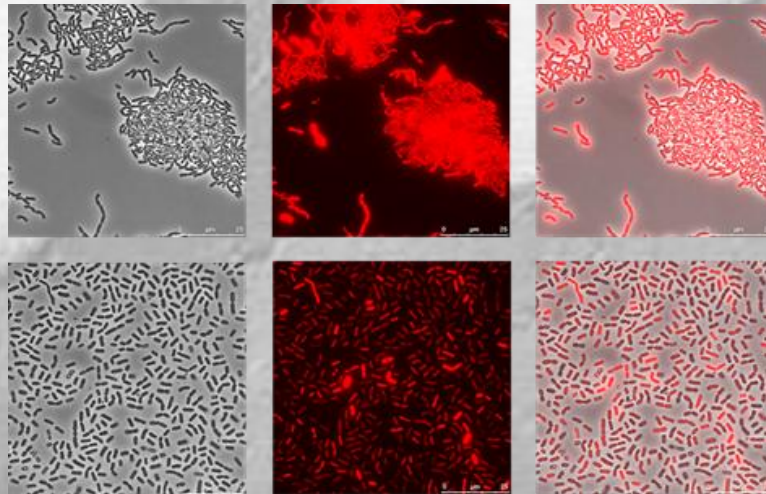




DEXTRANOS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES



Programa de doctorado en Biotecnología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Valencia (España)

Directoras

Dra. Rosa Aznar Novella

Dra. Paloma López García

Montserrat Nácher Vázquez

Tesis doctoral

Valencia, 2015

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

Centro de Investigaciones Biológicas



DEXTRANOS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES

Montserrat Nácher Vázquez

Tesis doctoral

DIRECTORAS

Dra. Rosa Aznar Novella

Dra. Paloma López García

Valencia, 2015



Dra. Rosa Aznar Novella, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, y miembro del Claustro científico ampliado del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC, Valencia).

Dra. Paloma López García, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

CERTIFICAN:

Que Montserrat Náchter Vázquez ha realizado el trabajo de tesis doctoral “**Dextranos de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos: Caracterización y aplicaciones**” en las instalaciones del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos y en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas. El trabajo ha sido co-dirigido por las Dras. Rosa Aznar Novella y Paloma López García, que autorizan la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia en Septiembre de 2015.

Fdo.: Dra. Paloma López García

Fdo.: Dra. Rosa Aznar Novella

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una ayuda para el desarrollo de tesis doctorales en el marco del programa “Junta para la Ampliación de Estudios” de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), subprograma JAE-Predoc (referencia: JAEPred08, convocatoria del año 2008). Así, como a la contratación como titulada superior con cargo al Proyecto del Plan Nacional AGL2012-40084-C03-01 y al Proyecto PIE-201320E01 subvencionado por el CSIC.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación, financiados con fondos públicos, que se detallan a continuación:

“Identificación y tipificación molecular de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos y su aplicación en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales” REF. AGL2006-11932-C05-03/ALI (2006-2010, Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico). Coordinadora (CO) Paloma López e Investigadora Principal (IP) en la Universidad de Valencia Rosa Aznar.

“Nuevos Ingredientes de Alimentos Funcionales para mejorar la salud” REF. CSD2007-00063 (2007-2012, Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico). IP Francisco Tomás Barberán.

“Estirpes de *Lactobacillus* y *Pediococcus* productoras de glucano. Evaluación de sus características probióticas y análisis de las propiedades físico-químicas y funcionales de sus exopolisacáridos”. REF. AGL2009-12998-C03. (2009-2014, Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico). CO e IP en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Paloma López.

“Identificación y tipificación molecular de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos y su aplicación en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales” REF. GVACOMP2009-257 (2009, Conselleria de Cultura, Educació i Ciència. Generalitat Valenciana). IP Rosa Aznar.

“Exploración de la diversidad microbiana y de su potencial biotecnológico” REF. PROMETEO/2012/040 (2012-2015, Conselleria de Educación Generalitat Valenciana). IP Rosa Aznar.

“Caracterización molecular de la producción de dextrano por *Lb. sakei* MN1”. REF. PIE-201320E01. (2013-2014, Consejo Superior de Investigaciones Científicas). IP Paloma López.

“Identificación de polisacáridos prebióticos y bacterias probióticas con capacidad inmunomoduladora para su uso en nuevos alimentos funcionales”. REF. AGL2012-40084-C03. (2013-2016, Ministerio de Economía y Competitividad Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico). CO e IP en el CIB Paloma López.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de mi tesis doctoral he tenido momentos de risas y de grandes alegrías, pero también algunos muy duros cargados de tristeza y frustración. Con la experiencia que he adquirido estos años cambiaría ciertas cosas, pero seguramente no hubiera aprendido todo lo que sé, ni sería la persona que soy ahora mismo. Sin embargo, de lo que sí que estoy totalmente convencida, es que no estaría escribiendo estas líneas si no fuera por todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años. Ahora, ha llegado el momento de dedicarles unas palabras de agradecimiento.

A la gente del IATA, que me ha acompañado en mi primera etapa de tesis. Recuerdo como si fuera ayer la primera vez que entré como alumna colaboradora. Gracias por tantos momentos de risas, meriendas, viajes, cenas, fiestas....y de ciencia, claro. Perdonarme si no pongo los nombres de cada uno de vosotros, pero por suerte hemos sido muchísimos, y no me gustaría dejarme a nadie. Así que, GRACIAS A TODOS. Gracias a toda la gente de mi laboratorio 306 (Juan, Jordi, Edu, Sole, Alba...), especialmente a Empar, mi primera maestra, y a Patri y Gloria, mis otras maestras y compañeras. De ellas he aprendido mucho, no sólo cosas de trabajo.

A la gente del CIB, que me han acogido como una más en mi segunda etapa de tesis. Todo empezó con una estancia hace 5 años y desde entonces sigo allí. Gracias a todas las personas con las que me cruzo por los pasillos y me dedican una sonrisa y un saludo. Gracias a mi gente de los cafés y comidas (Lorena, Sofi, Cris, Cristina, Ana, Virtu, Ramón, Gloria y Jose). Compartir el día a día con vosotros hace el trabajo mucho más llevadero. Gracias a toda la gente de mi otro laboratorio 306, especialmente a Mariángeles, Pilar, Sara, Mariluz y Adrián, mis compañeros en los momentos más estresantes de esta etapa, y a Nuria y Víctor, con los que aprendí lo que es enseñar. Gracias también a mi actual laboratorio 300. A Luis Rivas, por confiar en mí, a Maria, por ser mi compañera y amiga y a Nuria, por ser la alegría del laboratorio.

A toda la gente que ha colaborado para que esta tesis salga adelante, especialmente a Alicia Prieto, Ángeles Canales, Sara Isabel Pérez, Sylvia Rodríguez, Daniel Gozalbo, Marisa Gil, Iñaki Iturria, Miguel Ángel Pardo y Mario García. Muchas gracias por todo.

A mis directoras de tesis Rosa Aznar y Paloma López, que han hecho que crezca como científica. Gracias por creer en mí y enseñarme tanto. Habéis sido más que las directoras de mi tesis. Rosa, gracias por darme mi primera oportunidad y transmitirme ese saber estar. Paloma, gracias por acogerme en tu grupo y hacerme sentir tan querida, como tú dices, como una hija.

A mis amigos, que me han soportado todos estos años con “la tesis auestas”. Gracias por vuestra paciencia y comprensión, sin entender en muchas ocasiones ni lo que estaba haciendo. No puedo evitar acordarme de mis mosqueteros, en especial de Fanny, que durante tantos años me ha llamado “doctora Nácher”. Gracias por creer tanto en mí. Y gracias a todas mis compis de piso, especialmente a Nuria, por ser mi gran apoyo aquí en Madrid.

A mi familia, lo más importante que tengo. GRACIAS por quererme y respetar tanto mi trabajo. A mis tios, primos, a LAS VAZQUEZ... a pesar de la distancia que nos separa, siempre os llevo conmigo. Orgullosa y feliz de pertenecer a esta familia. Gracias también a mi nueva familia política, por dejarme formar parte de vuestras vidas. Gracias Magdalena y Salvador, por acogerme como a una hija.

A mis padres, Maria y José. GRACIAS POR TODO. Gracias por los valores y la educación que me habéis dado y por la paciencia y el amor que sigo recibiendo de vosotros. Si he llegado hasta aquí y soy como soy, es gracias a vosotros. Gracias por soportar, desde hace 31 años, “mis cosas”. Sois los mejores padres que jamás podría haber deseado tener. Aunque no os lo diga tan a menudo, OS QUIERO.

A Salva, mi nueva familia. Gracias por apoyarme en todo momento y por tu paciencia, comprensión y amor incondicional. Nadie mejor que tú sabe por todo lo que he pasado para llegar hasta aquí. Gracias por creer tanto en mí y no dejarme tirar nunca la toalla. En tu tesis dijiste que me hacías partícipe de la mitad del trabajo. Lo mismo te digo yo a ti ahora. Gracias por estar a mi lado, para lo bueno y para lo malo. GRACIAS MI ESE. Te quiero.

A mi familia

“Para mí, no hay emoción o satisfacción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en ciencia como en el arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano. Mi mensaje, dirigido sobre todo a la juventud, es que si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejará de proporcionarles satisfacciones inigualables. Ciertamente es que abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que las satisfacciones no se olvidan jamás”

Severo Ochoa (1905-1993)

Premio Nobel de Fisiología y Medicina

"No te conformes con el qué, sino que logra saber el porqué y el cómo"

Robert Baden-Powell (1857-1941)

Fundador del Movimiento Scout

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	3
1.1. Clasificación taxonómica.....	3
1.2. Metabolismo.....	5
1.3. Géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i>	7
1.4. Las BAL y su potencial en acuicultura.....	8
2. EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BAL.....	10
2.1. Homopolisacáridos.....	11
2.2. Heteropolisacáridos.....	14
2.3. Detección y producción de EPS.....	15
2.4. Aislamiento, purificación y caracterización estructural de los EPS.....	17
2.5. Aplicaciones de los EPS.....	19
3. DEXTRANO Y DEXTRANSACARASAS.....	20
3.1. El dextrano.....	20
3.2. Las dextransacarasas.....	20
3.3. Producción de dextrano.....	22
3.4. Aplicaciones de los dextranos.....	22
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1. MATERIALES.....	31
1.1. Material biológico.....	31
1.2. Plásmidos.....	32
1.3. Oligonucleótidos.....	32
1.4. Enzimas.....	33
1.5. Medios de cultivo.....	34
1.5.1. Medio de cultivo para <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	34
1.5.2. Medio de cultivo para <i>L. lactis</i> MG1363 y <i>E. coli</i> DH5 α	35

1.5.3. Medios de cultivo para las líneas celulares BF-2, EPC y para los macrófagos peritoneales de ratón.....	35
2. MÉTODOS GENERALES.....	35
2.1. Condiciones de cultivo y conservación de cepas.....	35
2.2. Obtención de preparaciones de DNA.....	36
2.2.1. Preparaciones de DNA genómico de <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	36
2.2.2. Preparaciones de DNA plasmídico de <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	37
2.2.3. Preparaciones de DNA plasmídico de <i>L. lactis</i> MG1363 y <i>E. coli</i> DH5α.....	37
2.3. Obtención de preparaciones de RNA de cultivos bacterianos.....	38
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	38
2.5. Electroforesis de DNA.....	39
2.6. Purificación y cuantificación de fragmentos de DNA.....	40
2.7. Secuenciación de DNA.....	40
2.8. Técnicas de clonaje de DNA: células competentes y transformación.....	40
2.9. Fermentación de azúcares.....	41
2.10. Microscopía electrónica de transmisión.....	41
2.11. Microscopía confocal láser de barrido.....	42
2.12. Cuantificación de EPS.....	42
2.13. Determinación de la concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico.....	43
2.14. Métodos bioinformáticos.....	44
3. MÉTODOS ESPECÍFICOS.....	45
3.1. Detección del crecimiento, pH, azúcares y producción de EPS por <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	45
3.2. Análisis y caracterización estructural de los EPS.....	46
3.2.1. Aislamiento y purificación.....	46
3.2.2. Análisis de la pureza de las preparaciones.....	47
3.2.3. Análisis de la masa molecular.....	47
3.2.4. Determinación de la composición de monosacáridos.....	48

3.2.5. Determinación del tipo de sustitución: análisis por metilación.....	48
3.2.6. Espectroscopía de infrarrojos.....	49
3.3. Aplicaciones de los EPS.....	49
3.3.1. Actividad antiviral frente a virus de salmónidos.....	49
3.3.1.1. Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad.....	49
3.3.1.2. Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antiviral.....	50
3.3.1.3. Ensayo <i>in vitro</i> de reducción del rendimiento viral.....	50
3.3.1.4. Ensayo <i>in vitro</i> del efecto del momento de adición.....	51
3.3.1.5. Ensayos <i>in vivo</i>	51
3.3.2. Actividad inmunomoduladora.....	52
3.3.2.1. Efecto inmunomodulador en trucha arcoíris.....	52
3.3.2.2. Actividad antiinflamatoria en macrófagos de ratón.....	53
3.3.2.2.1. Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratón.....	53
3.3.2.2.2. Preparación de estímulos.....	54
3.3.2.2.3. Estudios de producción <i>in vitro</i> de citoquinas.....	54
3.4. Detección y localización genómica de los genes <i>dsr</i> en <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	55
3.5. Detección de la transcripción de los genes <i>rep A</i> , <i>rep B</i> y <i>dsrLS</i> en pMN1.....	56
3.6. Construcción de los plásmidos pRCR13, pRCR14 y pRCR15 y establecimiento en <i>L. lactis</i> MG1363 y <i>Lb. sakei</i> MN1.....	57
3.7. Transferencia del plásmido pRCR12 a <i>Lb. sakei</i> MN1.....	57
3.8. Detección de la expresión de la proteína fluorescente mCherry en <i>Lb. sakei</i> MN1 portadora de pRCR12, pRCR13, pRCR14 o pRCR15.....	58
3.9. Detección de la formación de biopelículas en matrices de poliestireno y vidrio.....	58
3.10. Detección de agregación y desagregación bacteriana.....	59
3.11. Evaluación de la capacidad de colonización de <i>Lb. sakei</i> MN1 en modelo gnotobiótico de pez.....	60
3.11.1. Obtención de cultivos de <i>Vibrio anguillarum</i> y larvas de pez cebra gnotobióticas.....	60

3.11.2. Ensayos de colonización de <i>Lb. sakei</i> MN1.....	60
3.11.3. Ensayos de competición entre <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>V. anguillarum</i> NB10.....	61
3.11.4. Detección de la colonización bacteriana.....	62
RESULTADOS.....	63
1. CARACTERIZACIÓN DE BAL PRODUCTORAS DE EPS.....	65
1.1. Confirmación taxonómica de las cepas <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	65
1.2. Perfil de fermentación de carbohidratos.....	65
1.3. Detección de la producción de EPS.....	66
1.4. Metabolismo central bacteriano y producción de EPS utilizando sacarosa como fuente de carbono.....	68
2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EPS.....	71
2.1. Aislamiento y purificación de los EPS.....	71
2.2. Caracterización estructural de los EPS.....	73
2.3. Determinación del tamaño molecular de los EPS.....	75
3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS DEXTRANOS: POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO, ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR.....	76
3.1. Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos de ratón.....	76
3.2. Actividad antiviral de los dextranos frente a virus de salmónidos.....	78
3.2.1. Mecanismo de acción antiviral de los dextranos: efecto inhibitorio en la replicación del VNPI y del VNHI.....	79
3.2.2. Efecto del momento de adición de los dextranos.....	80
3.2.3. Efecto del EPS-LS en la supervivencia de truchas arcoíris infectadas.....	81
3.3. Actividad inmunomoduladora del EPS-LS.....	83
4. GENES <i>dsr</i>: LOCALIZACIÓN, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN.....	84
4.1. Detección de los genes <i>dsr</i>	84
4.2. Localización genética de los genes <i>dsr</i>	85
4.3. Plásmido pMN1.....	87
4.3.1. El gen <i>drsLS</i> de <i>Lb. sakei</i> MN1.....	88

4.3.2. Entorno genético de <i>dsrLS</i>	89
4.4. Expresión génica de <i>dsrLS</i>	92
4.5. Identificación de regiones promotoras en pMN1.....	93
5. CAPACIDAD DE AGREGACIÓN Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN RELACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANO.....	98
5.1. Análisis de la capacidad de agregación y de formación de biopelículas de <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10.....	98
5.2. Análisis de la capacidad de agregación de <i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR12].....	100
5.3. Análisis de la capacidad de desagregación de <i>Lb. sakei</i> MN1 y <i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR12].....	102
5.4. Evaluación de <i>Lb. sakei</i> MN1 en pez cebra como potencial probiótico de peces.....	103
DISCUSIÓN.....	107
1. PRODUCCIÓN DE EPS POR <i>Lb. sakei</i> MN1 Y <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10 Y SU INTERRELACIÓN CON EL METABOLISMO CENTRAL.....	109
2. CARACTERIZACIÓN DEL EPS-LS Y DEL EPS-LM, AISLADOS Y PURIFICADOS.....	115
3. GENES <i>dsrLS</i> Y <i>dsrLM</i> Y EL PLÁSMIDO pMN1.....	117
4. LA PROTEÍNA DsrLS.....	120
5. EXPRESIÓN DEL GEN <i>dsrLS</i>.....	125
6. BIOACTIVIDAD DE LOS DEXTRANOS Y DE <i>Lb. sakei</i> MN1.....	128
CONCLUSIONES.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	139
ANEXOS.....	155

ABREVIATURAS

2D-DOSY	Espectroscopía de difusión
3D	Tridimensional
A_{Xnm}	Absorbancia a X nm
BAL	Bacterias del ácido láctico
BF-2	<i>Bluegill fry</i> . Línea celular de infección del VNPI
CC	Dominio “coiled-coil”
CC₅₀	Concentración de compuesto que inhibe el 50 % del crecimiento de las células
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
CDM	Medio de cultivo definido
CDMG	CDM suplementado con glucosa
CDMS	CDM suplementado con sacarosa
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
Cm	Cloranfenicol
Cm^R	Resistencia a cloranfenicol
CPS	Polisacárido capsular
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
Da	Dalton
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAsa I	Endonucleasa I
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EC₅₀	Concentración de compuesto que inhibe el 50 % del efecto citopático de los virus en las células
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
EF-1α	Factor de elongación 1 α
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EPC	<i>Ephitelioma papulosum cyprinid</i> . Línea celular de infección del VNHI
EPS	Exopolisacáridos
EPS-LM	Exopolisacárido de <i>Lc. mesenteroides</i> RTF10
EPS-LS	Exopolisacárido de <i>Lb. sakei</i> MN1
ESTY	Medio de cultivo rico
ESTYG	ESTY suplementado con glucosa
FS	Fructansacarosas
GH	Glicosil hidrolasas
GRAS	Generalmente Reconocidas como Seguras
GS	Glucansacarosas
GTF	Glicosiltransferasas
HePS	Heteropolisacáridos
HoPS	Homopolisacáridos
IATA	Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos
IFN-1	Interferón 1
IFN-γ	Interferón gamma
IL-6	Interleuquina 6
Kpb	Kilopares de bases

KDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo rico Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M	Marcador de peso molecular
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
MRS	Medio de cultivo rico Man Rogosa Sharpe
MRS_G	MRS sin dextrosa suplementado con glucosa
MRS_S	MRS sin dextrosa suplementado con sacarosa
N-terminal	Extremo amino terminal
ORF	Pauta abierta de lectura
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de estructuras 3D de proteínas
poli I:C	Ácido poliinosínico-policitídico
QPS	Presunción Cualificada de Seguridad
RBS	Sitio de unión al ribosoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA 16S	Subunidad 16S del RNA ribosómico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR precedida por transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SI	Índice selectivo. Cociente entre CC ₅₀ y EC ₅₀
TCID₅₀	Cantidad de virus requerida para infectar el 50 % del cultivo celular
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
ufc	Unidades formadoras de colonias
VNHI	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
VNPI	Virus de la necrosis pancreática infecciosa

RESUMEN

Algunas bacterias del ácido láctico (BAL) sintetizan exopolisacáridos (EPS) que mejoran las propiedades reológicas de alimentos fermentados, lo que despierta su interés industrial. Además, algunos de ellos han demostrado poseer propiedades beneficiosas para la salud (antitumorales, inmunomoduladoras, hipocolesterolémicas o prebióticas) y, por tanto, son buenos candidatos para la elaboración de alimentos funcionales. Entre los EPS, los dextranos son sintetizados por especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus* y *Weisella* de forma constitutiva o inducible. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de la expresión de las proteínas que los sintetizan, las dextranacararas.

El presente trabajo de tesis doctoral se ha centrado en la caracterización a nivel molecular, fisiológico, metabólico y fisicoquímico de los EPS producidos por *Lactobacillus sakei* MN1 (EPS-LS) y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 (EPS-LM), dos BAL aisladas de productos cárnicos, y en el estudio de la funcionalidad biológica de dichos polímeros, como agentes antivirales e inmunoestimulantes.

En primer lugar, se ha determinado que ambas cepas, en presencia de sacarosa como fuente de carbono, producen homopolisacáridos tipo dextrano con enlaces α -(1-6) en su cadena principal y un 3 % (EPS-LS) o un 9 % (EPS-LM) de ramificaciones con enlaces α -(1-3). Dichos polisacáridos se encuentran asociados a la pared celular o rodeando a las células, según se ha observado por microscopía electrónica.

Como resultado del estudio genético, se ha demostrado que los genes *dsr* que codifican las dextranacararas responsables de la producción del EPS-LS y el EPS-LM, se encuentran localizados en plásmidos diferentes denominados pMN1 (13,7 kpb) y pRTF10 (20,6 kpb), respectivamente. Además, la secuenciación completa de pMN1 (11.126 pb) ha revelado que pertenece a una familia de plásmidos que replican por el mecanismo de tipo *theta*, cuyo prototipo es pUCL287, y que contiene un replicón (el origen de replicación y los genes *repA* y *repB*), el gen *dsrLS* y 7 marcos de lectura abierta. También, se ha estudiado la expresión del gen *dsrLS* a nivel transcripcional y los resultados obtenidos indican que la dextranacarasa DsrLS se sintetiza a partir de un transcrito monocistrónico y otro policistrónico, que incluye los genes *repA*, *repB* y *dsrLS*, y que la expresión de ambos mRNAs no se ve incrementada por la presencia de

sacarosa en el medio de cultivo. Por tanto, esta hexosa no es un agente inductor de la expresión de DsrLS siendo este el primer caso descrito de expresión sincronizada de una dextranasa y de la maquinaria replicativa de un plásmido. El análisis bioinformático del producto de *dsrLS* ha revelado que codifica un péptido de 1.767 aminoácidos con una masa molecular de 190.039 Da y que contiene un péptido líder en su extremo amino terminal, lo que indica que DsrLS debe ser una proteína extracelular. Los modelos de la estructura 3D de DsrLS, basados en homología de aminoácidos y de conformación estructural, indican que es un enzima dimérico cuyo sustrato es la sacarosa y que posee actividad dextranasa.

Para evaluar la funcionalidad biológica de estos dextranos, se han optimizado las condiciones de producción del EPS-LS y el EPS-LM en medio definido, obteniéndose una recuperación de los mismos del 80 % con un grado de pureza del 99 %. Ambos EPS han mostrado actividad antiviral *in vitro* frente a la infección por dos virus de salmónidos: el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). Además, se ha comprobado que el EPS-LS *in vivo* posee actividad antiviral y actúa como un agente estimulante de la respuesta inmune de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Por otro lado, *Lb. sakei* MN1 tiene la capacidad de agregarse y formar biopelículas cuando crece en presencia de glucosa (no produce dextrano), pero no en presencia de sacarosa (produce dextrano). Esta característica ha permitido demostrar su efecto probiótico como colonizadora del intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra (*Danio rerio*) en estudios de competición con el patógeno de peces *Vibrio anguillarum*. Finalmente, los resultados indican que la colonización de las larvas por *Lb. sakei* MN1, al igual que la capacidad de agregación y formación de biopelícula de la bacteria, es superior en condiciones de no producción de dextrano.

Por todo lo expuesto, tanto *Lb. sakei* MN1 por su potencial probiótico, como el EPS-LS que produce, por su acción inmunomoduladora y antiviral, resultan muy prometedores para su aplicación en el desarrollo de piensos funcionales para salmónidos.

INTRODUCCIÓN

1. LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas con un contenido en G+C inferior al 50 %, por lo que se engloban dentro del filo *Firmicutes*. Las BAL se caracterizan en líneas generales por ser cocos o bacilos, catalasa negativas (aunque en algunos casos pueden poseer una pseudocatalasa), aerotolerantes, anaerobias facultativas o microaerófilas, no esporuladas, inmóviles, ácido-tolerantes, oxidasa negativas y con un metabolismo de carbohidratos estrictamente fermentativo del cual se obtiene como producto principal o único el ácido láctico.

1.1. Clasificación taxonómica

En la 1ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 1986 [1], las BAL aparecían agrupadas en 5 géneros dentro de la clase *Bacilli* y del orden *Lactobacillales*: *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Desde entonces, estos géneros han sufrido sucesivos cambios, reordenaciones y divisiones, pasando de 13 géneros bacterianos en 2009 (Fig. 1) [2] a los 38 géneros actuales con más de 200 especies (Tabla 1) [3].

