitiría ampliar el espectro (polímeros con distintas composición química) de compuestos bioactivos

prebióticos. Para obtener oligosacáridos a partir de los HoPS sintetizados por bacterias lácticas, la aproximación consistiría en una selección bacteriana basada en su capacidad enzimática para sintetizar y degradar el EPS. Esta capacidad reside en dos clases de enzimas las glicosil-hidrolasas (GH descritas anteriormente que están implicadas en la síntesis del HoPS) y las polisacárido-liasas (los enzimas que llevan a cabo su degradación). Una estrategia que permitiría seleccionar estas bacterias, sería cultivarlas en presencia de su propio EPS purificado como única fuente de carbono. Con ello se podrían identificar los enzimas capaces de utilizar (degradar) esta biomolécula y posteriormente purificar el enzima específicamente involucrado en esta biocatálisis del HoPS para obtener oligosacáridos de tamaño más pequeño para ser utilizados comercialmente como sustratos prebióticos, una vez demostrada su función beneficiosa para la salud. En el caso de los EPS tipo HePS, la aproximación sería distinta debido a la complejidad de síntesis de estos polímeros (hay numerosos enzimas implicados) y a la baja producción del mismo por parte de la bacteria productora. Por tanto, *a priori*, no sería factible obtener HePS como sustratos de prebióticos o como aditivos en cantidades suficientes. Sin embargo, en algunos grupos que forman parte de la RedBAL se está investigando la capacidad de HePS sintetizados por BAL y bifidobacterias para ejercer un efecto prebiótico cuando las bacterias productoras son ingeridas bien en un alimento o en un preparado alimentario. Es decir, en este caso la hipótesis que se está estudiando es si los EPS producidos por BAL probióticas son capaces de modificar la microbiota intestinal hacia microorganismos beneficiosos para la salud del hospedador, siendo estos “microbios buenos” los que consumirían los EPS prebióticos producidos por BAL y bifidobacterias. En este caso podríamos estar hablando de un alimento / preparado alimentario “sinbiótico” (no es una falta de ortografía), que *sería aquel que combina probióticos y prebióticos* en su formulación.

Otro aspecto a tener en cuenta en la relación EPS bacterianos con la salud humana es la posible capacidad immuno-moduladora que estos biopolímeros podrían ejercer sobre nuestro sistema inmune. Un inmunomodulador es *“una sustancia que tiene un efecto sobre el sistema inmune como inmunosupresor o como inmunoestimulante para inhibir o estimular dicho sistema”*. Específicamente el uso de inmunomoduladores incluidos como aditivos en los alimentos puede ser importante para combatir infecciones, para prevenir procesos que conducen a la aparición de cáncer del tracto digestivo o para tratar enfermedades debidas a inmunodeficiencias, como por ejemplo enfermedades inflamatorias intestinales (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa). En este contexto, HoPS o HePS producidos por bacterias lácticas no han sido todavía utilizados para elaborar alimentos funcionales o validados experimentalmente en estudios con humanos como moduladores de las respuesta inmune, puesto que las primeras evidencias científicas de la capacidad inmunomoduladora de los