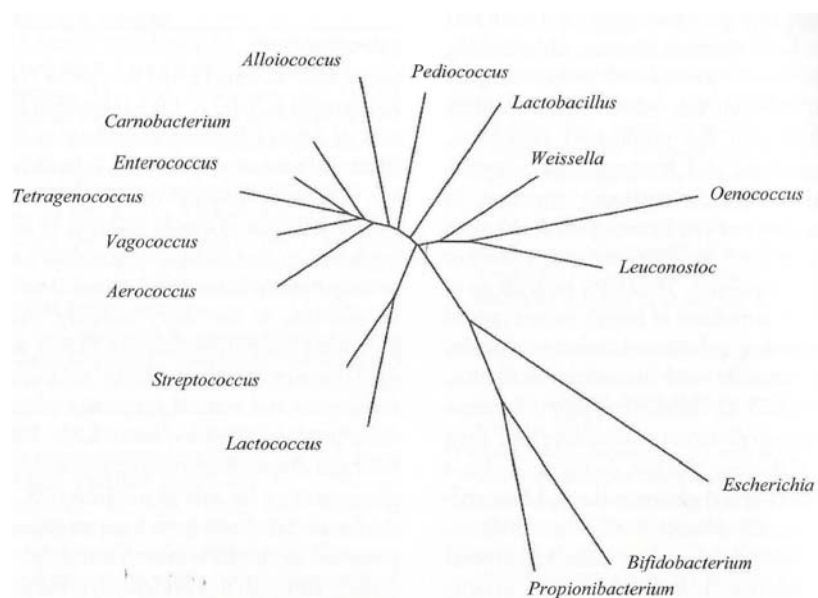


Figura 1I. Árbol filogenético basado en el rRNA 16S, incluyendo diferentes géneros de BAL (bajo contenido en G+C), *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* (alto contenido en G+C). (Reproducido de Ruas-Madiedo y cols. [2]).

Tabla 11. Clasificación taxonómica actual de las BAL [3].

Filo	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia, Aerococcus, Facklamia, Dolosicoccus, Eremococcus, Globicatella, Ignavigranum</i>
			<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Alkalibacterium, Alloiococcus, Allofustis, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus, Pisciglobus, Trichococcus</i>
			<i>Enterococcaceae</i>	<i>Bavariicoccus, Catellicoccus, Enterococcus, Melissococcus, Pilibacter, Tetragenococcus, Vagococcus</i>
			<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
			<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Fructobacillus, Leuconostoc, Oenococcus, Weissella</i>
			<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus, Lactovum, Streptococcus</i>

Tradicionalmente, el término “bacteria láctica” ha englobado a dichas BAL junto a las bifidobacterias debido a que comparten ciertas características, entre ellas la producción de ácido láctico. Durante muchos años, las bifidobacterias estuvieron incluidas en el género *Lactobacillus*, atendiendo a criterios fisiológicos y metabólicos [4]. Sin embargo, estudios moleculares y filogenéticos, principalmente mediante la secuenciación del gen del rRNA 16S, determinaron que las BAL y las bifidobacterias constituyen dos grupos bien separados filogenéticamente (Fig. 11) [5] [6]. Las bifidobacterias presentan un contenido en G+C superior al 50 % y, actualmente, se engloban dentro del filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria* en el orden *Bifidobacteriales* y la familia *Bifidobacteriaceae* e incluyen hasta el momento 48 especies/subespecies [7].

1.2. Metabolismo

Las BAL se caracterizan por presentar requerimientos nutricionales para su crecimiento como son vitaminas, aminoácidos o bases nitrogenadas. Sin embargo, pueden metabolizar un gran número de carbohidratos [8] y soportar situaciones de estrés (osmótico, oxidativo, ácido, etc.) que les permite adaptarse a una amplia variedad de hábitats [9]. Debido a su versatilidad nutricional podemos encontrarlas en alimentos (productos cárnicos fermentados, derivados lácteos, masa panadera, vegetales fermentados, ensilaje o bebidas), en plantas y en aguas residuales, así como en el tracto intestinal, genital y respiratorio del hombre y de otros animales [10] [11].

Las principales vías metabólicas en BAL [12], recogidas en la figura 21, son:

- a) Metabolismo de las hexosas (glucosa, fructosa, manosa y lactosa): por la vía homoláctica o heteroláctica. Mediante la vía homoláctica (Fig. 21, A), glicólisis o ruta de Embden-Meyerhof se forma fructosa-1,6-bifosfato que, por acción de una fructosa-1,6-bifosfato-aldolasa, se escinde dando lugar a gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. En este caso el único producto final es el ácido láctico (dos moléculas por cada molécula de hexosa). Mediante la vía heteroláctica (Fig. 21, B) o ruta del 6-fosfogluconato, donde tras unas primeras reacciones de deshidrogenación, que originan 6-fosfogluconato, se forma xilulosa-5-fosfato. Ésta, por acción de una xilulosa-5-fosfato fosfoacetolasa, se escinde dando lugar a gliceraldehido-3-fosfato y acetil fosfato. En esta vía los productos finales de la reacción por cada molécula de hexosa son una molécula de ácido láctico, una molécula de etanol y una molécula de anhídrido carbónico.

- b) Metabolismo de las pentosas (xilosa y ribosa). Tras su fosforilación son convertidas en ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato que pueden ser metabolizadas en la vía heteroláctica (Fig. 21, B). En este caso, debido que a que no existe una deshidrogenación previa, se forma únicamente ácido láctico y etanol (una molécula de cada por molécula de pentosa).

Podemos distinguir tres tipos de BAL [12] en función de las vías metabólicas:

- a) Homofermentativas obligadas. Sólo usan la ruta de la glicolisis, ya que son bacterias que carecen de fosfoctolasa y presentan una fructosa-1,6-bifosfato aldolasa constitutiva. Estas bacterias son incapaces de metabolizar pentosas.
- b) Heterofermentativas obligadas. Únicamente utilizan la ruta del 6-fosfogluconato para la fermentación de las hexosas, ya que presentan una fosfoctolasa constitutiva y carecen de fructosa-1,6-bifosfato aldolasa.
- c) Heterofermentativas facultativas. En este caso, las hexosas son fermentadas por la vía homoláctica y las pentosas por la vía heteroláctica. Estas bacterias presentan la ruta del 6-fosfogluconato reprimida en presencia de glucosa.

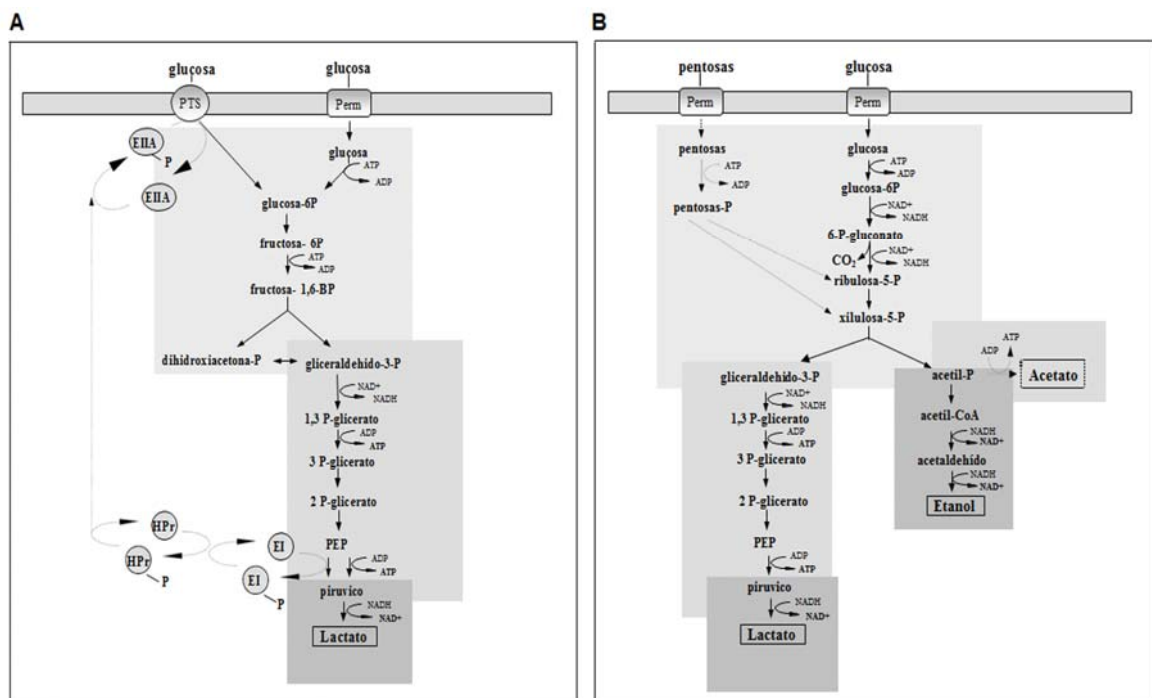


Figura 2I. (A) Vía homoláctica de fermentación de hexosas y (B) Vía heteroláctica de fermentación de hexosas y pentosas. Se muestran todos los sustratos y productos de las reacciones implicadas en las vías (sin detallar los enzimas que catalizan las reacciones), así como los mecanismos de transporte de azúcares: (i) sistema de fosfotransferencia de sustrato (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) y que conduce a la incorporación del azúcar en la forma fosforilada debido a una transferencia del fosfato desde el PEP, a la proteína HPr y posteriormente a la glucosa para generar glucosa-6-P, y (ii) sistemas de transporte de hexosas y pentosas mediados por permeasas.

(Adaptado de www.iata.csic.es/~btcgas/librobal/Vol%20I/Cap2_rutas%20ferm/RutasFerment.pdf)

Las BAL juegan un papel muy importante en la fermentación de productos como la leche, carne, bebidas alcohólicas y vegetales, no sólo por ayudar a su conservación (mediante la producción de ácido láctico, bacteriocinas o peróxido de hidrógeno), sino también mejorando sus características organolépticas (textura, aroma y sabor), proporcionándoles un valor nutricional añadido a los alimentos. Además, algunas BAL presentan características beneficiosas para la salud (propiedades probióticas) o capacidades metabólicas extraordinarias como son la producción de enzimas (amilasas, fitasas), vitaminas (folatos, riboflavina) o exopolisacáridos (EPS), de especial interés para la industria agroalimentaria y para la formulación de nuevos alimentos funcionales [13] [14] [15].

Dentro de las BAL hay algunas especies patógenas, como es el caso de *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus pyogenes*, pero la mayoría son reconocidas como GRAS “Generally Recognized As Safe” según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas o QPS “Qualified Presumption of Safety” según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, lo que facilita su aplicación industrial.

Así mismo, debido a su metabolismo, las BAL pueden ser responsables de la alteración de alimentos, mediante la formación de anhídrido carbónico en productos cárnicos envasados al vacío que lleva a la hinchazón del envase, produciendo ácidos orgánicos como acético o fórmico que dan lugar a malos olores o formando limos, debido a la producción de EPS, que confieren viscosidad en productos cárnicos y en bebidas como la sidra en la que son responsables del “ahilado o aceitado” [16] [17] [18].

1.3. Géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*

El género *Lactobacillus* es el que contiene mayor número de especies y el más heterogéneo. Incluye bacterias homofermentativas y heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas. Las especies que lo forman se encuentran en un amplio rango de ambientes: productos fermentados, plantas, cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina de animales y humanos. Por lo general, son las más tolerantes a la acidez y muchas de ellas se utilizan en la industria alimentaria [19]. *Lactobacillus*

sakei es una especie heterofermentativa facultativa que, aunque está presente en el tracto gastrointestinal de humanos, se encuentra principalmente relacionada con la fermentación de carnes y pescados, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos [20] [21] [22].

Las especies del género *Leuconostoc* son cocos heterofermentativos estrictos que forman ácido D-láctico. En el sector industrial son importantes en la fermentación de productos lácteos especialmente por su capacidad para producir diacetilo, en cárnicos y vegetales (pepino, kimchi, repollo, aceitunas) por la producción de ácido láctico. Sin embargo, también pueden ocasionar alteraciones en los alimentos como es la formación de limo (asociado con la producción de dextrano), hinchazón en los envases (por la formación de anhídrido carbónico) u olores no deseados [23] [24] [25]. Actualmente dicho género presenta 23 especies con 4 subespecies para *Lc. mesenteroides* (*cremoris*, *dextranicum*, *mesenteroides* y *suionicum*).

1.4. Las BAL y su potencial en acuicultura

Los microorganismos, entre ellos las bacterias lácticas, dan soporte a numerosos procesos y desarrollos biotecnológicos en el ámbito agroalimentario, siendo la acuicultura uno de los sectores de mayor impacto económico. La mayor producción de peces en la acuicultura europea se centra en 6 especies: salmones, truchas, carpas, besugos, lubinas y rodaballo [26]. Su producción intensiva, como la de otros animales, los somete a condiciones de estrés que debilitan su sistema inmunológico, aumentando la susceptibilidad a los patógenos y favoreciendo así la emergencia de enfermedades.

En la actualidad, las enfermedades infecciosas de origen vírico ocasionan grandes pérdidas económicas en acuicultura. Entre los virus de salmónidos más relevantes se encuentran el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) que son capaces de inducir persistencia y, en animales supervivientes a la infección, producir un estado de portador asintomático, que dificulta la erradicación del virus. Además, pueden producirse coinfecciones con

otros virus, como el de la anemia infecciosa del salmón, lo que conduce a un mayor impacto económico [27].

Las estrategias de control y prevención de enfermedades en acuicultura se han basado principalmente en el uso de antibióticos y también, aunque en menor medida, de vacunas. Los antibióticos son potentes herramientas para luchar contra las enfermedades infecciosas, pero su uso indiscriminado presenta grandes inconvenientes como son la aparición de resistencias [28] y la contaminación de los medios acuáticos generando importantes problemas de toxicidad [29]. Aunque existen vacunas de DNA que han resultado eficaces en ensayos a nivel de laboratorio [30], sólo una vacuna de DNA contra el VNHI [31] se está utilizando en acuicultura en Canadá. Por ello, se ha planteado la utilización de otras estrategias, que conlleven a prevenir y, en consecuencia, controlar las infecciones tanto bacterianas como virales.

Una de las estrategias actuales, es el uso de inmunoestimulantes [32], algunos de los cuales ya han sido comercializados y se están empleando en piscifactorías. Los β -glucanos procedentes de levaduras o bacterias son los más utilizados actualmente, individualmente o suplementados con otros compuestos, como por ejemplo la manosa, el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas o la vitamina C.

Por otra parte, existen evidencias de la influencia de la microbiota del tracto digestivo en la salud de los peces. Así, Rawls y cols. [33] comprobaron, mediante el uso de larvas de pez cebra, que existen genes que presentan una expresión diferencial dependiente de la composición en especies de su microbiota. Este resultado sugiere el uso de los probióticos también en acuicultura como una estrategia prometedora para prevenir las infecciones [34] [35].

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador [36]. Para ello, dichos microorganismos deben presentar una serie de características como son la producción de metabolitos o enzimas y la adhesión a células epiteliales que les permita competir con los posibles patógenos que colonicen el tracto intestinal.

Algunas especies de BAL pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, forman parte de la microbiota habitual de peces [37]. Además, algunas cepas ya han sido evaluadas como posibles bacterias probióticas debido a su efecto sobre la estimulación del sistema inmune, así como por su capacidad potencial para competir con patógenos [38]. De hecho existen actualmente en el mercado, cepas probióticas de *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp. y *Carnobacterium* sp. para su uso en acuicultura, en forma de suplementos alimentarios que incluyen una o varias de las cepas [39].

2. EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BAL

Algunas BAL son capaces de sintetizar polímeros de naturaleza glicosídica que bien pueden permanecer íntimamente unidos a la superficie celular, normalmente de forma covalente, formando una cápsula (CPS) o bien débilmente unidos, pudiendo ser secretados totalmente al exterior celular (EPS). Algunos EPS confieren, a las cepas que los producen, un fenotipo mucoso cuando crecen en medio sólido y su producción puede detectarse con el uso de una asa de siembra por la formación de filamentos [40] [41] (Fig. 3I).

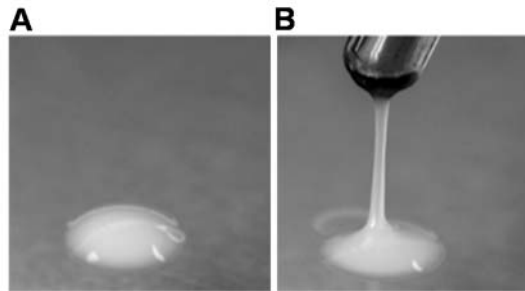


Figura 3I. Colonia de *P. parvulus* 2.6R, productora de EPS, antes (A) y después (B) de levantarse con un asa de siembra [42].

Aunque el papel ecológico de dichos EPS en las bacterias no ha sido elucidado, deben ser importantes para su supervivencia dado que las bacterias productoras realizan una fuerte inversión energética en su producción y no son utilizados normalmente como fuente de energía. Los estudios realizados apuntan a que dichos biopolímeros juegan un papel importante en: i) protección frente a condiciones ambientales adversas como son la desecación, fagocitosis, ataque de bacteriófagos,

antibióticos o compuestos tóxicos y estrés osmótico, actuando como una barrera física; ii) reconocimiento celular y iii) colonización de diversos ecosistemas, mediante la adhesión a superficies como la mucosa intestinal y mediante la formación de biopelículas [43].

Los EPS producidos por las BAL difieren en: i) composición, al presentar diferentes tipos de enlaces y unidades de monosacáridos; ii) estructura, con grado y tipo de ramificación diferentes; iii) masa molecular y iv) conformación estructural. En base a su composición se clasifican en homopolisacáridos (HoPS), constituidos por un único tipo de monosacárido, y heteropolisacáridos (HePS) formados por dos o más tipos de monosacáridos.

2.1. Homopolisacáridos

Los HoPS están formados por unidades repetidas a partir de un único tipo de monosacárido: glucosa, fructosa o, en menor proporción galactosa, lo que conduce a la formación de glucanos, fructanos o galactanos, respectivamente. Los HoPS alcanzan normalmente masas moleculares muy superiores a las de los HePS (de hasta 10^7 Da), siendo la longitud de la cadena principal, así como el grado y tipo de ramificación diferente entre unos tipos y otros (Tabla 2I).

Los HoPS más ampliamente producidos son los α -D-glucanos y han sido descritos en los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* [44] [45]. En función del carbono involucrado en el enlace de la cadena principal se clasifican en dextranos α -(1,6), mutanos α -(1,3), reuteranos α -(1,4) y alternanos α -(1,3) y α -(1,6) (Tabla 2I) y pueden presentar a su vez, diferentes tipos y grados de ramificación.

Por su parte, la producción de β -D-glucanos por las BAL es poco frecuente, si lo comparamos con los α -D-glucanos, y está limitada a un bajo número de cepas asociadas con la fermentación de bebidas alcohólicas como son *P. parvulus* IOEB8801 y *Oenococcus oeni* IOEB0205 de vino y *P. parvulus* 2.6R, CUPV1, CUPV22, *Lb. diolivorans* G77 y *O. oeni* I4 de sidra [46] [47] [48] [49] [50] [51]. Estas cepas producen un tipo de

β -D-glucano con enlaces β -(1,3) en la cadena principal y ramificaciones más o menos frecuentes en posición β -(1,2).

Los tipos de fructanos que han sido descritos son las inulinas β -(2,1), producidas exclusivamente por BAL, y los levanos β -(2,6), producidos tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas [52].

Tabla 2I. Tipos de HoPS producidos por BAL.

α-Glucanos			
Nombre	Enlace principal	Ramificaciones	Especies de BAL productoras
Glucano	α -(1,2)		<i>Lc. mesenteroides</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ; <i>Streptococcus sobrinus</i>
Mutano	α -(1,3)		<i>Lactobacillus reuteri</i> ; <i>Lc. mesenteroides</i> ; <i>Streptococcus downei</i> ; <i>Streptococcus mutans</i> ; <i>S. salivarius</i> ; <i>S. sobrinus</i>
Reuterano	α -(1,4)		<i>Lb. reuteri</i>
Dextrano	α -(1,6)	α -(1,2) α -(1,3) α -(1,4)	<i>Lactobacillus animalis</i> ; <i>Lactobacillus curvatus</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus hilgardii</i> ; <i>Lactobacillus parabuchneri</i> ; <i>Lb. reuteri</i> ; <i>Lb. sakei</i> ; <i>Lc. mesenteroides</i> ; <i>S. downei</i> ; <i>Streptococcus gordonii</i> ; <i>S. mutans</i> ; <i>S. salivarius</i> ; <i>S. sobrinus</i>
Alternano	α -(1,6), α -(1,3)		<i>Lc. mesenteroides</i>
β-Glucanos			
Nombre	Enlace principal	Ramificaciones	Especies de BAL productoras
Glucano	β -(1,3)	β -(1,2)	<i>Lactobacillus diolivorans</i> ; <i>Lactobacillus suebicus</i> ; <i>Oenococcus oeni</i> ; <i>Pediococcus damnosus</i> ; <i>Pediococcus parvulus</i>
Fructanos			
Nombre	Enlace principal	Ramificaciones	Especies de BAL productoras
Inulina	β -(2,1)		<i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Lactobacillus citreum</i> ; <i>Lb. reuteri</i> ; <i>Streptococcus criceti</i> ; <i>S. mutans</i> ; <i>Streptococcus ratti</i>
Levano	β -(2,6)		<i>Lactobacillus pontis</i> ; <i>Lb. reuteri</i> ; <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ; <i>Lc. mesenteroides</i> ; <i>Streptococcus frumenti</i> ; <i>S. mutans</i> ; <i>Streptococcus panis</i> ; <i>S. salivarius</i> ; <i>S. sobrinus</i>

Los enzimas responsables de la síntesis de los HoPS son las glicosil hidrolasas (GH), polimerasas extracelulares que utilizan la energía del enlace glicosídico de la sacarosa para unir glucosas o fructosas. En función de si sintetizan α -D-glucanos o fructanos se denominan glucansacararas (GS) o fructansacararas (FS), respectivamente. Además, según el tipo concreto de HoPS reciben nombres específicos establecidos por la Comisión de Enzimas (E.C.) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) en función de la reacción catalizada y la especificidad de sustrato. Así pues se distingue entre las dextransacararas (EC 2.4.1.5), las alternansacararas (EC 2.4.1.140), las inulosacararas (EC 2.4.1.9) y las levansacararas (EC 2.4.1.10). Las mutansacararas y las reuteransacararas se clasifican junto con las dextransacararas. En el caso concreto de los β -D-glucanos, su síntesis se produce utilizando como sustrato UDP-glucosa (uridina 5'-difosfato glucosa) por la acción de la glicosiltransferasa GTF, que posee varios dominios transmembrana [53] [54].

A pesar de que las GS y FS llevan a cabo reacciones similares a partir de un mismo sustrato, la sacarosa, existen grandes diferencias en cuanto a su secuencia de aminoácidos y estructura. Por ello, de acuerdo con la clasificación del sistema CAZY [55] el cual se basa en la similitud de secuencia (<http://www.cazy.org>), las GS forman parte de la familia 70 (GH70) y las FS son miembros de la familia 68 (GH68). Las GS por su parte han sido descritas únicamente en BAL, mientras que las FS están presentes en bacterias Gram positivas, Gram negativas, plantas y hongos.

Las GH presentan cuatro tipos de dominios estructurales en base a su secuencia de aminoácidos desde el extremo amino (N-terminal) al carboxilo (C-terminal): (i) un péptido señal; (ii) una región variable de función desconocida; (iii) un dominio catalítico bien conservado y (iv) una región C-terminal de anclaje a la pared celular en las FS, o una serie de repeticiones en tándem implicadas en la unión del glucano, conocidas como dominios de unión a glucano (GBD), en las GS [52] [56] [44].

2.2. Heteropolisacáridos

Los HePS están compuestos por dos o más monosacáridos diferentes (hasta 9), siendo los más frecuentes D-glucosa, D-galactosa y L-ramnosa y, en menor proporción, también pueden tener monosacáridos N-acetilados (N-acetil-galactosamina y N-acetil glucosamina), manosa, fucosa, ácido glucurónico, ribosa y sustituyentes no glucosídicos como fosfato, acetilo y glicerol [57] [58]. Pueden ser lineales o ramificados con una masa molecular variable de hasta 10^6 Da. Los géneros de BAL que los producen son *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* [59] [60].

Los genes implicados en la biosíntesis de los HePS se encuentran organizados en operones o agrupamientos génicos. Poseen una estructura funcional altamente conservada entre las BAL, similar a la de los genes implicados en la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido en enterobacterias, o al de la cápsula de patógenos como *S. pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* [61] [62] [63]. Pueden encontrarse en el cromosoma de BAL termófilas o en plásmidos de bacterias mesófilas [64]. Este tipo de estructura se ha descrito en especies como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* [65]. Los genes presentes en los operones se encuentran orientados en la misma dirección, obteniéndose un único transcrito cuyos productos génicos son proteínas reguladoras, proteínas implicadas en polimerización, en la síntesis de las unidades de repetición y en el transporte [66]. La mayor variabilidad se encuentra en los genes implicados en la síntesis de las unidades de repetición, lo que determinará la especificidad de los diferentes tipos de HePS. Dicha síntesis tiene lugar en el interior de la célula mediante la acción de proteínas denominadas glicosiltransferasas (GTF). El mecanismo que regula la polimerización de las unidades repetidas y la determinación de la longitud de la cadena no ha sido claramente identificado en todos los casos.

Las regiones implicadas en la síntesis de HePS y HoPS han sido localizadas en elementos génicos móviles, lo que permite la transferencia horizontal de dichos genes

y explicaría la inestabilidad fenotípica en algunas cepas productoras de HePS [2] así como la pérdida de expresión de algunas GS [67].

2.3. Detección y producción de EPS

Algunas BAL producen EPS fácilmente detectable ya que confieren al cultivo un fenotipo filamentoso (Fig. 3I) o mucoso. No obstante, existen muchos EPS que por ser producidos en pequeñas cantidades o por su propia naturaleza, pasan desapercibidos. Como alternativa, para la detección de BAL productoras de EPS, con frecuencia se aplica la reacción de polimerización en cadena (PCR) utilizando cebadores específicos cuya diana de actuación son genes relacionados con su síntesis [68] [69]. Se trata de una aproximación muy útil para rastrear una colección grande de bacterias y seleccionar las potencialmente productoras. Puesto que la detección de los genes no implica necesariamente la síntesis de EPS, es necesario poner de manifiesto su producción [70]. Para ello se utilizan técnicas como la microscopia electrónica [71] [72], que permiten su detección a nivel celular, o mediante métodos cuantitativos, como el método del fenol-sulfúrico [73], que permite la cuantificación del EPS a partir de los sobrenadantes bacterianos.

En cuanto al nivel de producción, generalmente para los HoPS sin optimizar las condiciones, es inferior a 1 g L^{-1} , siendo todavía menor para los HePS (desde 25 a 600 mg L^{-1}), con alguna excepción como es el caso de *Lb. rhamnosus* RW-9595M, que en condiciones óptimas puede producir 2 g L^{-1} de HePS [43]. Los bajos niveles de producción de los EPS por las BAL constituyen uno de los principales inconvenientes para su explotación industrial. Dado que dichos niveles vienen determinados por la composición del medio (fuentes de carbono, oligoelementos, vitaminas, nitrógeno, etc.) y las condiciones ambientales (temperatura, pH, oxígeno, etc.) [74], los esfuerzos industriales se basan en optimizar las condiciones de cultivo para obtener una mayor producción.

En el caso de los α -glucanos, los parámetros que se deben controlar para obtener mayores producciones son principalmente la concentración de sacarosa, el pH y el tiempo de incubación. En este sentido se ha obtenido 6 g L^{-1} de dextrano, tras 20 h

de incubación a 30 °C, con un 15 % de sacarosa y un pH de 7,0 para *Lc. mesenteroides* CMG713 [75] y de 50 g L⁻¹ para *Leuconostoc garlicum* PR [76]. Para los β-glucanos, la optimización de las condiciones de crecimiento es insuficiente. Concretamente, en el caso del β-glucano con configuración β-1,2 y ramificaciones β-1,3 sintetizado por la GTF codificada por el gen *gtf*, se abordó el aumento de producción mediante la expresión heteróloga del gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6 en *L. lactis* NZ9000. Para ello, se clonó el gen en multicopia bajo el control del promotor del gen lactocócico *nisA*, lo que permitió la expresión inducible del gen *gtf* presente en el plásmido pNGTF en las bacterias portadoras, mediante la adición de nisina al medio de cultivo [77] [54]. El EPS sintetizado por *L. lactis* NZ9000[pNGTF] recombinante posee la misma estructura que el sintetizado por *P. parvulus* 2.6, con unos niveles de producción ligeramente superiores (de 550 mg L⁻¹ frente a 350 mg L⁻¹), pero además con la cepa recombinante se obtiene un EPS más puro [78]. Esta producción todavía podría incrementarse optimizando las condiciones de cultivo de la cepa recombinante, por ejemplo mediante el crecimiento en fermentador con control de pH.

En el caso de los HePS, Vijayendra y Sharath [79], a partir de la cepa *Leuconostoc* sp. CFR-2181, aislada de un producto lácteo fermentado tradicional de la India, optimizaron las condiciones de cultivo utilizando un medio semisintético con sacarosa y obtuvieron concentraciones de 30 g L⁻¹ de HePS. Cabe mencionar que dicha estimación estaba referida a peso seco, sin proceso de purificación. Otra de las estrategias seguidas para conseguir la sobreproducción de HePS ha sido la clonación de varios de los genes de los operones implicados en su síntesis, en plásmidos vectores de expresión multicopia, principalmente en *L. lactis*, como es el caso del HePS de *Streptococcus thermophilus* Sfi39 [80].

En muchos alimentos la producción del EPS tiene lugar *in situ*, en las propias matrices alimentarias, como es el caso del yogur, un producto lácteo fermentado por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, las cuales producen 60-150 mg L⁻¹ y 30-890 mg L⁻¹ de HePS, respectivamente [81]. Así mismo, los HePS producidos *in situ* por *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* y *Lb. casei* en queso, contribuyen a conformar las características reológicas de los mismos [82]; en el kéfir, bebida típica de

los países del Este de Europa, los EPS tienen un papel fundamental en la proliferación de las poblaciones microbianas. En la fermentación intervienen BAL y levaduras que producen ácido láctico y etanol, respectivamente. Una de las especies características de este producto es *Lactobacillus kefiranofaciens* que metaboliza el etanol para producir kefirano, un biopolímero resistente a la degradación enzimática y que presenta potencial aplicación como espesante en productos fermentados [83]. Se han postulado para el kéfir algunas propiedades funcionales, como son la capacidad para modular la respuesta inmune, para disminuir las reacciones alérgicas o para inhibir el crecimiento tumoral [84].

La utilización de cultivos iniciadores productores de EPS en los yogures mejora la retención de agua incidiendo en la textura y proporcionando mayor consistencia al producto, sin alterar sus características organolépticas. Se trata de una alternativa a la adición de estabilizantes, prohibida en muchos países. Aunque el papel de los EPS puros no ha sido estudiado, de modo general se considera que la conformación del EPS y sus interacciones con la caseína son los puntos clave para mejorar la textura [14]. La selección de cepas productoras de EPS como iniciadores es una estrategia para ampliar la oferta de mercado a productos con un valor añadido, proporcionado por el EPS, ya sea mejorando su aspecto o su funcionalidad [57].

Como alternativa se ha abordado la producción de EPS *in vitro*, mediante enzimas inmovilizados, lo que permite su recuperación y reutilización, pudiéndose mejorar propiedades del enzima tales como estabilidad, actividad, especificidad y selectividad [85]. No obstante, su aplicación se ve limitada por la viscosidad del producto (EPS) dedicándose principalmente a la producción de isomaltooligosacáridos o galactooligosacáridos, mediante dextransacarasas o β -galactosidasas inmovilizadas, respectivamente [86].

2.4. Aislamiento, purificación y caracterización estructural de los EPS

El análisis estructural de los EPS, así como el estudio de su potencial bioactivo requieren de su purificación, es decir su separación física de los contaminantes. En el caso de los EPS, la purificación a partir de cultivos bacterianos requiere la eliminación

de los microorganismos y el resto de metabolitos producidos por los mismos, así como de los componentes del medio [40] [77].

El aislamiento del EPS puede realizarse a partir de cultivo en placa o en medio líquido. Hay EPS que solo se sintetizan en medios complejos o matrices alimentarias (por ejemplo la leche) lo que dificulta el aislamiento puesto que estos medios presentan compuestos, como son los glucomananos, que podrían copurificarse junto con el EPS. El primer paso de purificación es la eliminación de proteínas, mediante precipitación con ácido tricloroacético así como el tratamiento mediante proteasas, que son los métodos más comúnmente usados [87]. También, dependiendo de si el EPS es secretado al exterior o permanece covalente o débilmente unido a la pared celular, deben adaptarse los métodos de purificación. En el caso de ser secretado al exterior, los sobrenadantes de los cultivos son sometidos a ciclos de precipitación con etanol o acetona y, finalmente el EPS se disuelve en agua, en función de su solubilidad [88]. Cuando la producción del EPS es escasa se parte de cultivo en placa y se trata en condiciones suaves (por ejemplo con NaOH), para liberar el EPS débilmente unido a la pared, sin causar la lisis de las células. De este modo, por centrifugación se separan las células del sobrenadante y, posteriormente, se recupera el EPS mediante precipitación con acetona o alcohol [89]. En todos los casos, las preparaciones de EPS se dializan para eliminar los contaminantes de menor tamaño molecular, por lo general utilizando una membrana con un punto de corte de 12.000-14.000 Da, y a continuación, se liofilizan. Si se requiere mayor grado de purificación se continúa aplicando técnicas cromatografías, teniendo en cuenta la carga, solubilidad y peso molecular del EPS. Por ejemplo, para moléculas grandes o complejas, como es el caso de los EPS se usa la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), donde las moléculas se separan por su tamaño y no por su peso molecular.

Los EPS son polímeros polidispersos y, por tanto, sólo se puede determinar su peso molecular promedio. En algunos casos, según el tamaño del EPS (menor de 1×10^6 Da) puede aplicarse el fraccionamiento con SEC, usando una curva de calibrado con compuestos de tamaño conocido (azul dextrano, dextrano T500, T70, T10 y vitamina B12) [78].

La caracterización estructural de los EPS implica la utilización de técnicas específicas dirigidas a determinar la composición en monosacáridos, la configuración (α o β) y los tipos de enlace que los configuran. La composición de monosacáridos se determina mediante despolimerización del EPS por hidrólisis ácida, con trifluoroacético, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y, a continuación, los productos de hidrólisis se analizan por técnicas cromatográficas. El tipo de enlace suele determinarse mediante análisis de metilación, que implica la metilación del EPS, su hidrólisis y posterior reducción con borohidruro sódico deuterado (NaBD_4) y, finalmente, es acetilado para su análisis por cromatografía de líquido-gas seguida de espectrometría de masas [90].

2.5. Aplicaciones de los EPS

Entre las potenciales aplicaciones industriales de los EPS producidos por BAL está su papel como espesantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes gelificantes y/o viscosificantes [91]. Su presencia en alimentos mejora las propiedades reológicas y organolépticas de los productos fermentados (como por ejemplo los productos lácteos) [92]. Además, algunos presentan efectos beneficiosos para la salud, tales como la capacidad de disminuir el colesterol sanguíneo, reducir la formación de biopelículas, actividades antitumorales e inmunomoduladores o prebióticas [93].

A pesar del interés en la diversidad de EPS producidos por BAL (especialmente porque por su condición GRAS pueden considerarse aditivos de grado alimentario) todavía no se han explotado industrialmente [65]. Uno de los principales inconvenientes para su aplicación como aditivos alimentarios es el bajo nivel de producción en comparación con otros polisacáridos obtenidos de plantas o de otras bacterias no GRAS. Por ello, es imprescindible la puesta a punto de procedimientos encaminados a conseguir su crecimiento en medios de cultivo de bajo coste, mejorar el rendimiento de producción y la recuperación de los EPS, así como favorecer su producción *in situ*.

3. DEXTRANO Y DEXTRANSACARASAS

3.1. El dextrano

La palabra dextrano fue utilizada por primera vez en 1874 al estudiar la naturaleza del compuesto responsable de aportar viscosidad a los zumos de azúcar de remolacha [94], comportamiento que Pasteur en 1861 [95] ya había adjudicado a la acción de microorganismos y que, posteriormente en 1878, Tieghem lo denominó *Lc. mesenteroides* [96].

Los dextranos son HoPS de elevada masa molecular que presentan un 50 % de enlaces α -(1,6) en su cadena principal y diferentes tipos de ramificaciones, principalmente α -(1,3), pero también α -(1,2) o α -(1,4) en función de la cepa (Tabla 2I). Son producidos por especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus* y *Weisella* [97] [98] [99] [100]. El dextrano sintetizado por *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los primeros biopolímeros producidos a escala industrial con varias aplicaciones en biotecnología y medicina. Contiene un 95 % de enlaces α -(1,6) y un 5 % de ramificaciones α -(1,3) [101] [102] [52]. Los enzimas responsables de la síntesis de los dextranos se denominan dextransacarasas.

3.2. Las dextransacarasas

Las dextransacarasas (EC 2.4.1.5) son GS, por lo que pertenecen a la familia GH70, que catalizan la transferencia de residuos D-glucopyranosil de la sacarosa al dextrano, liberándose fructosa bajo la siguiente reacción química: $\text{sacarosa} + (1,6\text{-}\alpha\text{-D-glucosil})_n \rightarrow \text{D-fructosa} + (1,6\text{-}\alpha\text{-D-glucosil})_{n+1}$. Estos enzimas pueden ser secretados al medio o permanecer unidos a la superficie de la célula. Además, su síntesis puede ser constitutiva, como ocurre en especies de *Streptococcus* o inducible por sacarosa, como ocurre en *Lc. mesenteroides* [103], aunque se han aislado mutantes de esta especie cuya síntesis es constitutiva [104]. En el caso de *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F, se ha demostrado la síntesis de dicho enzima en bajos niveles, cuando crece en presencia de glucosa o fructosa en el medio [105]. Algunas de las características que se han determinado para las dextransacarasas son: i) peso molecular promedio de 170 kDa; ii)

punto isoeléctrico de 4,1; iii) constante de Michaelis-Mendel (K_m) para sacarosa de 12-16 mM; iv) pH óptimo entre 5 y 5,5; v) temperatura óptima de 30 °C y vi) requerimiento de calcio para la actividad enzimática [106].

Los dextranos no pueden ser sintetizados por las dextranacararas a partir de otro sustrato natural que no sea la sacarosa [107]. La energía entre el enlace que une las moléculas de glucosa y fructosa (16,7-20,9 kJ mol⁻¹) se utiliza para la síntesis del dextrano, sin necesidad de ATP u otros cofactores [108]. En presencia de aceptores eficientes, como son la maltosa y la isomaltosa, las dextranacararas sintetizan oligosacáridos [109]. Por ejemplo, *Lc. mesenteroides* NRRL B-1299 a partir de maltosa sintetiza oligosacáridos con enlaces α -(1,2), que son altamente resistentes al ataque de enzimas digestivos y se utilizan como prebióticos [110]. En presencia de fructosa, sintetizan un disacárido poco usual, la leucrosa.

Entre sus aplicaciones, las dextranacararas se utilizan como enzimas inmovilizados para la producción de isomaltooligosacáridos. El mejor rendimiento (de hasta el 90 %) en este proceso se obtiene por encapsulación en alginato [86], incluso mediante co-inmovilizaciones de dextranacararas y dextranasas, aprovechando la circunstancia de que comparten el mismo pH óptimo (5,4) [111] [112].

La presencia de sacarosa en el medio induce la síntesis de dextrano en *Lc. mesenteroides*, lo que da lugar a cultivos viscosos y complejos proteína-dextrano, ya que a la vez que se sintetiza el dextrano se produce el enzima. El dextrano provoca que el enzima se agregue y además, confiere viscosidad al sobrenadante de los cultivos, lo que dificulta su purificación. Varios métodos como la ultrafiltración, la precipitación con sal o con polietilenglicol, la cromatografía y la separación por fases y la combinación de estos métodos, se han utilizado para purificar estos enzimas. Como alternativa se utilizan mutantes constitutivos que sintetizan el enzima en ausencia de sacarosa evitándose así la formación de dextrano [113].

3.3. Producción de dextrano

Los dextranos producidos a nivel industrial proceden de cepas principalmente de la especie *Lc. mesenteroides* utilizando como parámetros optimizados: (i) un medio de cultivo con sacarosa, una fuente nitrógeno (por ejemplo peptona), fosfato, trazas de minerales y factores de crecimiento; (ii) pH de 6,7-7,2; (iii) temperatura de 25 °C y (iv) tiempo de fermentación entre 24 y 48 h [114].

En el proceso convencional de obtención del dextrano, tras la fermentación, las células se eliminan por centrifugación y el dextrano se recupera por precipitación con etanol. De esta forma se eliminan tanto las células como el enzima y, por tanto, es necesario volver a inocular con más microorganismo. Como alternativa, pueden utilizarse enzimas inmovilizados lo que permite su reutilización y facilita el control de las condiciones de producción, siendo producciones más reproducibles y limpias. En este caso, la producción se realizaría a pH 5-5,2, que es el óptimo de actividad enzimática. Sin embargo, la estrategia de inmovilización se utiliza con más frecuencia para la síntesis de oligosacáridos que para el dextrano [86].

3.4. Aplicaciones de los dextranos

El primer uso industrial de los dextranos bacterianos fue como sustituto de plasma sanguíneo. Los dextranos naturales de elevado peso molecular o con baja proporción de enlaces α -(1,6) tienen mayor probabilidad de provocar reacciones alérgicas [114], por lo que no pueden ser usados con este fin. Por ello, se utilizan dextranos de tamaño comprendido entre 40.000 y 100.000 Da, como son los producidos por *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F con pesos moleculares de 70.000, 60.000 y 40.000 Da. Otra de las aplicaciones de los dextranos es su papel como tamiz molecular. Se empezó a utilizar en 1959 por la empresa Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden), revolucionando la purificación y separación de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos). Comercialmente se conocen como Sephadex (SEparation PHarmacia DEXtran). Además en clínica se utiliza el dextrano hierro, para combatir la deficiencia de hierro en las anemias y el dextrano sulfato, por sus propiedades anticoagulantes similares a la heparina, y como antiviral contra el

virus del dengue [115] o el virus de la gripe [116]. En la industria alimentaria se utilizan en cremas, productos de panadería, jarabes de fructosa y helados [114]. Sin embargo, los dextranos no están aprobados explícitamente como aditivos alimentarios ni en Europa ni en Estados Unidos. En los últimos años se observa un aumento en el número de patentes basadas en bacterias productoras de dextrano así como en nuevas aplicaciones de los mismos como prebióticos, agentes bioactivos y/o agentes anticorrosión, en cosmética y en productos horneados.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral ha sido la caracterización, a nivel molecular, fisiológico, metabólico y fisicoquímico, de la producción de dextranos por BAL aisladas de productos cárnicos, y la funcionalidad biológica de dichos polímeros, como agentes antivirales e inmunoestimulantes.

Para ello, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer los procedimientos para detectar y demostrar la producción de dextranos, mediante su localización física a nivel celular y la caracterización molecular de dichos polímeros, utilizando como prototipos dos cepas de BAL aisladas de productos cárnicos, *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10.
2. Estudiar las bases genéticas de la producción de dextrano, mediante la identificación y localización de los genes responsables, el análisis de su expresión génica, y la caracterización estructural del enzima responsable.
3. Estudiar el crecimiento y la producción de dextrano, por *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, y establecer los procedimientos de purificación de dichos polímeros para el estudio de su actividad biológica.
4. Evaluar la actividad biológica de los dextranos en cuanto a su posible capacidad antiviral e inmunomoduladora en peces, utilizando para el estudio sistemas modelo de salmónidos, así como determinar la capacidad probiótica de las cepas productoras, utilizando como modelo el pez cebra.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material biológico

Las bacterias objeto de estudio en este trabajo han sido *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, aisladas de productos cárnicos envasados al vacío que fueron conservados en refrigeración durante 3 meses.

Las cepas bacterianas utilizadas para clonajes y extracción de plásmidos han sido *L. lactis* MG1363, cepa derivada de *L. lactis* 712 por curado de plásmidos [117], *Escherichia coli* DH5 α [pRCR] [118] y *E. coli* DH5 α [pRCR12] [119].

Peces zebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822) y la bacteria, *Vibrio anguillarum* NB10, serotipo O1 marcada con GFP y cedida por R. O'Toole y cols. [120] fueron utilizados por Iñaki Iturria bajo la dirección de Miguel Ángel Pardo en el centro tecnológico AZTI-Tecnalia (Derio, Vizcaya) para evaluar *in vivo* el potencial probiótico de *Lb. sakei* MN1.

Para los estudios antiinflamatorios, se utilizaron macrófagos peritoneales residentes extraídos de ratones C57BL/6 jóvenes.

Para llevar a cabo los estudios de actividad antiviral, se utilizaron el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI, ATCC VR714) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI, ATCC VR1318). Las líneas celulares utilizadas para la propagación de los virus fueron la línea BF-2 de *Lepomis macrochirus* (ATCC, CRL 1681), que se empleó para infectar con VNPI y la línea EPC de *Pimephales promelas* (ATCC, CRL 2872), que se empleó para infectar VNHI. Los ensayos *in vivo* se realizaron con alevines de trucha arco iris de 1,5 g, adquiridos en una granja de peces de interés comercial sin antecedentes de enfermedad viral.

1.2. Plásmidos

Los plásmidos de este trabajo y sus características más relevantes se detallan a continuación en la tabla 1M.

Tabla 1M. Plásmidos.

Plásmidos	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pRCR	3.960	Cm ^R	Vector para evaluar promotores que contiene el gen <i>mrfp</i> , que codifica la proteína fluorescente mCherry	[118]
pRCR12	4.600	Cm ^R	Derivado de pRCR. Contiene el promotor P _x del operon <i>malXCD</i> de <i>S. pneumoniae</i> JNR7/87 fusionado al gen <i>mrfp</i>	[119]
pRCR13	4.212	Cm ^R	Derivado de pRCR por clonación, corriente arriba de <i>mrfp</i> , de un fragmento del plásmido pMN1 de <i>Lb. sakei</i> MN1 amplificado con los cebadores P1F y P1R	Este trabajo
pRCR14	4.288	Cm ^R	Derivado de pRCR por clonación, corriente arriba de <i>mrfp</i> , de un fragmento del plásmido pMN1 de <i>Lb. sakei</i> MN1 amplificado con los cebadores P2F y P2R	Este trabajo
pRCR15	4298	Cm ^R	Derivado de pRCR por clonación, corriente arriba de <i>mrfp</i> , de un fragmento del plásmido pMN1 de <i>Lb. sakei</i> MN1 amplificado con los cebadores P3F y P3R	Este trabajo

Cm^R Resistencia (R) cloranfenicol (Cm) indica la presencia del gen *cat* en el plásmido, que codifica una acetil cloranfenicol transferasa, que inactiva el antibiótico por acetilación.

1.3. Oligonucleótidos

La empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) sintetizó y purificó los oligonucleótidos empleados para amplificación y secuenciación de DNA. La concentración de los mismos se determinó, tras su resuspensión en agua destilada estéril, midiendo la absorbancia a 258 nm (A_{258nm}) en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). El nombre de los oligonucleótidos más relevantes así como su secuencia y características se describen en la tabla 2M.

Tabla 2M. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia	Tamaño (nt)	Utilización
dsrF	5'-GATGATGGTCAATATATGGCAA-3'	22	Secuenciación y PCR. Preparación de la sonda para experimentos de hibridación de Southern
dsrR	5'-CTTGAACGATATTGTGGTGCCAA-3'	23	Secuenciación y PCR. Preparación de la sonda para experimentos de hibridación de Southern
P1F	5'-GAAGATCTTCTTTAGACCCCTCTTGAGGCT-3'	31	PCR. Clonaje de una región corriente arriba del gen <i>repA</i> de pMN1
P1R	5'-GCTCTAGAGCAGTATCATCACCTTTATCGCGC-3'	32	PCR. Clonaje de una región corriente arriba del gen <i>repA</i> de pMN1
P2F	5'-GGAAGATCTTCTCAGCAACAACGGTTAGCCT-3'	32	PCR. Clonaje de una región corriente arriba de la <i>orf1</i> de pMN1. RT-PCR. Síntesis del amplicón 2
P2R	5'-GCTCTAGAGCCGCCAGTGATCATATAACCGA-3'	31	PCR. Clonaje de una región corriente arriba de la <i>orf1</i> de pMN1
P3F	5'-GGAAGATCTTCCAAATTAACCAGAGACCGC-3'	30	PCR. Clonaje de una región corriente arriba del gen <i>dsrLS</i> . RT-PCR. Síntesis del amplicón 3
P3R	5'-GCTCTAGAGCTGGCTGGCTGGTAACTAGCA-3'	30	PCR. Clonaje de una región corriente arriba del gen <i>dsrLS</i>
rt1F	5'-AGCTGGGTTTCGATATGCTTTA-3'	21	RT-PCR. Síntesis del amplicón 1
rt2F	5'-ACGGCTGCGATCACTACTG-3'	19	RT-PCR. Síntesis del amplicón 4
rt3F	5'-AGCTTACGCTGTACCAAGGC-3'	21	RT-PCR. Síntesis del amplicón 5
rt1R	5'-CCCACCCCTCGCTCTTTA-3'	18	RT-PCR. Síntesis del amplicón 1
rt2R	5'-CGGTTGGCAAAGACGTTTTG-3'	20	RT-PCR. Síntesis del amplicón 2, 3 y 4
rt3R	5'-ATGGCTGGAGTAAAATGGATCAGCT-3'	25	RT-PCR. Síntesis del amplicón 5
IFN1F	5'-AAAAGTGTGATGGGAATATGAAA-3'	25	RT-qPCR. Expresión de IFN-1
IFN1R	5'-CGTTTCAGTCTCCTCTCAGGTT-3'	22	RT-qPCR. Expresión de IFN-1
IFNR	5'-CTGAAAGTCCACTATAAGATCTCCA-3'	25	RT-qPCR. Expresión de IFN- γ
IFN γ R	5'-CCCTGGACTGTGGTGTCAC-3'	19	RT-qPCR. Expresión de IFN- γ
EF-F	5'-GATCCAGAAGGAGGTCACCA-3'	20	RT-qPCR. Expresión del factor de elongación 1- α
EF-R	5'-TTACGTTGACCTTCCATCC-3'	20	RT-qPCR. Expresión del factor de elongación 1- α

1.4. Enzimas

Los enzimas de restricción (*Bgl*II y *Xba*I) y la DNA ligasa del bacteriófago T4 fueron suministrados por la casa comercial New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU). La RNasa A, la DNasa I y la lisozima fueron suministradas por la casa comercial Sigma-

Aldrich. La DNA polimerasa Phusion de alta fidelidad fue suministrada por la casa comercial Thermo Fisher Scientific.