EPS de BAL y bifidobacterias han sido obtenidas con modelos de estudio *in vitro* (en laboratorio). Sin embargo, los grupos de investigación de la RedBAL que trabajan con EPS, junto con otros grupos internacionales, han comprobado que muchas de las bacterias lácticas y bifidobacterias (algunas cepas son probióticas) con propiedades inmunomoduladoras producen EPS. Además, la naturaleza y estructura de algunos de estos biopolímeros sintetizados por bacterias lácticas indican que tienen potencial como inmunomoduladores. Este es el caso de los  $\beta$ -glucanos que son conocidos como “modificadores de la respuesta biológica” debido a su capacidad para activar el sistema inmunológico. En este contexto, grupos de la RedBAL han mostrado que bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* and *Pediococcus* productoras de (1,2) (1,3)- $\beta$ -glucano son capaces de inmunomodular macrófagos humanos *in vitro* [Fernández de Palencia P., Werning M.L., Sierra-Filardi E., Dueñas M.T., Irastorza A., Corbí A.L., and López, P (2009) ***Applied Environmental Microbiology*, 75**, 4887-4891]. El tratamiento de los macrófagos con el biopolímero purificado conlleva un aumento de la secreción de interleuquinas antiinflamatorias. También, la evaluación de cepas productoras de  $\beta$ -glucano reveló que *P. parvulus* 2.6 and *Lb. suebicus* CUPV221 son resistentes a las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal humano y que la presencia del EPS confiere a las bacterias productoras un incremento en su capacidad de adhesión a las células del epitelio intestinal humano [Garai-lbae G., Werning M.L., López, P., Fernández de Palencia, P. (2010) ***Bioresource Technology*, 191**, 9254-9263]. Así, el uso de (1,2) (1,3)  $\beta$ -glucano o sus bacterias productoras podrían tener potencial como inmunomodulador en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Además, el consumo de productos fermentados basados en avena y preparados con *P. parvulus* 2.6 también conlleva una disminución de los niveles séricos de colesterol, confirmando el efecto previo detectado con (1,3)- $\beta$ -D-glucano presente en la avena. Finalmente, aunque estas cepas productoras de (1,2) (1,3)  $\beta$ -D-glucanos no han sido aisladas de productos lácteos, se ha comprobado la capacidad tecnológica de estas cepas para la elaboración de derivados lácteos o mezclas zumo-leche [Elizaquível P., Sánchez G., Salvador A., Fiszman S., Dueñas M.T., López P., Fernández de Palencia, P., and Aznar R. (2011) ***Journal of Dairy Science*, 94**, 3271-3278]. Dentro del grupo de los EPS tipo HoPS, también los dextranos ( $\alpha$ -glucanos) han sido investigados como inmunomoduladores y tienen potencial para reducir la respuesta inflamatoria. Por ello, dada la gran capacidad de producción de HoPS por parte de algunas BAL y sus propiedades inmunomoduladoras, hace predecir que en un futuro las BAL productoras y sus HoPS podrán ser evaluados como aditivos alimentarios en alimentos funcionales. De nuevo, el caso de BAL y bifidobacterias productoras de EPS tipo HePS es diferente debido a la menor producción del biopolímero que no hace factible su uso como aditivo alimentario. Sin embargo, en el grupo de investigación del IPLA se está estudiando el papel de los HePS producidos por bifidobacterias de origen humano sobre la capacidad para modular

(modificar) la respuesta inmune humana. Estudios *in vitro* llevados a cabo con una batería de 10 polímeros purificados de distintas bacterias productoras, y empleando como modelo células mononucleares aisladas de sangre periférica humana, muestran que los EPS son capaces de modificar el patrón de producción de citocinas de estos monocitos (las citocinas son las proteínas que producen las células animales para comunicarse entre sí). Es decir, los HePS de bifidobacterias actuarían *in vitro* como moduladores de la respuesta inmune [López, P., Monteserín, D.C., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., Suárez, A., and Ruas-Madiedo (2012) *Food Research International*, (doi:10.1016/foodres.2011.11.020)]. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos *in vivo*, en ratas alimentadas con bifidobacterias productoras de HePS, mostraron que una de las cepas es capaz de disminuir la respuesta inmune inflamatoria. Esto podría tener aplicaciones prácticas, en un futuro más bien lejano, para reducir el estado inflamatorio asociado con algunas enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal indicada anteriormente.

Como corolario a esta sección, hay que reseñar que aún hay un largo camino por recorrer antes de poder aplicar cepas productoras de EPS en el campo de la salud humana. Además de demostrar *in vitro* que los EPS *per se* pueden actuar como agentes prebióticos o como moduladores de la respuesta inmune (entre otros campos de estudio) o que las cepas productoras de estos biopolímeros son microorganismos probióticos, es necesario demostrar su capacidad en modelos *in vivo*. Finalmente, en el marco legal Europeo en el que nos encontramos, es imperativo demostrar mediante estudios clínicos bien diseñados que estos polímeros y sus bacterias productoras funcionan para mejorar la salud humana; y en estos estudios es necesario que se implique el personal clínico imprescindible para llevarlos a cabo. Los destinatarios finales de estos posibles “alimentos o ingredientes funcionales” son los consumidores, en concreto grupos de población específicos que se podrían beneficiar de un tipo de bacteria o EPS con unas características especiales para cada situación. Por ello el sector industrial, tanto de la alimentación como de preparados o suplementos dietéticos, es otro de los actores principales llamados a desempeñar un papel importante para que los científicos, a partir del conocimiento básico, puedan generar conocimientos susceptibles de ser transferidos al tejido industrial y que, finalmente, el beneficio revierta a la sociedad.