1.5. Medios de cultivo

1.5.1. Medios de cultivo para *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

Lb. sakei MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 se cultivaron en medio MRS modificado [121] cuya composición es: 10 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, 8 g L⁻¹ de extracto de carne, 4 g L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g L⁻¹ de acetato sódico, 2 g L⁻¹ de fosfato dipotásico, 2 g L⁻¹ de citrato amónico, 1 g L⁻¹ de Tween 80, 2 g L⁻¹ de sulfato magnésico y 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganeso. El medio se suplementó con 2 % de glucosa (MRS_G) o 2 % de sacarosa (MRS_S). Además, para realizar cultivos en placa, se añadió agar bacteriológico (Pronadisa, Madrid, España) al 1,5 %.

Para el análisis, cuantificación y purificación de los EPS, las dos bacterias se cultivaron en medio definido CDM [122] cuya composición es: solución basal (2,61 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2,61 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,522 g L⁻¹ de citrato diamónico, 0,87 g L⁻¹ de acetato sódico, 0,2436 g L⁻¹ de cisteína-HCl, 0,261 g L⁻¹ de tirosina), bases nitrogenadas (10 mg L⁻¹ de cada una de las bases: adenina, guanina, uracilo y xantina), vitaminas (5 mg L⁻¹ de Na-p-aminobenzoato, 2,5 mg L⁻¹ de D-biotina, 1 mg L⁻¹ de ácido fólico, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg L⁻¹ de pantotenato cálcico, 2,5 mg L⁻¹ de piridoxamina-HCl, 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 1 mg L⁻¹ de riboflavina, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 1 mg L⁻¹ de vitamina B12 y 1 mg L⁻¹ de ácido DL- α -lipóico), aminoácidos (240 mg L⁻¹ de Ala, 120 mg L⁻¹ de Arg, 352 mg L⁻¹ de Asn, 416 mg L⁻¹ de Asp, 496 mg L⁻¹ de Glu, 384 mg L⁻¹ de Gln, 176 mg L⁻¹ de Gly, 152 mg L⁻¹ de His, 208 mg L⁻¹ de Ile, 456 mg L⁻¹ de Leu, 440 mg L⁻¹ de Lys, 124 mg L⁻¹ de Met, 276 mg L⁻¹ de Phe y 676 mg L⁻¹ de Pro) y minerales (200 mg L⁻¹ de MgCl₂, 38 mg L⁻¹ de CaCl₂ y 0,5 mg L⁻¹ de ZnSO₄). El medio se suplementó con 0,8 % de: glucosa (CDM_G), sacarosa (CDM_S), fructosa (CDM_F), lactosa (CDM_L) o maltosa (CDM_M).

Para seleccionar los transformantes de *Lb. sakei* MN1 conteniendo plásmidos recombinantes derivados del vector pRCR y para el crecimiento de *Lb. sakei*

MN1[pRCR12], *Lb. sakei* MN1[pRCR13], *Lb. sakei* MN1[pRCR14] y *Lb. sakei* MN1[pRCR15], los medios de cultivo se suplementaron con Cm a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.5.2. Medios de cultivo para *L. lactis* MG1363 y *E. coli* DH5 α

Para el crecimiento de las cepas de *L. lactis* se utilizó el medio ESTY (Pronadisa) suplementado con 0,5 % de glucosa (ESTYG) y se solidificó adicionando agar bacteriológico (Pronadisa) al 1,5 % para el cultivo en placa. Cuando la bacteria contenía plásmidos recombinantes o se seleccionaron transformantes, el medio se suplementó con Cm a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en el medio de Luria y Bertani (LB) suplementado con Cm a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.5.3. Medios de cultivo para las líneas celulares BF-2, EPC y para los macrófagos peritoneales de ratón

Las líneas celulares BF-2 de *Lepomis macrochirus* y EPC de *Pimephales promelas* se cultivaron en medio Leibovitz (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 100 U mL^{-1} de penicilina, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomina, 2 mM de L-glutamina y 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. El medio de mantenimiento fue el mismo, pero se disminuyó el porcentaje de suero al 2 %.

El cultivo de los macrófagos peritoneales residentes se realizó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al 5 % en medio RPMI completo (Gibco, Invitrogen) suplementado con un 5 % de suero fetal bovino y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina y estreptomina.

2. MÉTODOS GENERALES

2.1. Condiciones de cultivo y conservación de cepas

Las bacterias se cultivaron en los medios indicados en el apartado 1.5 de este capítulo. En el caso de *L. lactis* MG1363, *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 la incubación se realizó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en baño termostático sin agitación o en estufa. En el caso de *E. coli* DH5 α a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y, para el cultivo en medio líquido, con agitación a 350 rpm

en baño termostatzado. El crecimiento de los cultivos se monitorizó por turbidimetría, midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600nm}) para *Lc. mesenteroides* RTF10, *Lb. sakei* MN1 y *E. coli* DH5 α y, midiendo la absorbancia a 660 nm (A_{660nm}), para *L. lactis* MG1363 empleando un espectrofotómetro Spectronic 200 (Thermo Fisher Scientific). Las cepas se conservaron en sus respectivos medios de crecimiento suplementados con un 20 % (v/v) de glicerol y se almacenaron a -80 °C.

2.2. Obtención de preparaciones de DNA

2.2.1. Preparaciones de DNA genómico de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

Para el aislamiento de DNA genómico, se utilizaron cultivos crecidos en medio líquido hasta una A_{600nm} de 2,0. Las células procedentes de 1 mL de cultivo se sedimentaron por centrifugación a 15.700 x *g* a 4 °C durante 10 min y se lavaron con 0,5 mL del tampón PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, y KCl 3 mM) pH 7,4. A continuación, se centrifugaron a 15.700 x *g* a 4 °C durante 10 min para su sedimentación y se resuspendieron en 0,1 mL de una solución que contenía 25 % de sacarosa, 50 mM de tampón Tris (pH 8,0), 0,1 M de NaCl, 30 mg mL⁻¹ de lisozima, 240 U mL⁻¹ de mutanolisina y 80 μ g mL⁻¹ de RNasa A. Las células se incubaron durante 15 min a 37 °C para conseguir su lisis. A continuación, los extractos se trataron con 10 μ L de SDS al 10 % durante 2 min a 21 °C y se pasaron tres veces a través de una aguja de 25 GA (0,5 x 16 mm) para fragmentar el DNA genómico y así reducir la viscosidad de los extractos. Las muestras se desproteneizaron realizando tres extracciones con 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a 21 °C durante 5 min seguidas de centrifugaciones a 15.700 x *g* a 21 °C durante 10 min. Los DNA plasmídicos y cromosómicos presentes en la fase acuosa superior se precipitaron mediante la adición de 1 mL de etanol absoluto y 40 μ L de acetato sódico 3 M (pH 7,0) a dicha fase, almacenamiento a -20 °C durante 12 h y posterior centrifugación a 11.269 x *g* a -10 °C durante 45 min. El DNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y después de una centrifugación a 11.269 x *g* a -10 °C durante 30 min, se resuspendieron finalmente en 100 μ L de 10 mM del tampón Tris (pH 8,0).

2.2.2. Preparaciones de DNA plasmídico de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

Para el aislamiento de DNA plasmídico total, las bacterias se crecieron hasta una $A_{600\text{nm}}$ de 2,0. Las células procedentes de 10 mL de cultivo se sedimentaron por centrifugación a $15.700 \times g$ a 4°C durante 10 min y se resuspendieron en 5 mL de tampón PBS (pH 7,4). A continuación, se centrifugaron a $15.700 \times g$ a 4°C durante 10 min para su sedimentación y se resuspendieron en 2 mL de una solución que contenía 25 % de sacarosa, 30 mg mL^{-1} de lisozima, 120 U mL^{-1} de mutanolisina y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNasa A. Para llevar a cabo la lisis, las células se incubaron durante 15 min a 37°C . Posteriormente, los restos celulares y el DNA cromosómico se eliminaron de los extractos mediante un tratamiento secuencial de 7 min a 21°C con 4 mL de una solución que contenía 0,2 N de NaOH, 3 % de SDS y 3 mL de 3 M de acetato sódico (pH 4,8) y centrifugación a $15.700 \times g$ a 4°C durante 15 min. El DNA plasmídico presente en el sobrenadante se precipitó y concentró por la adición de 6,5 mL de isopropanol, centrifugación a $15.700 \times g$ a 4°C durante 15 min y resuspensión del precipitado en 3,2 mL de agua destilada estéril. La preparación de DNA se desproteinizó por tratamiento con 2 mL de una solución que contenía 7,5 M de acetato amónico y $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A continuación, se adicionó 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a $15.700 \times g$ a 21°C durante 10 min. El DNA plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 1 mL de etanol absoluto, almacenamiento a -20°C durante 12 h y centrifugación a $11.269 \times g$ durante 45 min a -10°C . Al DNA precipitado se añadió 1 mL de etanol al 70 %, se centrifugó a $11.269 \times g$ a -10°C durante 30 min y se resuspendió finalmente en 100 μL de 10 mM de tampón Tris (pH 8,0).

2.2.3. Preparaciones de DNA plasmídico de *L. lactis* MG1363 y *E. coli* DH5 α

Las preparaciones de DNA plasmídico de las distintas cepas de *L. lactis* y *E. coli* se realizaron siguiendo las instrucciones del kit “High pure plasmid isolation” de Roche (Basilea, Suiza) en la escala “Mini” o el “JetStar 2.0 Plasmid Purification” de Genomed (Löhne, Alemania) en la escala “Maxi” según la cantidad de DNA requerida. En el caso de las cepas de *L. lactis* se añadieron 30 mg mL^{-1} de lisozima al tampón de

resuspensión, incubándose la mezcla 30 min a 37 °C antes de la adición del tampón de lisis del kit correspondiente.

2.3. Obtención de preparaciones de RNA de cultivos bacterianos

Los RNA totales se aislaron utilizando el kit “FastRNA Pro Blue” de QBIogene (Virginia, EEUU) y se sometieron a electroforesis en geles horizontales de agarosa a una concentración del 0,8 % con un voltaje de 135 V durante 20 min, para comprobar la integridad y pureza de los rRNAs. La concentración de RNA total se determinó con un fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Para asegurar la ausencia de DNA, las preparaciones de RNA se incubaron 1 h a 37 °C con 1 µg mL⁻¹ de DNasa I (Sigma-Aldrich) y a continuación se purificaron siguiendo el protocolo “RNA Cleanup” del kit “RNeasy Midi” de Quiagen (Venlo, Países Bajos). Además, las muestras se sometieron tres veces a tratamiento con fenol caliente, consistente en la adición de fenol ácido durante 5 min a 70 °C con agitación y posterior centrifugación a 15.700 x *g* a 21 °C durante 5 min. A los sobrenadantes recogidos se les adicionó 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 15.700 x *g* a 21 °C durante 10 min. El RNA presente en la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 3 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M (pH 7,0), almacenamiento a -20 °C durante 12 h y posterior centrifugación a 11.269 x *g* a -10 °C durante 45 min. El RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75 % en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y después de una centrifugación a 11.269 x *g* a -10 °C durante 20 min, se resuspendió finalmente en 200 µL de agua tratada con DEPC.

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación por PCR se realizó siguiendo las indicaciones de la casa comercial Thermo Fisher Scientific para la DNA polimerasa Phusion. La reacción se llevo a cabo en un volumen de 50 µL, empleando como molde 100 ng de DNA genómico o 10 ng de de DNA plasmídico, y con una concentración final de: 0,5 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (dATP, dGTP,

dCTP y dTTP), tampón 1X "Phusion HF" y 0,02 U μL^{-1} de la DNA polimerasa Phusion. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador TC-512 (Techne, Stone, Reino Unido).

Para la amplificación de los genes *dsr* con los cebadores *dsrF* y *dsrR* (Tabla 2M), las condiciones fueron las siguientes: i) 1 ciclo de desnaturalización durante 30 s a 98 °C; ii) 35 ciclos de: 10 s a 98 °C, 20 s a 64,4 °C y 30 s a 72 °C y iii) una extensión final de 10 min a 72 °C.

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR (apartado 3.5 de este capítulo) y sintetizar los amplicones para realizar su clonaje en pPCR (apartado 3.6 de este capítulo) se utilizaron las mismas condiciones salvo que en el caso de las reacciones de RT-PCR se realizaron 30 ciclos de amplificación. La temperatura de hibridación de los cebadores fue la recomendada para cada pareja de oligonucleótidos (Tabla 2M) por la casa comercial Thermo Fisher Scientific para la DNA polimerasa Phusion (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>).

2.5. Electroforesis de DNA

Alícuotas de los productos de amplificación suplementados con tampón de carga SBE (sacarosa 10 %, azul de bromofenol 0,025 % y EDTA 0,85 mM) se sometieron de forma rutinaria a electroforesis en geles horizontales de agarosa a una concentración del 0,8 % utilizando tampón TAE 0,5X (Tris Base 20 mM pH 8,3, CH_3COOH 10 mM y EDTA 0,5 mM). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón TAE 0,5X. Las dimensiones de los geles, así como la duración de la electroforesis variaron según las características del DNA a analizar. Los DNAs se visualizaron mediante tinción con GelRed 1X (Biotium Inc., Hayward, CA, EEUU) y las imágenes fueron capturadas y digitalizadas utilizando el sistema de documentación de geles GelDoc 200 de Bio-Rad (West Berkeley, California, EEUU) que consiste en un transiluminador de luz UV de onda corta (254 nm) y una cámara digital. Dichas imágenes se analizaron con el programa Quantity One 4.5.2 de Bio-Rad.

2.6. Purificación y cuantificación de fragmentos de DNA

Para calcular la concentración de fragmentos de DNA previamente fraccionados en geles de agarosa al 0,8 %, se comparó la intensidad de las bandas de DNA con la de fragmentos de tamaño similar y concentración conocida del marcador de DNA SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec, Osaka, Japón). La purificación de los fragmentos de DNA se realizó mediante el método de extracción por fenol [123].

2.7. Secuenciación de DNA

La concentración de DNA y oligonucleótidos necesarios para la secuenciación de las muestras se ajustaron siguiendo las indicaciones de la empresa Secugen (Madrid, España) para cada tipo de DNA. La determinación de las diferentes secuencias por el método de los dideoxiribonucleótidos, así como la secuenciación del gen rRNA 16S a partir de colonias crecidas en placa, también se realizaron en dicha empresa. Para la secuenciación del plásmido pMN1 de *Lb. sakei* MN1, se utilizó el procedimiento de “walking” una vez que se secuenció un amplicón que contenía una región de *dsrLS*, generado mediante la utilización de los oligonucleótidos *dsrF* y *dsrR* (Tabla 2M). Para la secuenciación del plásmido, previamente se realizó en la empresa Secugen una amplificación de DNA mediante desplazamiento de banda en una reacción catalizada por la DNA polimerasa del bacteriófago ϕ 29 y utilizando como sustrato una preparación de DNA plasmídico total de *Lb. sakei* MN1 y hexámeros conteniendo secuencias al azar.

2.8. Técnicas de clonaje de DNA: células competentes y transformación

El vector pRCR y los amplicones generados utilizando como sustrato preparaciones de DNA plasmídico total de *Lb. sakei* MN1, se trataron con los enzimas de restricción (*Bgl*II y *Xba*I) de forma secuencial, teniendo en cuenta las especificaciones de la casa comercial New England Biolabs. Entre una digestión y otra, las muestras fueron tratadas con fenol y precipitadas con etanol [124]. El vector y los amplicones digeridos se ligaron utilizando la DNA ligasa del bacteriófago T4 [123].

L. lactis MG1363 y *Lb. sakei* MN1 se transformaron con los plásmidos o las ligaciones por electroporación siguiendo los métodos descritos por Dornan y Collins [125] y Berthier y cols. [126], respectivamente. Para realizar la electroporación se empleó el equipo de Bio-Rad “Gene Pulser” acoplado al “Pulse controller”, necesario para electroporar bacterias. Las condiciones de electroporación fueron: 25 μ F, 2,5 kV y 200 Ω para *L. lactis* MG1363 y 25 μ F, 1,8 kV y 600 Ω para *Lb. sakei* MN1 en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad).

Las células de *L. lactis* MG1363, después del pulso eléctrico se diluyeron en medio ESTYG suplementado con sacarosa al 1 % y las de *Lb. sakei* MN1 en medio MRSG suplementado con 1 % de glucosa y 80 mM de MgCl₂. En todos los casos, las células se incubaron 2 h a 30 °C, antes de procederse a la detección de los transformantes en medio sólido por selección de resistencia al antibiótico Cm a 5 μ g mL⁻¹.

2.9. Fermentación de azúcares

Los patrones de fermentación de carbohidratos de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 se determinaron mediante el sistema API 50 CH (bioMérieux, Capronne, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas se realizaron tras 48 h de incubación a 30 °C. El ensayo de fermentación de cada uno de los azúcares se dio como positivo cuando se detectó un cambio de coloración de púrpura a amarillo o, en el ensayo de esulina, de púrpura a negro. El cambio de coloración es debido a un viraje del pH como consecuencia de la producción de ácido láctico por la actividad metabólica de las bacterias.

2.10. Microscopía electrónica de transmisión

Para la localización de EPS a nivel celular, se empleó la microscopía electrónica de transmisión usando el método de tinción con rojo de rutenio [127]. Este método se adaptó para la detección de EPS directamente de colonias aisladas crecidas en placas de MRSG y MRSS, en colaboración con la sección de microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE, UV, Valencia). Para ello, se cubrió la

placa que contenía las colonias con una solución de agarosa al 2 % fundida. Tras su solidificación, se cortó la porción que contenía una sola colonia, con un bisturí, para su posterior análisis. Las células presentes en las muestras recién preparadas, se fijaron con 2,5 % de glutaraldehído en tampón de cacodilato de sodio al 0,1 M (pH 7,4) y se cortaron secciones. Las células incluidas en las secciones fueron post-fijadas en 1,5 % de OsO₄ en un tampón de cacodilato sódico al 0,1 M (pH 7,4) que contenía 0,075 % de rojo de rutenio. A continuación, se lavaron tres veces en un tampón de cacodilato sódico al 0,1 M (pH 7,4), se deshidrataron a través de series de soluciones acuosas de etanol graduado (30, 50, 70, 95, y 100 % de etanol, 5 min cada uno), y se incluyeron en resina blanca LR. Se realizaron secciones de 60 nm con un cuchillo de diamante de Diatome, utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut UC6 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania), y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 (JEOL, Peabody, EEUU) después de la tinción con acetato de uranilo. Las imágenes fueron capturadas y digitalizadas utilizando una cámara MegaView III (Olympus, Münster, Alemania) con el Software "AnalySIS".

2.11. Microscopía confocal láser de barrido

Para la observación de células vivas, sin ningún tipo de fijación se usó el microscopio confocal Leica AF6000 LX-DMI6000B (Leica Microsystems). Este microscopio permite la observación de células en contraste de fase, para lo que se utilizó el objetivo de 100X, y con fluorescencia, para lo que se usó una lámpara de mercurio de 100 W y los filtros de excitación (BP 620/60) y de emisión (BP 700/75) correspondientes al canal del espectro rojo. Los parámetros de fluorescencia que se fijaron en todos los casos fueron de exposición 1, ganancia 300 e intensidad 5. El programa para la obtención y procesado de imágenes fue el LAS AF Core (Leica Microsystems).

2.12. Cuantificación de EPS

La cuantificación de EPS se realizó por duplicado, a partir de sobrenadantes de los cultivos, tras eliminar las células por centrifugación a 9.300 x g durante 10 min a 4 °C. Para la precipitación de los EPS, se partió de 0,5 mL de sobrenadante y se añadió a

cada muestra 1,5 mL de etanol absoluto manteniendo la mezcla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h. Los EPS precipitados se recuperaron mediante centrifugación a $9.300 \times g$ durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavaron dos veces con etanol al 80 % frío y se centrifugaron de nuevo a $9.300 \times g$ durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los EPS sedimentados, se secaron al aire y, a continuación, se resuspendieron en agua destilada estéril, calentando durante 10 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para facilitar su solubilización. El contenido total de azúcares se determinó mediante el método del fenol-sulfúrico [73]. A 0,5 mL de solución de EPS se añadió, de forma secuencial, 0,5 mL de fenol al 5 % y 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Inmediatamente las muestras se incubaron a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min en baño y transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo mediante la colocación de las muestras en hielo. Para llevar a cabo la cuantificación, se midió la absorción a 490 nm ($A_{490\text{nm}}$) y se compararon los valores obtenidos con los de una recta de calibrado obtenida con concentraciones conocidas de D-glucosa (Fig. 1M).

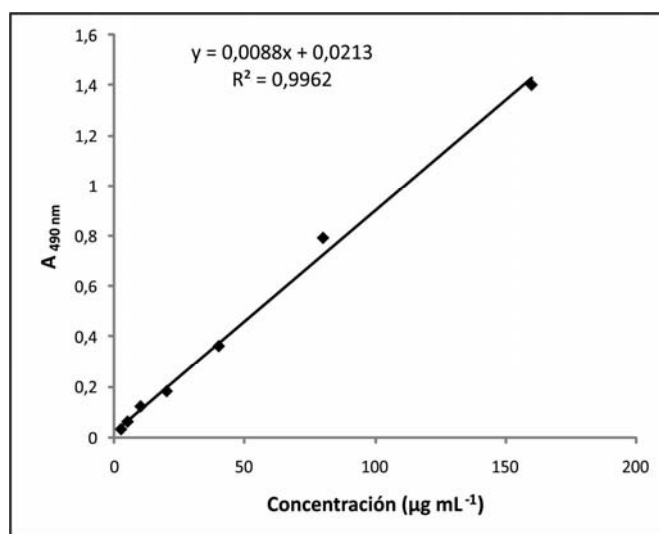


Figura 1M. Recta de calibrado de D-glucosa. Representación de los valores de $A_{490\text{nm}}$ obtenidos mediante el método del fenol-sulfúrico con concentraciones conocidas de D-glucosa.

2.13. Determinación de la concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico

Para determinar la concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico, se añadió, a las muestras de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, mio-inositol como patrón interno ($100\text{ }\mu\text{g}$) y se liofilizaron. El mio-inositol presenta un solo pico cromatográfico que no interfiere con los de los analitos presentes en las muestras.

Para la derivatización, se añadió 185 μL de una solución de cloruro de hidroxilamina en piridina al 2,5 % durante 30 min a 70 °C, para formar las oximas de los azúcares. Transcurrido este tiempo, se añadió 115 μL de bis-trimetilsilil trifluoroacetamida durante 45 min a 80 °C, para formar los derivados trimetilsililados.

El análisis de los azúcares se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas en un instrumento CG-EM 7980A-5975C Agilent (Santa Clara, California, EEUU), equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm y 0,2 μm espesor de la película), un inyector “*split/splitless*” y con helio como gas portador. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 275 °C. Las muestras (1 μL) se inyectaron con una relación de “*split*” de 1:50 con una temperatura de programa de: i) 80 °C durante 4 min; ii) 15 °C min^{-1} hasta 270 °C y iii) 30 °C min^{-1} hasta 310 °C (2 min). El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con el de mezclas de patrones en distinta concentración con una cantidad constante de patrón interno. La cuantificación se realizó determinando el área de los picos.

2.14. Métodos bioinformáticos

Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando los programas Chromas 1.45 (Conor Mc Carthy, Griffith University, Queensland, Australia) y DNASTAR 5.0.1 (Lasergene, Madison, EEUU). Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa OLIGO 3.4 (MedProbe, Oslo, Noruega).

La búsqueda de homología para los genes y proteínas, así como sus porcentajes de identidad detallados a lo largo de este trabajo se realizaron con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y los alineamientos de secuencias primarias mediante los programas MegAling (DNASTAR 5.0.1) y CLUSTALX 2.1.

Los estudios de la proteína DsrLS se realizaron en colaboración con el Dr. Mario García Lacoba del Servicio de Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).

El modelo estructural parcial de la proteína DsrLS (residuos 396-1395), se construyó a partir de la estructura tridimensional (3D) de la proteína GTF180-ΔN y se realizó en base a la homología de las secuencias primarias con el programa I-TASSER [128] ejecutado en el servidor <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). La superposición del modelo estructural de la DsrLS y de la proteína GTF180-ΔN se realizó con el programa CE [129] ejecutado en el servidor <http://source.rcsb.org>.

El modelado del fragmento C-terminal de DsrLS (residuos 1422-1767) se realizó, en base a la predicción de plegamiento de éste, mediante métodos de “threading” implementados por el servidor I-TASSER. Se identificó como mejor modelo 3D la cadena A de la proteína PcsB de *S. pneumoniae*. El alineamiento estructural del modelo de DsrLS y de PcsB se realizó con el algoritmo TM-align. Los diagramas “helical Wheel” se obtuvieron utilizando el programa PEPWHEEL del paquete de análisis EMBOSS [130].

3. MÉTODOS ESPECÍFICOS

3.1. Detección del crecimiento, pH, azúcares y producción de EPS por *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10.

La detección de EPS se realizó mediante el crecimiento de las bacterias en placas de MRS (MRSG y MRSS) o CDM (CDMG y CDMS) durante 48 h a 30 °C y mediante microscopía electrónica de transmisión (apartado 2.10 de este capítulo). Las placas se fotografiaron con una cámara FinePix S5 Pro (Fujifilm, Tokio, Japón) con un objetivo AF Micro Nikkor de 60 mm en el Servicio de Fotografía del CIB.

Se analizaron los niveles de producción de EPS tal y como se describe a continuación. *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 se cultivaron en medio MRSS hasta una A_{600nm} de 2,0, se sedimentaron por centrifugación a $9.300 \times g$ durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron en tampón PBS (pH 7,4) y después de sedimentarse nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en el volumen inicial de medio MRSS fresco y se diluyeron 1:100 en 100 mL de medio CDMS. Las fermentaciones se realizaron partiendo de tres cultivos independientes crecidos en baño termostático sin agitación ni control de pH, durante 13 h a 30 °C. Se tomaron muestras cada hora,

tras dos horas de preincubación, para monitorizar el crecimiento, medir el pH extracelular y cuantificar la producción de EPS mediante el método del fenol-sulfúrico (apartado 2.12 de este capítulo). Además, también se determinó la concentración de glucosa, sacarosa, fructosa y ácido láctico mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (apartado 2.13 de este capítulo).

La producción de EPS en diferentes azúcares se ensayó previo cultivo en medio MRSG de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 hasta una A_{600nm} de 2,0. A continuación, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a $9.300 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se resuspendieron en tampón PBS (pH 7,4) y después de sedimentarse nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en el volumen inicial de medio MRSG fresco. Finalmente se diluyeron 1:100 en 10 mL de medio CDM con los diferentes azúcares (CDMG, CDMS, CDMF, CDML y CDMM) durante 24 h a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La producción de EPS se cuantificó mediante el método del fenol-sulfúrico (apartado 2.12 de este capítulo).

3.2. Análisis y caracterización estructural de los EPS

3.2.1. Aislamiento y purificación

Lb. sakei MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 se cultivaron en medio MRSS hasta una A_{600nm} de 2,0, se sedimentaron por centrifugación a $9.300 \times g$ durante 10 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se resuspendieron en tampón PBS (pH 7,4) y después de sedimentarse nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en el volumen inicial de medio MRSS fresco y se diluyeron 1:100 en 1 L de medio CDMS. Las bacterias se cultivaron a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño termoestabilizado sin agitación ni control de pH, hasta alcanzar el final de la fase exponencial. En ese momento, las células se eliminaron mediante centrifugación a $16.000 \times g$ durante 30 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se añadió a cada sobrenadante un volumen de etanol absoluto para precipitar el EPS presente en él y se mantuvieron durante 24 h a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se centrifugaron las mezclas a $10.651 \times g$ durante 60 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y los precipitados conteniendo los EPS se secaron y resuspendieron finalmente en agua destilada estéril. Se realizó una diálisis de los EPS, durante 2 días, con varios cambios de agua destilada y ultrapura, para eliminar los contaminantes de

bajo peso molecular, usando membranas de 12-14 kDa. Los EPS se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se liofilizaron durante 3 días y se mantuvieron a temperatura ambiente.

EL EPS liofilizado se resuspendió en agua ultrapura estéril y se centrifugó para eliminar cualquier material insoluble. El sobrenadante se cargó en una columna preparativa de Sepharose CL 6B (60 cm x 2,6 cm) equilibrada con agua ultrapura, que asimismo se utilizó como eluyente ($0,3\text{ mL min}^{-1}$). Las fracciones recogidas se concentraron en un rotavapor, se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizaron durante 3 días.

3.2.2. Análisis de la pureza de las preparaciones

Tanto los sobrenadantes de los cultivos (después de eliminar las células por centrifugación), como los liófilos obtenidos antes y después de la purificación fueron evaluados. La pureza de los liófilos se evaluó a partir de una suspensión de 2 mg mL^{-1} de cada muestra en agua destilada estéril. Se evaluó el contenido en azúcares, mediante el método del fenol-sulfúrico [73], y la contaminación de las preparaciones con DNA, RNA y proteínas se determinó utilizando los ensayos de cuantificación fluorescente correspondientes y el fluorímetro 2.0 Qubit®, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Invitrogen). El límite de detección de esta técnica es $0,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA, 20 ng mL^{-1} de RNA y $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas.

3.2.3. Análisis de la masa molecular

La masa molecular de los EPS se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna preparativa de Sepharose CL 6B (60 cm x 2,6 cm) equilibrada con agua ultrapura, que asimismo se utilizó como eluyente ($0,3\text{ mL min}^{-1}$). La curva de calibrado se obtuvo mediante el uso de los siguientes estándares: Azul de dextrano y los dextrans: T500, T70 y T10 (Pharmacia fine chemicals AB Uppsala, Suecia), así como la vitamina B12 (Sigma-Aldrich).

La masa molecular de los EPS y del dextrano comercial T2000 (Pharmacia) también fue analizada por resonancia magnética nuclear (RMN) mediante la técnica de espectroscopía de difusión ordenada (DOSY). Para ello, se disolvieron 15 mg de los polisacáridos en 0,5 mL de D_2O . Los análisis de DOSY se realizaron con el protocolo

estándar Bruker DOSY a 298 K con el programa de pulsos ledbpg2s en un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Treinta y dos espectros de protón (^1H) monodimensionales (1D) se recogieron con un gradiente de duración de $\delta=4$ ms y con un tiempo de eco de $\Delta=400$ ms.

3.2.4. Determinación de la composición de monosacáridos

Con el fin de determinar la composición de monosacáridos, los EPS se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 3M durante 1 h a 121 °C. Los monosacáridos liberados se convirtieron en sus correspondientes acetatos de alditol mediante su reducción con NaBH_4 y acetilación posterior [131]. Los azúcares neutros se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía de líquidos y gases. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un instrumento CG-EM 7980A-5975C Agilent, equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,2 μm espesor de la película), un inyector “*split/splitless*” y con helio como gas portador. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250 °C. Las muestras (1 μL) se inyectaron con una relación de “*Split*” de 1:50 con una temperatura de programa de: i) 160 °C durante 5 min; ii) 3,5 °C min^{-1} hasta 205 °C y iii) 210 °C durante 0,5 min. El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con el de patrones analizados en idénticas condiciones, usando como patrón interno inositol. El contenido en fosfato se dedujo de la determinación de fosfato inorgánico en un 5500 Inductively Couple Plasma Instrument (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos patrón.

3.2.5. Determinación del tipo de sustitución: análisis por metilación

Los EPS producidos se metilaron mediante el método de Ciacanu y Kerek [132], modificado por Needs y Selvendran [133]. Los EPS metilados se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 3M durante 1 h a 121 °C para obtener monosacáridos parcialmente metilados que se derivatizaron para dar lugar a sus correspondientes acetatoalditol parcialmente metilados. La reducción y acetilación [131] se realizó con una única modificación consistente en reducir con NaBD_4 . Los acetatos de alditol parcialmente

metilados se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en un instrumento 7980A-5975C Agilent equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,2 μm espesor de la película), con helio. El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 250 °C durante el análisis. La relación de “split” durante la inyección (1 μL) fue de 50:1. La temperatura de programa fue de 160 °C durante 1 min y después 2 °C min^{-1} hasta 200 °C. Se escaneo en un rango de m/z entre 40 y 450. Los picos del cromatograma se identificaron mediante el tiempo de retención y el espectro de masas. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos.

3.2.6. Espectroscopía de infrarrojos

Para obtener el espectro de infrarrojos, las muestras se analizaron mediante la técnica del KBr. Aproximadamente 2 mg de cada uno de los EPS liofilizados se mezclaron en un mortero con 300 mg de KBr manteniéndose en un desecador. La pastilla se preparó mediante el uso de una prensa hidráulica aplicando una presión de 2 toneladas durante 2 min y luego 10 toneladas durante 6 min. El espectro se recogió en un espectrofotómetro de infrarrojos por transformada de Fourier 4200 tipo A (Jasco Corporation, Tokyo, Japón) en el rango de 400–4000 cm^{-1} . El detector empleado fue del tipo sulfato de triglicocola con una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3. Aplicaciones de los EPS

3.3.1. Actividad antiviral frente a virus de salmónidos

Los ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de las Dras. Sara Isabel Pérez Prieto y Sylvia Rodríguez Saint-Jean del CIB.

3.3.1.1. Ensayo *in vitro* de citotoxicidad

La citotoxicidad de los EPS purificados (apartado 3.2.1 de este capítulo) en las líneas celulares BF-2 y EPC se realizó evaluando la viabilidad y la proliferación de las mismas mediante un ensayo colorimétrico [134]. A monocapas confluyentes de células, crecidas en placas de 96 pocillos, se les retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por diferentes concentraciones (desde 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hasta 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de

cada uno de los EPS o de los dextranos comerciales T2000, T500, T70 y T10 (Pharmacia fine chemicals) diluidos en medio de mantenimiento. A los controles de células se les añadió el mismo volumen de medio pero sin EPS. Las placas se incubaron a 20 °C durante 3 y 7 días para las líneas celulares BF-2 y EPC, respectivamente. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y las células se fijaron y tiñeron con una solución de cristal violeta (1 %) y etanol (20 %) durante 10 min a 21 °C. A continuación, se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar, midiendo finalmente la absorción a 590 nm (A_{590nm}) en un lector de microplacas (Bio-Rad).

3.3.1.2. Ensayo *in vitro* de actividad antiviral

Los virus VNHI y VNPI se propagaron en las líneas celulares EPC y BF-2, respectivamente, siguiendo el método descrito por Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto [134]. El título viral se determinó calculando la cantidad de virus requerida para infectar el 50 % del cultivo celular ($TCID_{50} mL^{-1}$) [135].

La actividad antiviral de los EPS se determinó por la capacidad para inhibir el efecto citopático de los virus y proteger la monocapa. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos e infectaron con una $TCID_{50} mL^{-1}$ de 1000. Durante la absorción del virus, los EPS fueron añadidos a diferentes concentraciones (desde $10 \mu g mL^{-1}$ hasta $5000 \mu g mL^{-1}$) diluidos en el medio de mantenimiento de las líneas celulares. Las placas infectadas con VNPI se incubaron a 20 °C y con VNHI a 15 °C. Se incluyeron en el estudio los correspondientes controles de células (pocillos sin tratar con virus) y controles de infección (pocillos sin tratar con EPS). Cuando en los controles de infección, se observó que la monocapa de células estaba afectada en más de un 80 % de la superficie del pocillo, se evaluó la viabilidad de las células mediante un ensayo colorimétrico (apartado 3.3.1.1 de este capítulo).

3.3.1.3. Ensayo *in vitro* de reducción del rendimiento viral

El efecto inhibitorio de los EPS en la replicación de VNHI y VNPI se estudió mediante un ensayo *in vitro* de reducción del rendimiento viral [27]. Las células se inocularon en placas de 48 pocillos e infectaron con VNHI o VNPI con una multiplicidad

de infección (MOI, proporción del número de partículas vírales y del número de células) de 0,1. Tras 1 h de absorción a 15 °C para VNHI y a 20 °C para VNPI, se eliminó el medio de crecimiento y la monocapa se lavó con tampón PBS (pH 7,4). A continuación, se añadieron diferentes concentraciones (desde 10 µg mL⁻¹ hasta 1000 µg mL⁻¹) de cada uno de los dextranos independientemente y se mantuvieron los tratamientos durante 3 días a 20 °C para VNPI y 5 días a 15 °C para VNHI. Para determinar la cantidad de virus infectivo, se lisaron las células sometiénolas a tres ciclos de congelación y descongelación, y se recogieron los sobrenadantes tras centrifugación a 3000 x *g* 10 min. Éstos se congelaron a -70 °C hasta su uso. La cantidad de virus (intra y extracelular) fue determinada mediante infección de monocapas de células, calculando el TCID₅₀ mL⁻¹.

3.3.1.4. Ensayo *in vitro* del efecto del momento de adición

Para identificar en qué fase del ciclo reproductivo de los virus actuaban los EPS inhibiendo la infección, se llevó a cabo un ensayo del momento de adición. Para ello, en placas de 48 pocillos se sembraron 5 x 10⁴ células por pocillo (EPC o BF-2), a las cuales se les añadieron el EPS-LS, el EPS-LM y el dextrano T2000 a 1000 µg mL⁻¹ 30 min antes, al mismo tiempo o 1 h después, de la infección con los virus (VNHI o VNPI) a una MOI de 1. Las placas fueron incubadas durante 3 días a la temperatura óptima para cada virus y finalmente se recuperaron las células por raspado. La concentración de virus infectivo se determinó mediante infección de monocapas de células, calculando el TCID₅₀ mL⁻¹.

3.3.1.5. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se realizaron con alevines de trucha arco iris. Los experimentos descritos cumplen con la Directiva 86/609/EU del Parlamento Europeo y del Consejo para el uso de animales de laboratorio. Los peces se mantuvieron en un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 15 °C en tanques cerrados de 350 L de agua con recirculación en el CIB y se alimentaron dos veces al día con una dieta de gránulos comerciales (3 % de su peso corporal) [135]. Previa a la realización de los experimentos, las truchas se aclimataron al laboratorio durante 2 semanas y se

anestesiaron, antes de su manipulación, por inmersión en $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metanosulfonato de tricaina (Sigma-Aldrich).

Para realizar los experimentos, se distribuyeron a los peces en siete grupos ($n = 20$): i) grupos 1 y 2, tratados durante tres días con $10 \mu\text{g}$ por pez de EPS-LS diluido en NaCl al 0,85 %; ii) grupos 3 y 4, tratados durante tres días con $50 \mu\text{g}$ por pez del EPS diluido en NaCl al 0,85 % y iii) grupos 5, 6 y 7, se manipularon del mismo modo que los grupos anteriores durante tres días pero sin tratar con ningún compuesto. La administración del EPS-LS se realizó usando una pipeta automática con una punta de $20 \mu\text{L}$ que se introdujo en la boca del pez, apoyando el extremo de la punta en la entrada del esófago. Al tercer día de tratamiento, los peces de los grupos 1, 3 y 5 se infectaron por inmersión con el virus VNHI ($5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$), y los grupos 2, 4 y 6 se infectaron con el virus VNPI ($5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) [136]. Tanto los parámetros de calidad del agua como las condiciones de cultivo fueron equivalentes en todos los tanques. Los grupos de ensayo se mantuvieron en observación para vigilar los signos clínicos y la tasa de mortalidad durante 30 días.

3.3.2. Actividad inmunomoduladora

3.3.2.1. Efecto inmunomodulador en trucha arcoíris

Para los ensayos de estimulación *in vivo* se utilizaron grupos de peces a los que se les inyectó intraperitonealmente EPS-LS ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), poli I:C ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) o tampón PBS (pH 7,4). A los días 1, 3, 7 y 15 de tratamiento se sacrificaron peces ($n=3$) a los que se les extrajo RNA total del tejido de la parte anterior del riñón, con el fin de evaluar la expresión de los genes IFN-1 e IFN- γ por RT-qPCR.

La extracción de RNA se realizó con Trizol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante y tratando las muestras con DNasa I, para eliminar las trazas de DNA que pudieran interferir, utilizando el kit RQ1 DNasa I libre de RNasas (Promega, Wisconsin, EEUU) y siguiendo las especificaciones de la casa comercial. La síntesis de los cDNA, se realizó con la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Las muestras ($12 \mu\text{L}$) se incubaron a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min con $1 \mu\text{L}$ de oligo (dT)₁₂₋₁₈ ($0,5 \mu\text{g}$

mL⁻¹) y 1 µl de una solución conteniendo los 4dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), cada uno de ellos a una concentración de 10 mM, y se mantuvieron posteriormente 1 min a 4 °C. Seguidamente a cada muestra se le añadieron: 4 µl de tampón 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM de KCl y 15 mM de MgCl₂), 1 µl de DTT (0,1 M) y 200 U de la transcriptasa reversa, incubándose la mezcla de reacción durante 1 h a 50 °C. La reacción se detuvo calentando a 70 °C durante 15 min. El cDNA resultante se diluyó a la concentración deseada en agua destilada estéril, siendo conservado a -20 °C hasta su uso.

Para la qPCR se utilizó 12,5 µL del iQ™ SYBR® Green Supermix 2x (Bio-Rad), 1 µL de los cDNAs diluidos cuatro veces y 0,3 µM de cada pareja de primers de los genes IFN-1, IFN-γ y el factor de elongación 1-α (Tabla 2M). Para llevar a cabo la reacción las condiciones fueron las siguientes: i) un ciclo de 10 min a 95 °C; ii) 40 ciclos de 10 s a 95 °C y 1 min a 60 °C y iii) un ciclo de 1 min a 95 °C y 1 min a 60 °C en un iQ5 iCycler thermal cycler (Bio-Rad). Los valores de expresión fueron normalizados respecto al control endógeno (el factor de elongación 1-α). Los cambios de expresión obtenidos respecto al control fueron calculados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [137].

3.3.2.2. Actividad antiinflamatoria en macrófagos de ratón

Los ensayos se realizaron en colaboración con el grupo de los Drs. Daniel Gozalbo Flor y Marisa Gil Herrero, Catedráticos del Departamento de Microbiología y Ecología, de la Universidad de Valencia.

3.3.2.2.1. Aislamiento y cultivo *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón

La obtención de macrófagos intraperitoneales se realizó a partir de ratones C57BL/6, en condiciones de esterilidad mediante su manipulación en cabina de flujo laminar y utilizando material quirúrgico estéril. Tras su sacrificio por dislocación cervical, se bañó al ratón con alcohol de 70 °C y se le inyectó 10 mL de medio RPMI completo (Gibco, Invitrogen). A continuación se masajeó la cavidad peritoneal del animal, para distribuir bien el medio de cultivo, y se realizó un corte en el peritoneo para recuperar el medio inyectado con las células. La muestra se centrifugó a 450 x g

durante 10 min a 4 °C y, tras el recuento de los macrófagos al microscopio, las células se resuspendieron en medio RPMI completo para dejarlos a una concentración final de $1,15 \times 10^6$ células mL⁻¹. Durante todo el proceso, la manipulación de las células peritoneales se realizó en frío para evitar la adherencia de las células al plástico.

3.3.2.2. Preparación de estímulos

El EPS-LS y el EPS-LM se trataron con 20 µg mL⁻¹ de polimixina B (Sigma-Aldrich) durante 1 h y se filtraron por 0,45 µm para eliminar posibles endotoxinas. Los estudios se realizaron independientemente con cada uno de los dextranos a una concentración final de 50 µg mL⁻¹ disueltos en tampón PBS (pH 7,4) y con diferentes compuestos que desencadenan respuestas proinflamatorias. Así, se utilizó el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* a 0,25 µg mL⁻¹; Zymosan, partículas de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* a 100 µg mL⁻¹; levaduras de *Candida albicans* a 10⁷ mL⁻¹, y el curdlano, (1,3)-β-glucano lineal de *Alcaligenes faecalis* a 20 µg mL⁻¹.

3.3.2.2.3. Estudios de producción *in vitro* de citoquinas

Para los estudios de producción *in vitro* de citoquinas, 200 µL de la suspensión de macrófagos ($2,3 \times 10^5$ células por pocillo) se incubaron en placas de 96 pocillos durante 72 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Transcurrido dicho tiempo, los estímulos se añadieron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Tras la estimulación de las células se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a 16.000 x *g* durante 5 min para recoger los sobrenadantes libres de cualquier resto celular. Estos se guardaron a – 80 °C hasta su análisis.

La producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α e IL-6) se determinó utilizando los sobrenadantes de los cultivos celulares, mediante la técnica ELISA con los kits comerciales de eBioscience (San Diego, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4. Detección y localización genómica de los genes *dsr* en *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

Para detectar la presencia de los genes *dsr* se realizó un análisis de hibridación de Southern. Para ello, se fraccionaron preparaciones de DNA plasmídico de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 (apartado 2.2.2 de este capítulo), mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % con tampón TAE 1X con un amperaje constante de 40 mA aproximadamente durante 4 h y se tiñeron durante 30 min con 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. El gel conteniendo el DNA fraccionado se irradió con un transiluminador de onda corta durante 2 min, se trató, con agitación suave, con 100 mL de 0,25 N de HCl durante 10 min a 21 °C y, posteriormente, se lavó con 100 mL de agua ultrapura durante 15 min a 21 °C. A continuación, se trató dos veces con 100 mL de una solución de desnaturalización que contenía 0,5 N de NaOH y 1,5 N de NaCl durante 15 min a 21 °C, con agitación suave, y posteriormente se lavó con 100 mL de agua ultrapura durante 15 min a 21 °C. Antes de ser transferido por capilaridad a una membrana de nylon de 0,45 μm (Biodyne A®, Pall Gelman Laboratory, Florida, EEUU), se trató dos veces con 100 mL de una solución de neutralización (1 M de Tris-HCl y 1,5 M de NaCl, pH 7,5) durante 15 min a 21 °C con agitación suave y se lavó con 100 mL de agua ultrapura durante 15 min a 21 °C. Tras la transferencia, la membrana se secó en un horno a 80 °C durante 30 min y se fijó el DNA por radiación ultravioleta en el Gene Linker de Bio-Rad. A continuación se incubó la membrana durante 1 h a 45 °C con 20 mL en solución de prehibridación: Denhart (5 % de Ficoll tipo 400, 5 % de polivinilpirrolidona y 5 % de suero fetal bovino), SSC (900 mM de NaCl y 90 mM de citrato de sodio) y SDS al 0,5 % suplementada con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA de timo de ternera desnaturalizado (Sigma-Aldrich).

La construcción de las sondas se realizó a partir de un amplicón de 698 pb (sonda para *Lc. mesenteroides* RTF10) ó de 695 pb (sonda para *Lb. sakei* MN1) generado por PCR, según las condiciones descritas en el apartado 2.4 de este capítulo. Se utilizaron como moldes DNA genómico de *Lc. mesenteroides* RTF10 o *Lb. sakei* MN1 y los oligonucleótidos *dsrR* y *dsrF* cuya secuencia se describe en la tabla 2M. Posteriormente, las sondas se marcaron no isotópicamente utilizando el kit “NEBlot

Phototope" (New England Biolabs), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La hibridación de la membrana con una u otra sonda se realizó durante 12 h a 45 °C, con la sonda previamente desnaturalizada por calentamiento a 95 °C durante 5 min. La sonda no unida, se eliminó mediante lavados sucesivos de la membrana: 5 min a 21 °C con 100 mL de la solución de lavado I que contenía SSC (300 mM de NaCl y 30 mM de citrato de sodio) y SDS al 0,1 %; 5 min a 21 °C con 100 mL de la solución de lavado II que contenía SSC (15 mM de NaCl y 1,5 mM de citrato de sodio) y SDS al 0,1 % y dos lavados de 15 min a 45 °C con 100 mL de la solución de lavado I. El procedimiento de detección se realizó utilizando el kit Phototope-Stars Detection (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Finalmente, para la detección de las bandas luminiscentes se utilizó el equipo Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm).

3.5. Detección de la transcripción de los genes *repA*, *repB* y *dsrLS* en pMN1

La transcripción de los genes presentes en pMN1 fue estudiada mediante RT-PCR. Para ello, se partió de RNA total extraído a partir de cultivos de *Lb. sakei* MN1 crecidos en medio CDMG y CDMS hasta una A_{600nm} de 2,0 (apartado 2.3 de este capítulo). Para la síntesis de los cDNA, se utilizaron 400 ng de RNA, 0,75 μ M de cada uno de los oligonucleótidos complementarios a distintas regiones de pMN1 y 500 μ M de cada uno de los 4 dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Las mezclas se incubaron durante 5 min a 65 °C, se transfirieron a 4 °C y se adicionó a cada una de ellas el tampón de síntesis de cDNA 1X (Invitrogen), 5 mM de DTT (Invitrogen), 2 U μ L⁻¹ de RNasaOUT (Invitrogen) y 0,75 U μ L⁻¹ de la transcriptasa reversa aviar ThermoScript (Invitrogen). Las muestras se incubaron durante 1 h a 50 °C y 5 min a 85 °C, para detener la reacción. Para eliminar restos de RNA, se añadieron 0,2 μ g μ L⁻¹ de RNasa A (Sigma-Aldrich) y la mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se dializaron durante 30 min frente a 10 mM de tampón Tris pH 8,0 usando las membranas de la serie V de Millipore (Merck, Darmstadt, Alemania). Las PCR se realizaron siguiendo las indicaciones de la casa comercial Thermo Fisher Scientific para la DNA polimerasa Phusion como se indica en el apartado 2.4 de este capítulo.

3.6. Construcción de los plásmidos pRCR13, pRCR14 y pRCR15 y establecimiento en *L. lactis* MG1363 y *Lb. sakei* MN1

Para la construcción de los plásmidos pRCR13, pRCR14 y pRCR15, se obtuvieron amplicones de 343 bp, 366 bp y 376 bp mediante PCR, respectivamente (apartado 2.4 de este capítulo) usando como molde DNA plasmídico de *Lb. sakei* MN1 y los siguientes pares de oligonucleótidos, P1F y P1R para pRCR13; P2F y P2R para pRCR14; P3F y P3R para pRCR15. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 2M.

El plásmido vector pRCR, obtenido de *E. coli* DH5 α [pRCR], y los amplicones generados se digirieron y ligaron para obtener los plásmidos recombinantes correspondientes, que fueron establecidos por electroporación en *L. lactis* MG1363 y *Lb. sakei* MN1 (apartado 2.8 de este capítulo). El esquema de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos y su mapa físico aparece recogido en la figura 22R.

3.7. Transferencia del plásmido pRCR12 a *Lb. sakei* MN1

El plásmido pRCR12 es un derivado de pRCR, que contiene el gen *mrfp* bajo el control del promotor P_x del gen *malX* de *S. pneumoniae* (Fig. 2M) [119]. La expresión génica a partir de P_x está regulada por el represor MalR en *S. pneumoniae* [138] y la proteína mCherry se expresa de forma constitutiva a partir de la fusión P_x-*mrfp* en *L. lactis* [139]. El plásmido contiene el replicón del plásmido pSH71 de *L. lactis*, que es de amplio espectro de huésped y funcional en cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Además, el plásmido contiene el gen *cat* cuyo producto, una cloranfenicol acetil transferasa, confiere el fenotipo de Cm^R a la bacteria portadora. El plásmido se purificó a partir de cultivos de *E. coli* DH5 α [pRCR12] usando el kit de purificación de plásmidos "JetStar 2.0" de Genomed siguiendo las instrucciones del fabricante y se transfirió a *Lb. sakei* MN1 como se ha descrito en el apartado 2.8 de este capítulo.

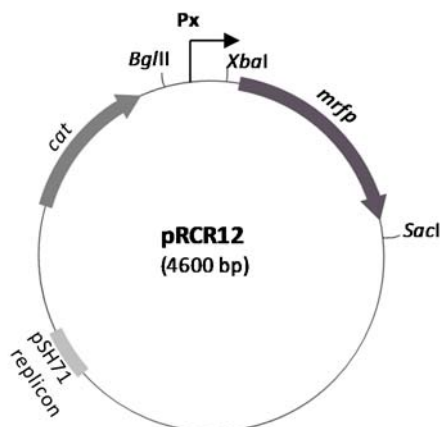


Figura 2M. Mapa físico del plásmido pRCR12.

3.8. Detección de la expresión de la proteína fluorescente mCherry en *Lb. sakei* MN1 portadora de pRCR12, pRCR13, pRCR14 o pRCR15

Para detectar la expresión de la proteína fluorescente mCherry las cepas se cultivaron en 10 mL de medio MRSG o MRSS hasta una A_{600nm} de 2,0 (fase exponencial) y hasta el inicio de la fase estacionaria A_{600nm} de 5,0 en MRSG y A_{600nm} de 10,0 en MRSS. Las células se sedimentaron por centrifugación a $16.000 \times g$ durante 15 min a $4^\circ C$, se resuspendieron en tampón PBS (pH 7,4) y después de sedimentarse nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en $500 \mu L$ de tampón PBS (pH 7,4). De dichas suspensiones, se utilizaron $200 \mu L$ de cada una de ellas para medir en placas de microtítulo en un equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific): i) la A_{480nm} y ii) los niveles de fluorescencia de la proteína mCherry, utilizando una longitud de onda de excitación de 587 nm y de emisión de 610 nm. Se realizaron tres ensayos independientes. De la misma suspensión se utilizaron $50 \mu L$ para la observación de los cultivos por microscopia confocal laser de barrido (apartado 2.11 de este capítulo).

3.9. Detección de la formación de biopelículas en matrices de poliestireno y vidrio

La capacidad de formar biopelículas se determinó siguiendo la metodología descrita por Vergara-Irigaray y cols. [140]. Cultivos de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1, se utilizaron al 0,1 % (v/v) para inocular medio fresco MRSG y MRSS y dichas suspensiones se repartieron en volúmenes de $200 \mu L$ por pocillo en placas de 96

pocillos de poliestireno (BD, New Jersey, EEUU). Después de incubar durante 24 h a 37 °C, en un agitador orbital (200 rpm), los pocillos se lavaron suavemente dos veces con agua destilada, se secaron y se tiñeron con cristal violeta al 0,5 % (w/v) durante 5 min a 21 °C. A continuación, los pocillos se lavaron suavemente dos veces con agua destilada, se secaron y se solubilizaron con etanol:acetona (80:20, v/v). Las células teñidas se cuantificaron midiendo la absorción a 595 nm ($A_{595\text{nm}}$) de los pocillos usando el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Las determinaciones se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. La formación de biopelículas en superficie de vidrio se realizó del mismo modo pero utilizando tubos de vidrio y volúmenes de 5 mL. En este caso, la $A_{595\text{nm}}$ se midió en un espectrofotómetro Spectronic 200 (Thermo Fisher Scientific).

3.10. Detección de agregación y desagregación bacteriana

Para la detección de agregados bacterianos, cultivos de *Lc. mesenteroides* RTF10, *Lb. sakei* MN1 y *Lb. sakei* MN1[pRCR12] se utilizaron al 0,1 % (v/v) para inocular medio fresco MRSG o MRSS y se cultivaron durante 24 h a 30 °C. Para la detección en medio líquido, los tubos conteniendo los cultivos se fotografiaron con una cámara FinePix S5 Pro con un objetivo AF Micro Nikkor de 60 mm en el Servicio de Fotografía del CIB. Para la detección a nivel celular, 1 mL de cultivo se sedimentó por centrifugación a 5.000 x *g* durante 3 min a 4 °C y el sobrenadante se eliminó. Las células se resuspendieron cuidadosamente, sin agitación fuerte, en 50 µL de tampón PBS (pH 7,4) y directamente se analizaron, sin fijación, por microscopía confocal laser de barrido (apartado 2.11 de este capítulo).

Para la detección de desagregados bacterianos, cultivos de *Lb. sakei* MN1 y *Lb. sakei* MN1[pRCR12] se utilizaron al 0,1 % (v/v) para inocular medio fresco MRSG y se cultivaron durante 24 h a 30 °C. A continuación, las células se sedimentaron por centrifugación a 5.000 x *g* durante 3 min a 4 °C y se resuspendieron cuidadosamente, sin agitación fuerte, en el mismo volumen de medio fresco MRSG o MRSS. De nuevo, se incubaron durante 3 h a 30 °C, se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron, sin agitación fuerte, en 50 µL de tampón PBS (pH 7,4). Se analizaron

directamente, sin fijación, por microscopía confocal laser de barrido (apartado 2.11 de este capítulo).

3.11. Evaluación de la capacidad de colonización de *Lb. sakei* MN1 en modelo gnotobiótico de pez

Los ensayos fueron realizados por Iñaki Iturria bajo la dirección de Miguel Ángel Pardo en el Centro Tecnológico AZTI-Tecnalia (Derio, Vizcaya).

3.11.1. Obtención de cultivos de *Vibrio anguillarum* y larvas de pez cebrá gnotobióticas

La cepa de *V. anguillarum* NB10 (que expresa la proteína fluorescente verde GFP) se cultivó a 25 °C en TSB (Pronadisa) suplementado con 10 µg mL⁻¹ de Cm y 0,5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Los peces cebrá adultos se mantuvieron de acuerdo con los protocolos estándares [141] en un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad en tanques de 60 L de agua a 27 °C con aireación, y se alimentaron con una dieta de gránulos comerciales (5 % de su peso corporal). Cada tanque contenía un sistema externo de filtración (biológico, químico y físico) complementado con una lámpara ultravioleta. Todos los experimentos fueron aprobados por el Órgano Encargado del Bienestar Animal de Neiker (Derio, Vizcaya).

La obtención de larvas de pez cebrá gnotobióticas, libres de gérmenes (GF) se realizó como se describe en Oyarbide y cols. [142]. Las larvas gnotobióticas se mantuvieron en placas petri estériles, a una densidad media de 1,3 animales por mililitro, en un incubador a 27 °C con ciclos de luz de 14 h. Los ensayos de mortalidad de larvas infectadas se realizó en placas estériles de 24 pocillos.

3.11.2. Ensayos de colonización de *Lb. sakei* MN1

La cepa *Lb. sakei* MN1[pRCR12] se cultivó a 30 °C durante 12 h en medio MRSG suplementado con 5 µg mL⁻¹ de Cm. A continuación, los cultivos se lavaron tres veces

con tampón PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente y se diluyeron a una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc) mL^{-1} en una solución de tampón PBS (pH 7,4) suplementado con 0,5 % de glucosa o 0,5 % de sacarosa.

Las larvas de peces cebra gnotobióticas ($n=20$) de 4 días post-fecundación se colocaron en placas petri (5,5 cm x 1 cm) junto con 15 mL de la suspensión bacteriana en solución conteniendo glucosa o sacarosa. Como control se utilizaron larvas en placas petri con 15 mL de tampón PBS (pH 7,4). Los cultivos se mantuvieron a 27 °C con agitación (60 rpm) durante 6, 24 y 48 h. A continuación, se eliminó el medio y se lavaron las larvas tres veces con tampón PBS (pH 7,4). Después, se sacrificaron sometiéndolas a una solución de triclaína a 200 mg mL^{-1} y se lavaron tres veces con tampón PBS (pH 7,4) estéril que contenía un 0,1 % de Tween 20, para eliminar las bacterias débilmente unidas a la piel [143]. A continuación, se homogeneizaron manualmente con un “Pellet Pestle Cordless Motor” (Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, EEUU) y finalmente, se prepararon diluciones decimales seriadas de la suspensión recuperada que se sembraron en placas de MRSG y se incubaron a 30 °C durante 24 h, para después determinar las ufc mediante el conteo del número de colonias.

3.11.3. Ensayos de competición entre *Lb. sakei* MN1 y *V. anguillarum* NB10

La cepa *V. anguillarum* NB10 se cultivó en TSB suplementado con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Cm y 0,5 mM de IPTG durante 24 h a 25 °C. La cepa *Lb. sakei* MN1[pRCR12] se cultivó durante 12 h a 30 °C en medio MRSG suplementado con 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Cm. A continuación, ambos cultivos se lavaron tres veces con agua estéril que contenía 0,5 % de NaCl y 0,5 % de glucosa o 0,5 % sacarosa. Finalmente se diluyeron las bacterias a una concentración de 10^7 cfu mL^{-1} en la solución correspondiente. Las larvas de pez cebra se sumergieron en la suspensión de *Lb. sakei* MN1 durante 18 h antes de llevar a cabo la infección con *V. anguillarum* NB10.

Los diferentes grupos experimentales fueron: i) tratamiento con *Lb. sakei* MN1 y *V. anguillarum* NB10 en 0,5 % de glucosa; ii) tratamiento con *Lb. sakei* MN1 en 0,5 % de glucosa y *V. anguillarum* NB10 en 0,5 % de sacarosa; iii) tratamiento con *Lb. sakei*

MN1 y *V. anguillarum* NB10 en 0,5 % de sacarosa; iv) tratamiento con *V. anguillarum* NB10, como control positivo de infección, y v) larvas sumergidas en 0,5 % de glucosa o 0,5 % de sacarosa en tampón PBS, sin exposición a ninguna de las bacterias, como controles negativos. Se monitorizó la mortalidad acumulada durante 96h.

3.11.4. Detección de la colonización bacteriana

Para detectar la colonización de las bacterias en el interior de las larvas, se utilizó un estereomicroscopio Leica MZFL III con un rango de aumento de zoom de 8X a 100X. El microscopio está equipado con luz visible y luz UV (100 W Hg). Para detectar la fluorescencia de la GFP codificada por *V. anguillarum* NB10, se utilizó la luz UV en el rango de excitación de 450–490 nm, mientras que para detectar la fluorescencia de la mCherry codificada por *Lb. sakei* MN1[pRCR12], se utilizó en el rango de 540-580 nm. Las imágenes se obtuvieron con una cámara Leica DFC 360FX y fueron procesadas con el ImageJ software v1.47 (National Institutes of Health, EEUU).

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE BAL PRODUCTORAS DE EPS

La caracterización de nuevas cepas productoras de EPS, procedentes de ambientes diversos, es una estrategia de gran interés biotecnológico debido a las potenciales propiedades tecnológicas y/o funcionales de estos polímeros producidos por algunas BAL.

Para la realización de este trabajo, se utilizaron las cepas *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, seleccionadas como potencialmente productoras de EPS a partir de una colección de BAL aisladas de productos cárnicos. Forman parte de un estudio previo “Caracterización de especies de bacterias lácticas asociadas a la alteración de productos cárnicos mediante técnicas moleculares” (Empar Chenoll, Tesis Doctoral, 2006) que fue realizado en el laboratorio de la Dra. Rosa Aznar, en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA, CSIC, Valencia).

1.1. Confirmación taxonómica de las cepas *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

La secuencia parcial de los genes que codifican el rRNA 16S de *Lb. sakei* MN1 (1.345 pb) y *Lc. mesenteroides* RTF10 (1.292 pb) se comparó con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology (NCBI, EEUU). El porcentaje de similitud de secuencia del 100 % con las correspondientes especies, confirmó su adscripción a las mismas. Las secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso KJ161303 (*Lb. sakei* MN1) y KJ161304 (*Lc. mesenteroides* RTF10) y se incluyen en los anexos I.I y I.II de este trabajo.

1.2. Perfil de fermentación de carbohidratos

En primer lugar, se realizó un perfil de fermentación de carbohidratos de las dos cepas objeto de estudio, mediante el sistema API 50CH. *Lc. mesenteroides* RTF10 mostró capacidad para fermentar: arabinosa, celobiosa, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, sacarosa, salicina, turanosa, trehalosa y xilosa. En el caso de *Lb. sakei* MN1, el número de azúcares fermentables fue inferior siendo éstos: arabinosa, celobiosa, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, manosa, melibiosa, ribosa, sacarosa y trehalosa. La capacidad de

fermentación de azúcares detectada es un carácter previamente descrito para las especies *Lc. mesenteroides* y *Lb. sakei* [144] [145] [146].

1.3. Detección de la producción de EPS

La producción de EPS se ensayó mediante el cultivo de las bacterias en medio CDM, para evitar la interferencia de los componentes de los medios ricos en la cuantificación de los mismos. El crecimiento se realizó durante 24 h a 30 °C, suplementando el medio con fructosa, glucosa o sacarosa y, en el caso de *Lc. mesenteroides* RTF10, también con lactosa o maltosa. Los resultados de la cuantificación realizada en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, por el método del fenol-sulfúrico, mostraron que ambas cepas sólo producían EPS cuando crecían en medio CDM suplementado con sacarosa. En dichas condiciones, los valores obtenidos para *Lc. mesenteroides* RTF10 fueron de $1,04 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$, cuando alcanzó una $A_{600\text{nm}} = 3,23 \pm 0,21$ y de $2,23 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ para *Lb. sakei* MN1, tras alcanzar una $A_{600\text{nm}} = 4,23 \pm 0,06$.

La producción de EPS también se detectó mediante la técnica de cultivo en medio sólido. Cuando las cepas en estudio se cultivaron en placas de MRSS, las colonias mostraron un aspecto mucoso, mientras que en placas de MRSG no presentaron dicho aspecto (Fig. 1R). El mismo fenotipo, dependiente de la presencia de sacarosa o glucosa durante el crecimiento, se observó en placas de CDM (resultados no mostrados).

Resultados

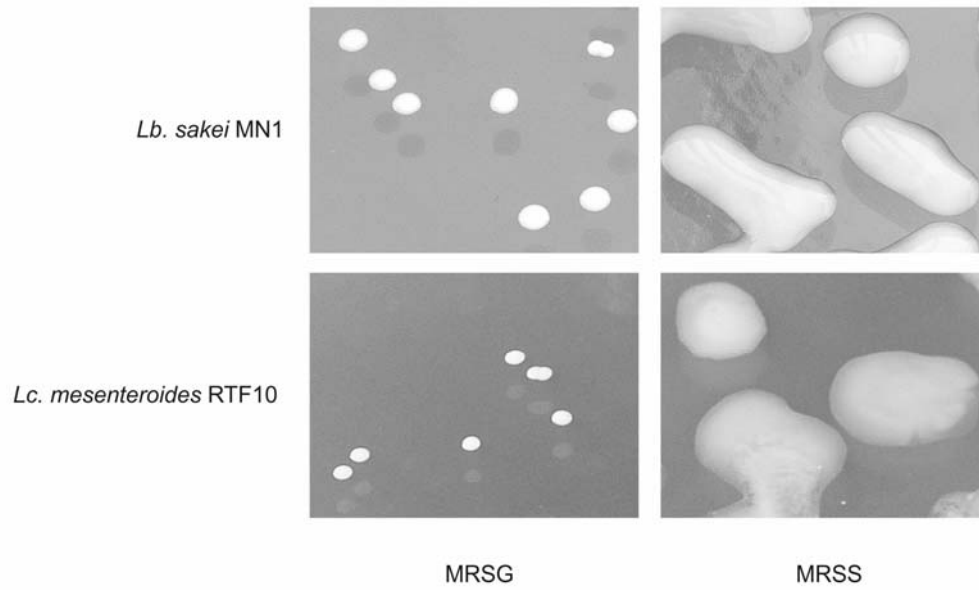


Figura 1R. Detección de EPS en medio sólido. Fotografías de colonias de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 cultivadas en placas de MRSG y MRSS.

Las colonias crecidas en medio sólido MRSG y MRSS se analizaron, a nivel celular, mediante microscopía electrónica de transmisión (Fig. 2R).

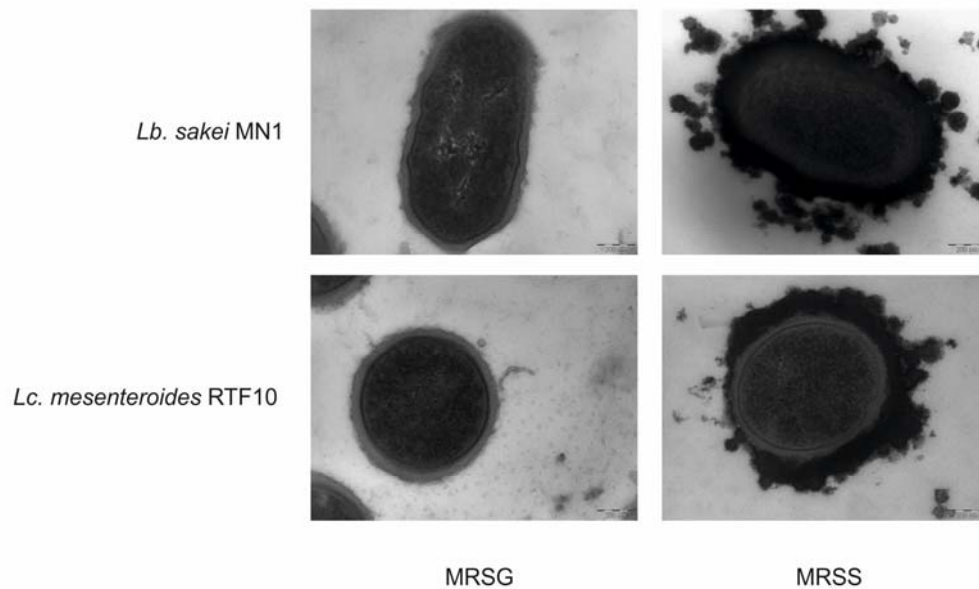


Figura 2R. Detección de EPS mediante microscopía electrónica. Análisis directo de colonias de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 cultivadas en placas de MRSG y MRSS.

Con esta detección directa se consiguió minimizar la pérdida de EPS durante la manipulación de las muestras, lo que permitió no sólo detectarlos, sino también

determinar en los cultivos crecidos en presencia de sacarosa, su localización a nivel celular asociado a la pared bacteriana o rodeando a las células (Fig. 2R).

1.4. Metabolismo central bacteriano y producción de EPS utilizando sacarosa como fuente de carbono

Una vez determinado que *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 sintetizaban EPS en presencia de sacarosa como fuente de carbono, se analizaron los niveles de producción durante su crecimiento en medio líquido. Se cultivaron en medio CDM suplementado con 0,8 % de sacarosa a 30 °C, sin control de pH durante 13 h (fase de crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria) y se tomaron muestras a diferentes tiempos, a partir del inicio del crecimiento (2 h), con el fin de: i) realizar un seguimiento del crecimiento de los cultivos mediante la A_{600nm} ; ii) medir el pH extracelular y iii) cuantificar la producción de EPS mediante el método del fenol-sulfúrico.

Los resultados se muestran en la figura 3R observándose que ambas cepas sintetizaban EPS en la fase exponencial de crecimiento en paralelo a un aumento de la A_{600nm} y una disminución del pH. Los niveles de producción de EPS alcanzados al inicio de la fase estacionaria (después de 8 h de crecimiento) fueron de $1,56 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ cuando *Lb. sakei* MN1 alcanzó una $A_{600nm} = 5,10 \pm 0,06$ (Fig. 3R, A) y de $1,03 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ cuando *Lc. mesenteroides* RTF10 alcanzó una $A_{600nm} = 2,45 \pm 0,07$ (Fig. 3R, B). Estos niveles de EPS en el medio extracelular aumentaron ligeramente tras 13 h de crecimiento, siendo de $2,20 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ para *Lb. sakei* MN1 y $1,25 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ para *Lc. mesenteroides* RTF10.

Además se realizó un estudio metabólico determinándose, en paralelo a la producción de EPS y a lo largo del crecimiento, la concentración de sacarosa (fuente de carbono), glucosa y fructosa (metabolitos primarios de la sacarosa) y ácido láctico (producto de la glicolisis), a partir de los sobrenadantes de los cultivos, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

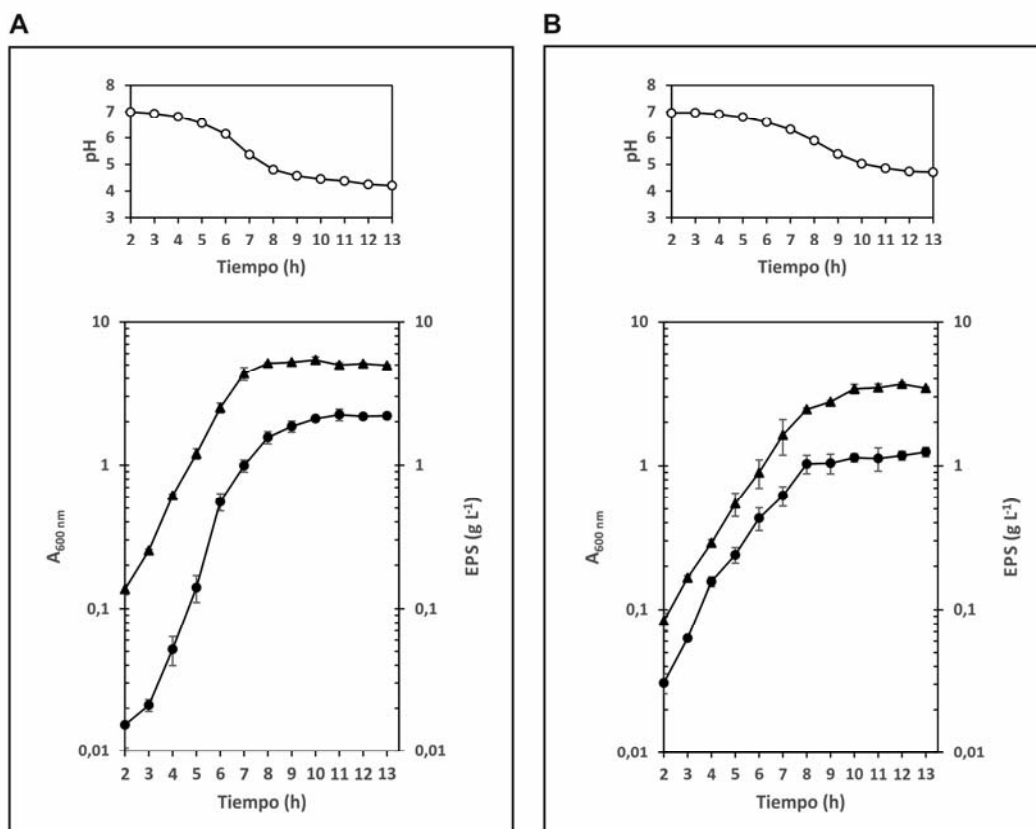


Figura 3R. Estudio de la producción de EPS por *Lb. sakei* MN1 (A) y por *Lc. mesenteroides* RTF10 (B). Análisis de la $A_{600\text{nm}}$ (\blacktriangle), pH (\circ) y producción de EPS (\bullet) durante el crecimiento a 30 °C en medio CDMS. Los resultados representados son el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar.

En la figura 4R se muestran los niveles de glucosa, sacarosa, fructosa y de ácido láctico durante la producción de EPS observándose que ambas cepas consumieron aproximadamente el 90 % de la sacarosa adicionada al medio (23 mM) durante las primeras 7 h de crecimiento. Las dos bacterias provocaron un incremento de los niveles de fructosa extracelular durante las primeras 7 h de incubación, alcanzando un máximo de acumulación muy similar en ambos casos ($7,93 \pm 0,55$ mM para *Lb. sakei* MN1 y $7,31 \pm 0,22$ mM para *Lc. mesenteroides* RTF10), niveles que decrecieron posteriormente, siendo más lento el descenso en los cultivos de *Lb. sakei* MN1 (Fig. 4R). Así mismo, se observa un incremento en los niveles de glucosa en el caso de *Lc. mesenteroides* RTF10 (Fig. 4R, B) mientras que en los sobrenadantes de los cultivos de *Lb. sakei* MN1 no se detectaron niveles apreciables de glucosa a ninguno de los tiempos analizados (Fig. 4R, A).

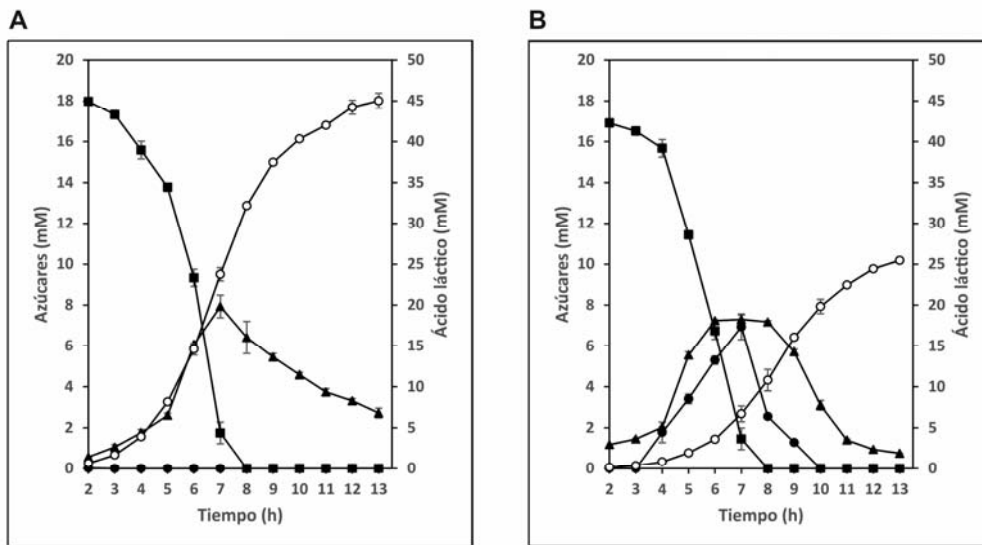


Figura 4R. Estudio metabólico de *Lb. sakei* MN1 (A) y *Lc. mesenteroides* RTF10 (B) durante la producción de EPS, utilizando como única fuente de carbono sacarosa. Análisis de los niveles de glucosa (●), sacarosa (■), fructosa (▲) y ácido láctico (○) durante el crecimiento a 30 °C en medio CDMS. Los resultados representados son el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar.

Cuando la sacarosa extracelular alcanzó niveles indetectables (después de 8 h de crecimiento), *Lb. sakei* MN1 comenzó a consumir la fructosa previamente acumulada en el medio de cultivo (Fig. 4R, A) y *Lc. mesenteroides* RTF10 la glucosa (Fig. 4R, B). El consumo de fructosa por *Lc. mesenteroides* RTF10 comenzó a las 9 h y fue más rápido (Fig. 4R, B) que el realizado por *Lb. sakei* MN1 (Fig. 4R, A), siendo los niveles extracelulares de dicho monosacárido de $0,76 \pm 0,01$ mM y $2,72 \pm 0,24$ mM, respectivamente, después de 13 h de incubación (Fig. 4R) e indetectables para ambas bacterias a las 24 h (resultados no mostrados). Finalmente, el patrón de producción de ácido láctico por *Lb. sakei* MN1 (Fig. 4R, A) fue más rápido que en *Lc. mesenteroides* RTF10 (Fig. 4R, B) y los niveles alcanzados después de 13 h fueron de aproximadamente el doble para la primera ($45,02 \pm 0,94$ mM versus $25,47 \pm 0,18$ mM). Estos resultados corroboran que *Lb. sakei* como microorganismo heterofermentativo facultativo está metabolizando las hexosas por la vía de la glicolisis (rendimiento: dos moléculas de lactato por molécula de glucosa), mientras que *Lc. mesenteroides* que es heterofermentativo obligado, utiliza la ruta del 6-fosfogluconato para fermentar las hexosas (rendimiento: una molécula de lactato por molécula de glucosa).

2. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EPS

Con el objetivo de realizar una caracterización fisicoquímica de los EPS producidos por *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 en medios de cultivo conteniendo sacarosa como fuente de carbono y poder además evaluar su bioactividad, se procedió a estandarizar su aislamiento y purificación con un alto grado de pureza.

2.1. Aislamiento y purificación de los EPS

En base a los resultados presentados en la figura 3R y, con el fin de conseguir el mayor rendimiento de producción de EPS, se utilizaron los sobrenadantes de cultivos crecidos en medio CDMS hasta el final de la fase exponencial. Con los resultados obtenidos y para tener la menor contaminación provocada por la lisis celular o por los componentes del medio, se estandarizó el protocolo de trabajo que se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2 del capítulo de materiales y métodos. La evaluación de la concentración de EPS, proteínas, DNA y RNA en los sobrenadantes de los cultivos, reveló una buena producción del EPS de *Lb. sakei* MN1 ($1,56 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$) y de *Lc. mesenteroides* RTF10 ($1,03 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$) con un grado de pureza de aproximadamente el 95 % y sin niveles detectables de DNA y RNA (Tabla 1R). Los EPS presentes en los sobrenadantes de los cultivos se precipitaron con un volumen de etanol durante 12 h a 4 °C, se dializaron y se liofilizaron. Después de esta purificación parcial, se cuantificó de nuevo la concentración de EPS y de los contaminantes presentes. Ambas preparaciones de EPS incrementaron su grado de pureza a niveles de aproximadamente el 99 %, debido a una reducción significativa de la concentración de proteínas contaminantes (Tabla 1R).

Tabla 1R. Análisis del grado de pureza de los EPS. Determinación de los niveles (%) de EPS, proteínas, DNA y RNA durante los procesos de producción y purificación.

Cepas productoras	<i>Lb. sakei</i> MN1				<i>Lc. mesenteroides</i> RTF10			
^a Biomoléculas	EPS (%)	Proteínas (%)	DNA (%)	RNA (%)	EPS (%)	Proteínas (%)	DNA (%)	RNA (%)
^b Sobrenadante del cultivo	96,5	3,5	ND	ND	94,8	5,2	ND	ND
^c Después de la precipitación y diálisis	99,4	0,6	ND	ND	99,1	0,9	ND	ND
^c Después del fraccionamiento cromatográfico	100	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND

^a El 100 % corresponde a la concentración total de biomoléculas detectadas (EPS, proteínas, DNA y RNA) en cada muestra.

^b La concentración de proteínas, DNA y RNA fue medida directamente en los sobrenadantes. La concentración de EPS se determinó tras la precipitación con etanol.

^c Las concentraciones de las biomoléculas fueron determinadas a partir de preparaciones del compuesto liofilizado a una concentración de 2 mg mL⁻¹ disuelto en agua.

ND indica niveles por debajo del límite de detección correspondiente a 0,5 µg mL⁻¹ de DNA, 20 ng mL⁻¹ de RNA y 1 µg mL⁻¹ de proteínas.

Las pequeñas trazas de contaminantes, que permanecían presentes, se eliminaron por cromatografía de exclusión utilizando una columna preparativa de Sepharose CL 6B equilibrada con agua ultrapura (Tabla 1R). Ambas preparaciones de EPS mostraron un único pico mayoritario de elución, muy definido y detectado por el método del fenol-sulfúrico (específico para la detección de azúcares), hecho que probó su naturaleza glucídica (Fig. 5R). Las fracciones que presentaron dichos picos se recogieron como una única muestra denominándose EPS-LS y EPS-LM a las procedentes de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, respectivamente, para ser utilizadas en los estudios posteriores.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que tras 8 h de crecimiento, el método desarrollado permite la obtención de altos niveles del EPS-LS y del EPS-LM, muy puros y con un rendimiento elevado (aproximadamente una recuperación del 80 %), ya que se obtuvieron 1,2 g L⁻¹ de EPS-LS y 0,8 g L⁻¹ de EPS-LM puros, cuando las concentraciones iniciales de estos EPS, en los sobrenadantes de los cultivos, fueron de 1,56 ± 0,15 g L⁻¹ y 1,03 ± 0,10 g L⁻¹, respectivamente.

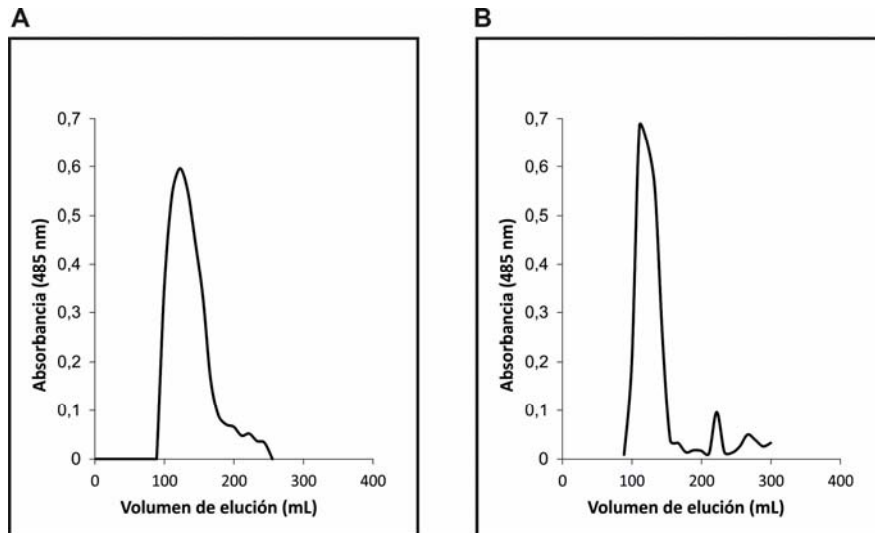


Figura 5R. Cromatografía de exclusión. Volúmenes de elución de los EPS de *Lb. sakei* MN1 (A) y *Lc. mesenteroides* RTF10 (B) tras su paso por una columna preparativa de Sepharose CL 6B.

2.2. Caracterización estructural de los EPS

Una vez purificados, se realizó una caracterización estructural de los EPS mediante: i) el análisis de la composición de monosacáridos; ii) el análisis de metilación y iii) la determinación del espectro de infrarrojos.

La identificación de los monosacáridos presentes en los EPS, se realizó mediante hidrólisis ácida de los mismos. Los monosacáridos obtenidos se transformaron en sus correspondientes acetatos de alditol, derivados volátiles, que se analizaron por cromatografía de gases. Para ambos EPS se detectó el mismo tipo de cromatograma (en la figura 6R se muestra el análisis del EPS-LS), revelando que la glucosa es el único componente tanto del EPS-LS como del EPS-LM.

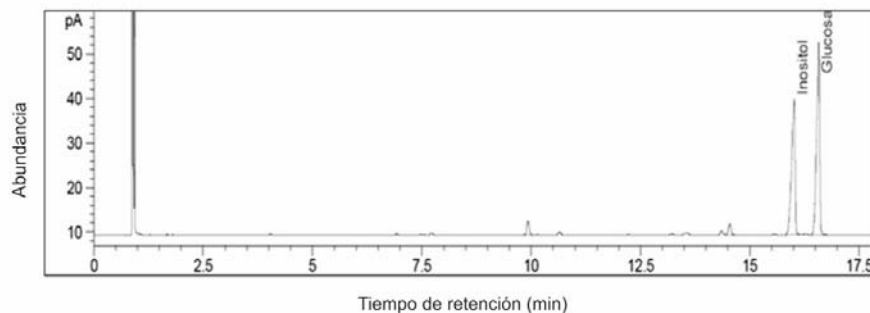


Figura 6R. Composición de monosacáridos del EPS-LS. Cromatografía líquido-gas de los acetatos de alditol obtenidos para el EPS-LS. Se utilizó en el análisis inositol como estándar interno.

El análisis mediante espectroscopia de infrarrojo mostró en el espectro del EPS-LM dos bandas: una a 865 cm^{-1} y otra a 927 cm^{-1} y en el del EPS-LS también se detectaron dos bandas: una a 849 cm^{-1} y otra a 916 cm^{-1} (Fig. 7R). Estas bandas son características de α -anómeros.

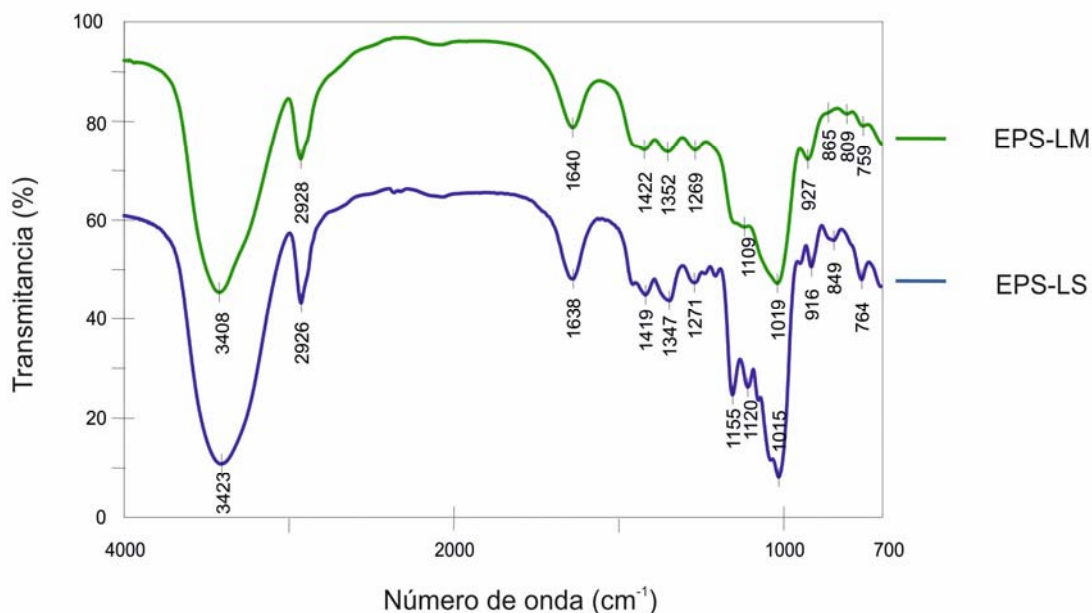


Figura 7R. Espectro de infrarrojos. Se muestran los espectros del EPS-LM y del EPS-LS.

Para determinar el tipo de enlace entre moléculas de glucosa se realizó el análisis de metilación de los EPS mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados obtenidos revelaron que el EPS-LS contiene un 97 % de enlaces 1-6 con un 3 % de sustituciones en la posición *O*-3 y que el EPS-LM posee un 91 % de enlaces 1-6 con un 9 % de sustituciones en la posición *O*-3 (Tabla 2R).

Tabla 2R. Análisis de metilación. Tipos de enlace (%) deducidos tras el análisis del EPS-LM y EPS-LS.

Tipo de enlace (%)	Glc-(1→	→6)-Glc-(1→	→3,6)-Glc-(1→
EPS-LS	2	95	3
EPS-LM	6	85	9

En consecuencia, debido a la existencia de un único monosacárido, a la posición de los enlaces entre las moléculas de glucosa y a que los espectros de infrarrojo

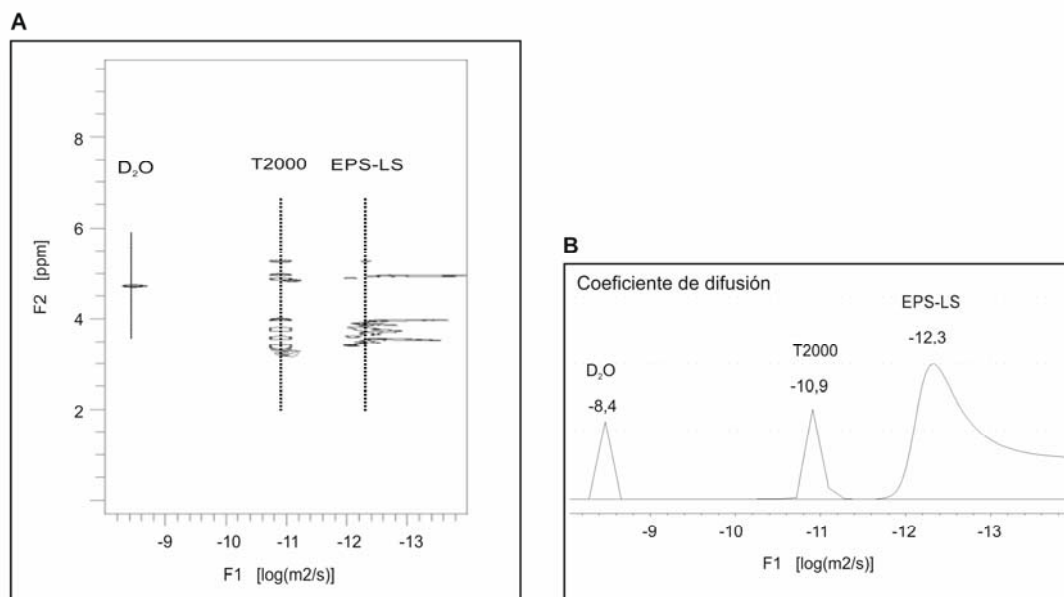


Figura 9R. Análisis por RMN de los EPS. (A) Comparación de los espectros 2D-DOSY del EPS-LS y del dextrano T2000. Alineamiento realizado superponiendo los espectros y utilizando como referencia el agua deuterada (D_2O). (B) Superposición de las proyecciones mostradas en (A) de las señales de la dimensión de difusión. Se indican los coeficientes de difusión.

3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS DEXTRANOS: POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO, ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR

Con el fin de explorar posibles aplicaciones del EPS-LS y del EPS-LM se realizó un estudio comparativo de ellos con dextranos comerciales de diferentes tamaños. Se analizaron las siguientes actividades: i) antiinflamatoria sobre macrófagos de ratón; ii) antiviral en modelos *in vitro* e *in vivo* de infección vírica de salmónidos y iii) inmunomoduladora en trucha arcoíris.

3.1. Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos de ratón

En primer lugar se realizaron los ensayos de estimulación de macrófagos de ratón con el EPS-LS, el EPS-LM y el dextrano comercial T2000 (tratados con polimixina B, como se describe en el apartado 3.3.2.2.2 del capítulo de materiales y métodos) a una concentración final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, usando como control de estimulación $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ del LPS de *E. coli*. Tras 24 h de incubación, en presencia del LPS, se observó un incremento de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 producidas por los macrófagos, mientras que no se detectó aumento con ninguno de los dextranos

utilizados. Estos resultados indicaron que los EPS no ejercen un efecto inflamatorio sobre los macrófagos de ratón (datos no mostrados).

Seguidamente, se procedió a evaluar un posible efecto de los dextranos frente a diferentes estímulos que ejercen una acción inflamatoria sobre macrófagos de ratón: levaduras de *C. albicans*; el LPS de *E. coli*; el curdlano de *A. faecalis*, y el zymosan de *S. cerevisiae*. Para ello se realizaron ensayos de co-tratamiento de los diferentes EPS con cada uno de los estímulos. Como control se evaluó el efecto de las levaduras, el LPS, el curdlano y el zymosan en ausencia de los EPS. Tras 24 h de tratamiento, los niveles de TNF- α producidos por los macrófagos en presencia de zymosan, levaduras o curdlano no se vieron afectados por la adición del EPS-LS o del EPS-LM (Fig. 10R, A). Sin embargo, el co-tratamiento con los diferentes dextranos, incluido el dextrano T2000, redujo tanto los niveles de TNF- α como los de IL-6 (Fig. 10R, B) inducidos por la presencia del LPS.

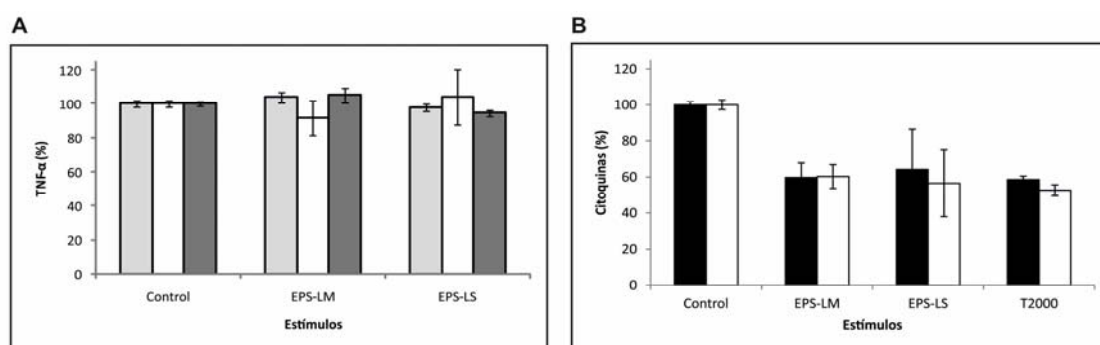


Figura 10R. Efecto inmunomodulador de los EPS. (A) Niveles de producción de TNF- α por macrófagos de ratón tras co-incubación del EPS-LM o el EPS-LS con curdlano (■), levaduras (□) y zymosan (■). (B) Niveles de producción de TNF- α (■) e IL-6 (□) por macrófagos de ratón tras co-incubación del EPS-LM, el EPS-LS o el dextrano T2000 con LPS. En todos los casos se muestran los niveles de producción de TNF- α e IL-6 en ausencia de los EPS (control).

Estos resultados indican que los dextranos producidos pueden tener un efecto antiinflamatorio frente a bacterias Gram negativas patógenas, como *E. coli* o *Salmonella*, ya que el LPS es un glicolípidio que constituye la parte principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

3.2. Actividad antiviral de los dextranos frente a virus de salmónidos

La actividad antiviral de los dextranos se determinó *in vitro* frente a los virus VNPI y VNHI, mediante el estudio de la inhibición del efecto citopático causado por ellos en las líneas celulares BF-2 y EPC, respectivamente. Previamente se ensayó la citotoxicidad del EPS-LM, el EPS-LS y de dextranos comerciales de distintas masas moleculares (T2000, T500, T70 y T10) frente a las antedichas líneas celulares. Los resultados obtenidos mostraron que los dextranos evaluados no son tóxicos, incluso a la concentración más alta ensayada de 5 mg mL⁻¹ (Tabla 3R).

Tabla 3R. Evaluación de la citotoxicidad sobre las líneas celulares BF-2 y EPC y de la actividad antiviral frente a VNPI y VNHI de los diferentes dextranos.

Dextrano	^a CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	VNPI		VNHI	
		^b EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	^c SI	^b EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	^c SI
EPS-LS	> 5000	1000	> 5	500	> 10
EPS-LM	> 5000	1000	> 5	750	> 6,7
T2000	> 5000	3000	> 1,7	5000	> 1
T500	> 5000	> 5000	> 1	> 5000	> 1
T70	> 5000	> 5000	> 1	> 5000	> 1
T10	> 5000	> 5000	> 1	> 5000	> 1

^aCC₅₀ es la concentración de un compuesto que inhibe el crecimiento de las células en un 50 %.

^bEC₅₀ es la concentración de un compuesto necesaria para inhibir el 50 % del efecto citopático causado por los virus respecto al control de infección.

^cSI es el cociente entre CC₅₀ y EC₅₀.

El EPS-LM, el EPS-LS y el dextrano comercial T2000, mostraron actividad antiviral (Tabla 3R), aunque se observó un comportamiento diferencial entre ellos. En el caso del VNPI los tres mostraron una actividad antiviral similar (Fig. 11R, A) siendo necesaria una concentración de 1000 µg mL⁻¹ del EPS-LM y del EPS-LS y de 3000 µg mL⁻¹ del dextrano T2000, para inhibir el 50 % del efecto citopático causado por el virus (Fig. 11R, A y Tabla 3R). Frente al VNHI, el EPS-LM y el EPS-LS mostraron una actividad antiviral similar en todas las concentraciones ensayadas, y superior a la del dextrano

T2000 (Fig. 11R, B). Así pues, con $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ del EPS-LS se redujo el efecto citopático al 50 %, mientras que con el dextrano T2000 fue necesaria una concentración 10 veces superior para obtener el mismo efecto (Fig. 11R, B y Tabla 3R).

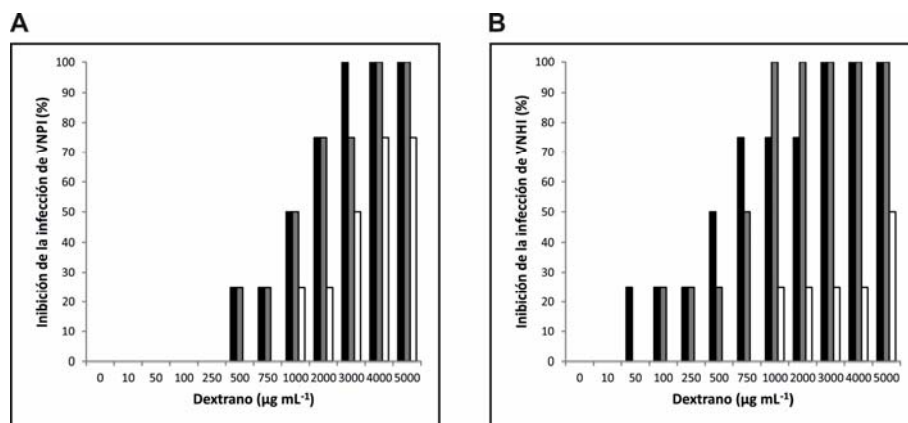


Figura 11R. Actividad antiviral de los dextransos. Efecto de diferentes concentraciones de EPS-LS (■), EPS-LM (▣) y del dextrano T2000 (□) en células BF-2 frente al VNPI (A) o en células EPC frente al VNHI (B). Expresado en porcentaje (%) de inhibición de la infección respecto al control.

3.2.1. Mecanismo de acción antiviral de los dextransos: efecto inhibitorio en la replicación del VNPI y del VNHI

Para intentar caracterizar el mecanismo de la actividad antiviral de los dextransos, se analizó su influencia en la replicación del VNPI y del VNHI, mediante un estudio *in vitro* del título viral. En el caso del VNPI, a la concentración utilizada más elevada ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) de EPS-LS o de EPS-LM, se observó en las células BF-2 una reducción significativa en el título del virus de aproximadamente 2,5 o 2 unidades logarítmicas (Fig. 12R, A). El EPS-LS a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ disminuyó el título viral en 1 unidad logarítmica. Sin embargo, la adición del dextrano T2000 incluso a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, no redujo el título del VNPI. Para el VNHI con $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS, EPS-LM o del dextrano T2000 se observó una reducción de 4, 2 o 1,5 unidades logarítmicas, respectivamente. A bajas concentraciones de los EPS (entre 100 y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), el título viral se redujo en el rango de 1 a 3,5 unidades logarítmicas, siendo el EPS-LS el de mayor efecto y el dextrano T2000 menos efectivo con una reducción de 0,5 unidades logarítmicas a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 12R, B).

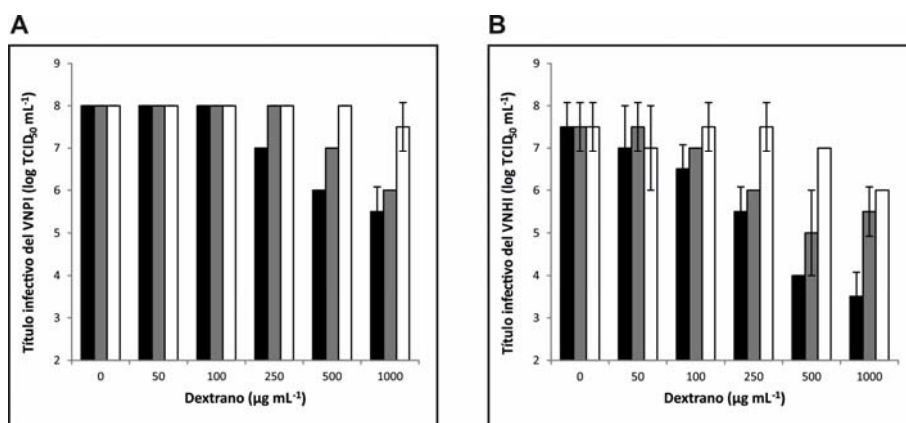


Figura 12R. Reducción del título viral de los dextranos. Efecto de diferentes concentraciones de EPS-LS (■), EPS-LM (▣), y del dextrano T2000 (□) en células BF-2 frente al VNPI (A) o en células EPC frente al VNHI (B). Los resultados representados son el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar.

3.2.2. Efecto del momento de adición de los dextranos

Se realizó un estudio *in vitro* de la influencia de los dextranos como agentes antivirales en condiciones de adición previa, simultánea o posterior a la de los virus, para investigar en qué fase del ciclo celular de los virus estos polímeros ejercían su mayor efecto inhibitorio. En células BF-2 infectadas con el VNPI, la adición de los dextranos 30 minutos antes de la infección provocó una reducción moderada del título viral infeccioso (1 unidad logarítmica con ambos EPS y 0,5 unidades con el dextrano T2000). La mayor inhibición se observó al añadir los dextranos al mismo tiempo que los virus o 1 h después de la infección viral, obteniéndose reducciones de 2,5, 1,5 y 1 unidades logarítmicas para el EPS-LS, el EPS-LM y el dextrano T2000, respectivamente (Fig. 13R, A). Resultados similares se obtuvieron para las células EPC tratadas con el VNHI (Fig. 13R, B) pero en este caso fue más pronunciado el efecto antiviral del EPS-LS. Así, cuando este polisacárido se añadió simultáneamente con el virus o 1 h después de la infección se observó una reducción drástica del título viral (5 unidades logarítmicas).

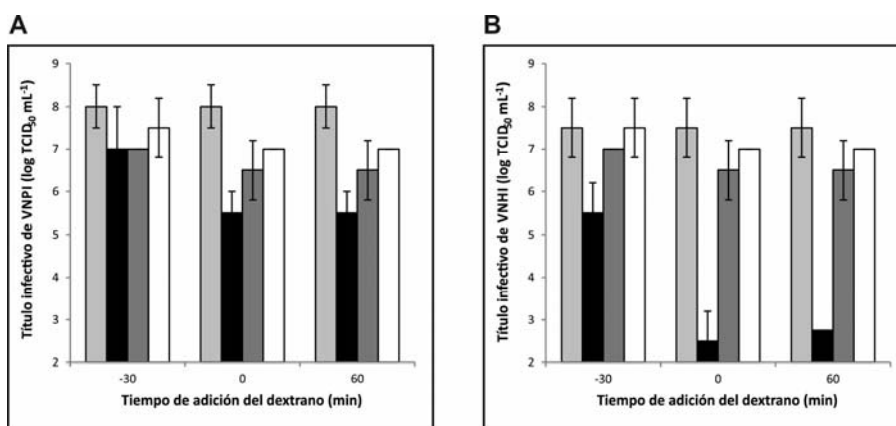


Figura 13R. Influencia del momento de adición de los dextranos. Efecto de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del EPS-LS (▒), del EPS-LM (■) y del dextrano T2000 (□) en el título infeccioso de VNPI (A) o VNHI (B) respecto al control infectado y no tratado (▒). Los resultados representados son el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar.

3.2.3. Efecto del EPS-LS en la supervivencia de truchas arcoíris infectadas

Dado que el EPS-LS mostró mayor actividad antiviral en los ensayos *in vitro*, se llevó a cabo un estudio *in vivo* utilizando dicho dextrano como agente antiviral frente a la infección de truchas arcoíris. En el experimento se utilizaron grupos de truchas no infectadas (grupo control), infectadas pero sin tratar (grupo control de infección) y pre-tratadas con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del EPS-LS antes de la infección con VNPI o VNHI (apartado 3.3.1.5 del capítulo de materiales y métodos). El primer día, después de la infección con VNPI, las truchas empezaron a mostrar signos característicos de la enfermedad viral (Fig. 14R, A). A partir de este momento la tasa de mortalidad empezó a aumentar gradualmente en los días 2, 4, 7, 11 y 13 hasta el día 16. En el caso de las truchas infectadas con VNPI y previamente tratadas con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS, los síntomas de enfermedad empezaron a mostrarse en el día 6 y las muertes registradas fueron de 1 trucha el día 7, otra el 12 y otra el día 19. En el caso del tratamiento con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS, los síntomas de la enfermedad aparecieron el día 6 y sólo fue registrada una muerte el día 7. Los peces del grupo control mostraron un comportamiento normal, con una supervivencia del 96 % al final del experimento, mientras que la mortalidad acumulada en el grupo control de infección fue del 53,3 %. En el caso de los grupos infectados, tratados con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS, la mortalidad acumulativa fue sólo del 20 % y 6,6 %, respectivamente. Por lo tanto, el

EPS-LS a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ aumentó la supervivencia del 46,7 % (grupo control de infección) al 87,5 %.

Las truchas infectadas con VNHI sin tratar con los dextrans, comenzaron a mostrar signos característicos de la enfermedad el día 5 después de la infección (Fig. 14R, B). El día 6 comenzó la mortalidad hasta alcanzar: el 40 % en el día 13, el 60 % el día 17 y un valor final del 73 % el día 30. En los grupos de truchas pre-tratados con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ del EPS-LS, los signos de la enfermedad se iniciaron el día 10 y las muertes registradas se produjeron los días 11, 13, 15 y 19 (un pez por día) y 2 peces el día 21. En peces tratados con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS, los signos de enfermedad se detectaron el día 11 y las muertes (1 pez por día) se produjeron los días 12, 15 y 21. La mortalidad acumulativa provocada por el VNHI en el grupo control fue del 73,3 %, mientras que en los grupos tratados con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ó $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue del 40 % y del 20 %, respectivamente. En consecuencia, los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS-LS aumentó la supervivencia de los peces del 26,7 % al 72,7 %.

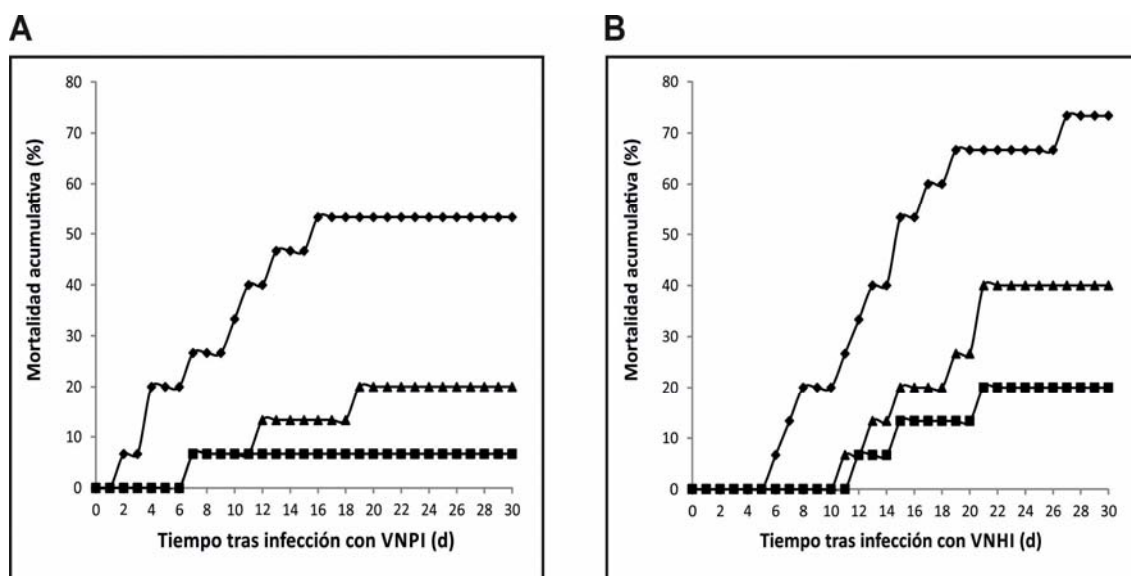


Figura 14R. Actividad antiviral del EPS-LS frente a la infección de alevines de trucha arcoíris con VNPI (A) o VNHI (B). Se muestra la mortalidad acumulativa (%) de truchas: no tratadas (♦), tratadas con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (▲) o con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (■) de EPS-LS, durante 3 días previos a la infección.

3.3. Actividad inmunomoduladora del EPS-LS

Para investigar la potencial actividad inmunomoduladora del EPS-LS, se analizó en tejido anterior de riñón de truchas arcoíris, la expresión de los genes IFN-1 e IFN- γ mediante RT-qPCR a diferentes tiempos, tras el tratamiento con el EPS-LS. Se escogió el riñón por ser el principal órgano de respuesta inmunológica en truchas. Se detectó un aumento en los niveles de expresión del IFN-1 (respuesta inmune innata) y del IFN- γ (respuesta inmune adquirida) en los grupos tratados en comparación con el grupo control sin tratar (Fig. 15R). En el caso del IFN-1 se incluyó en el experimento, como un control positivo, el poli I:C, un inmunoestimulador de la respuesta innata. Su efecto máximo (un incremento de aproximadamente 5 veces) se detectó el día 1 después de realizarse el tratamiento, reduciéndose su efecto el día 2 hasta casi los niveles de control (Fig. 15R, A). En el caso del tratamiento con el EPS-LS se observó una estimulación de la expresión de ambas glicoproteínas (Fig. 15R). Los mayores niveles del transcrito del IFN-1 se detectaron el día 3, tras el tratamiento, siendo todavía elevados el día 7 y situándose el día 15 próximos a los observados en el control no tratado. Por el contrario, y como era de esperar para la respuesta inmune adaptativa, los niveles del mRNA del IFN- γ sólo aumentaron drásticamente el día 15 después del tratamiento con el EPS-LS. Así, estos resultados revelaron que el EPS-LS tiene un efecto inmunomodulador *in vivo* sobre truchas arcoíris.

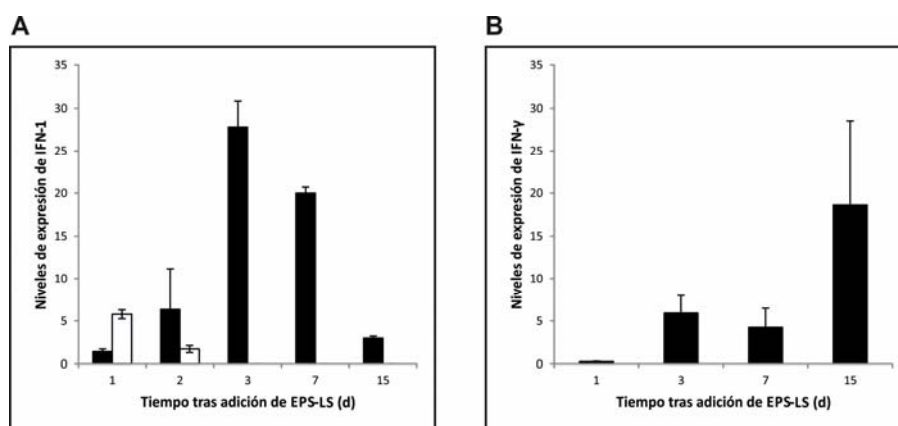


Figura 15R. Influencia del EPS-LS en la expresión de IFN-1 y del IFN- γ . Niveles de expresión de IFN-1 (A) e IFN- γ (B) determinados mediante RT-qPCR en tejido de riñón de truchas tratadas con EPS-LS (■) o poli I:C (□). Los resultados representados son el promedio de tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar.

4. GENES *dsr*: LOCALIZACIÓN, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN

Una vez determinado que los EPS de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1 son HoPS tipo dextrano y, sabiendo que éstos se sintetizan por un tipo de glucansacarasa conocida normalmente como dextransacarasa, se realizó un estudio para determinar las bases genéticas de dicha producción.

4.1. Detección de los genes *dsr*

Al inicio de este trabajo se analizaron las secuencias de nucleótidos de 14 genes codificantes de dextransacarasas bacterianas, depositadas en el banco de datos del NCBI, con el programa MegAlign (DNASTAR 5.0.1) y CLUSTALX 2.1 (anexo II.I). Como resultado se identificó una región conservada en todas ellas que se encuentra incluida en la secuencia codificante del centro catalítico de los enzimas. Dicha secuencia se utilizó para diseñar los oligonucleótidos *dsrF* y *dsrR* (Tabla 2M y anexo II.I).

Mediante PCR, utilizando estos oligonucleótidos y la DNA polimerasa Phusion, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb tanto a partir de preparaciones de DNA genómico como de DNA plasmídico de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 (Fig. 16R), resultado que indicó una posible localización plasmídica de los genes *dsr* en las cepas de estudio. Tras su purificación se secuenciaron los amplicones y mediante análisis con el programa BLAST se observó una identidad del 99 % entre la secuencia de *Lc. mesenteroides* RTF10 (698 pb) y otras secuencias de dextransacarasas depositadas en las bases de datos pertenecientes a diferentes cepas de *Lc. mesenteroides*. En el caso de *Lb. sakei* MN1 la secuencia de su amplicón (695 pb) presentó una identidad del 100 % con la secuencia de *Lb. curvatus* TMW 1.624 (número de acceso en GenBank HE972512), del 99 % con la de *Lb. sakei* Kg15 (número de acceso en GenBank AY697434) y del 88 % con varias secuencias de dextransacarasas depositadas en las bases de datos pertenecientes a diferentes cepas de *Weissella confusa*.

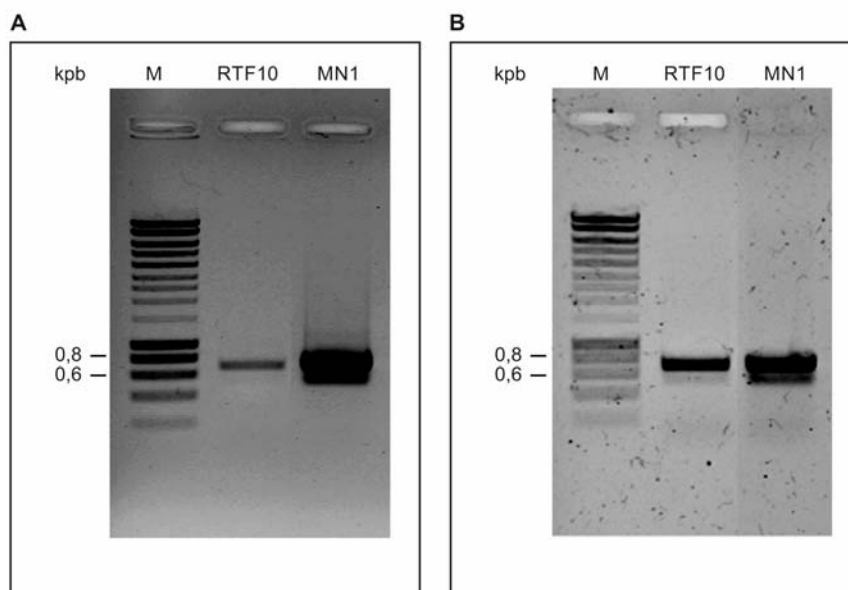


Figura 16R. Detección por PCR de los genes *dsr*. Análisis en gel de agarosa de las reacciones de PCR realizadas con las preparaciones de DNA plasmídico (A) y DNA genómico (B) de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1. Marcador de peso molecular (SmartLadder, Eurogentec) (M).

Además, al comparar entre sí, las secuencias parciales de los genes *dsr* de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1 utilizando el programa MegAlign (DNASTAR 5.0.1) se obtuvo una identidad entre ambos amplicones de tan sólo 56,9 %. Los resultados obtenidos indicaron que los genes codificantes de las dextran-sacarosas en *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 son distintos y se denominaron *dsrLS* y *dsrLM*, respectivamente. El alineamiento de las secuencias de los amplicones de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 con las 14 secuencias de otros genes que codifican dextran-sacarosas comentadas anteriormente, se muestra en el anexo II.I. Las secuencias de los amplicones están depositadas en el GenBank con los números de acceso KJ161305 (*dsrLS*) y KJ161306 (*dsrLM*).

4.2. Localización genética de los genes *dsr*

Con el objeto de determinar la localización de los genes *dsr* en los genomas de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1, se realizó un fraccionamiento de preparaciones de DNA plasmídico en geles de agarosa y después de la transferencia de los ácidos nucleicos a una membrana de nylon se efectuó una detección mediante la técnica de hibridación de Southern, empleando como sondas los amplicones descritos

y caracterizados en el apartado 4.1 de este capítulo y una temperatura de hibridación de 45 °C.

El análisis de las preparaciones en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio reveló la presencia de 4 bandas en ambas preparaciones pero localizadas en distintas posiciones (Fig. 17R, A). Con ambas sondas se obtuvo el mismo patrón de hibridación y en la Fig. 17, B se muestra la membrana hibridada con la sonda de *dsrLS*. En el caso del DNA de *Lb. sakei* MN1 se observaron dos bandas de hibridación y en el caso de *Lc. mesenteroides* RTF10 se detectó una única banda (Fig. 17, B), correspondiendo las tres con formas plásmidicas detectadas por tinción del gel antes de la transferencia (Fig. 17R, A).

La masa molecular de dichas bandas plásmidicas fue inferida por su migración relativa, utilizando como referencia los plásmidos de la estirpe *E. coli* V517. Así se determinó que la banda detectada en la preparación de DNA de *Lc. mesenteroides* RTF10 correspondía a un plásmido de aproximadamente 20,6 kpb denominado pRTF10, mientras que las bandas detectadas en la preparación de DNA de *Lb. sakei* MN1 podrían corresponder a las formas circulares bicatenarias covalentemente cerradas tanto monoméricas (banda con mayor movilidad), como diméricas (banda con menor movilidad) de un plásmido de aproximadamente 13,7 kpb denominado pMN1.

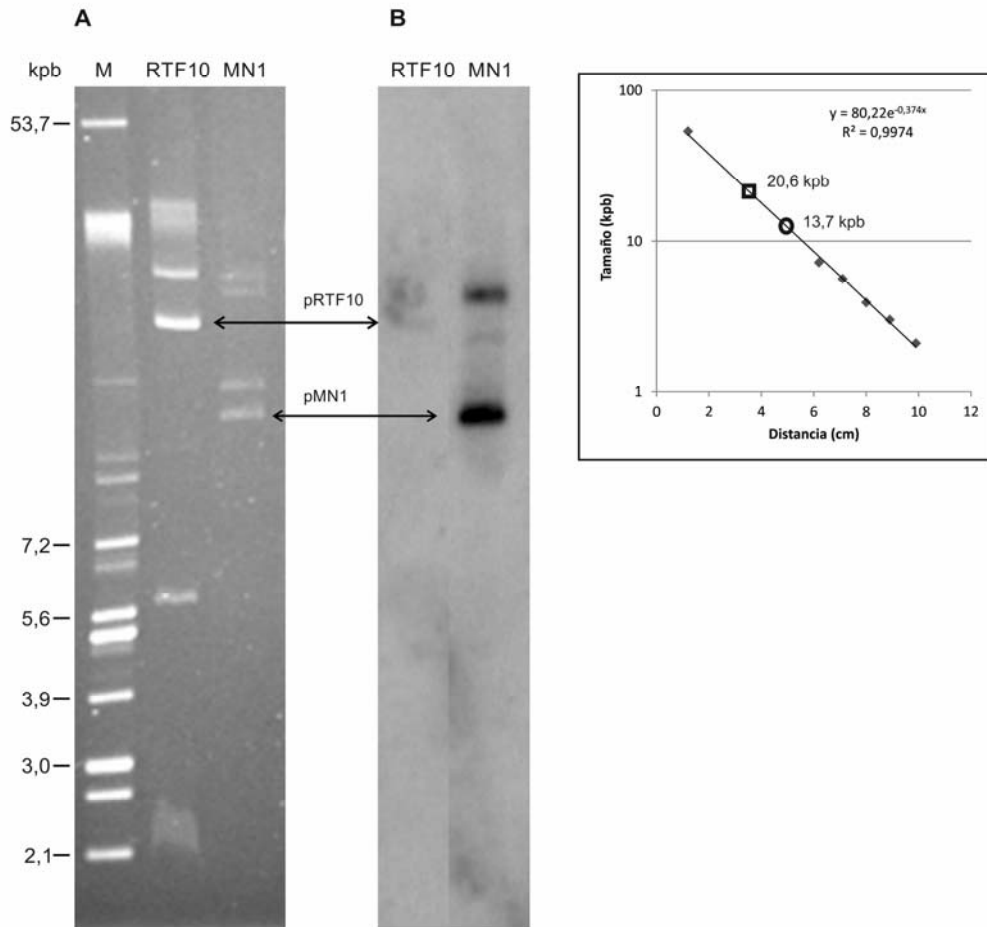


Figura 17R. Localización genómica de los genes *dsr* por hibridación de Southern. (A) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y (B) membrana hibridada con preparaciones de DNA plasmídico de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1. Preparación plasmídica de la estirpe *E. coli* V517 utilizada como marcador de peso molecular (M). Se muestra la relación entre la distancia migrada (cm) y el tamaño (kpb) para los plásmidos de pMN1 (○) y pRTF10 (□) interpolados en la recta de calibrado hecha con *E. coli* V517.

4.3. Plásmido pMN1

Debido a que las dextranasacarosas han sido estudiadas en mayor profundidad en cepas de *Lc. mesenteroides* y a la elevada actividad biológica del EPS-LM (apartado 3 de este capítulo), se decidió continuar con el estudio genético de *Lb. sakei* MN1. En primer lugar se secuenció el plásmido pMN1 portador del gen *dsrLS*, que codifica la dextranasacarasa de *Lb. sakei* MN1 (DsrLM), mediante el método de los dideoxyribonucleótidos, tras la amplificación al azar de regiones del plásmido

utilizando la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ (apartado 2.7 del capítulo de materiales y métodos). La determinación de la secuencia reveló que el tamaño del plásmido era de 11.126 pb y aparece recogida en el anexo I.III.

4.3.1. El gen *dsrLS* de *Lb. sakei* MN1

En el plásmido pMN1 se identificó la secuencia de 5.304 pb del gen *dsrLS* y, a partir de ella, se infirió la secuencia de 1.767 aminoácidos del enzima que codificaría y que fue denominado DsrLS (anexo I.III). El análisis de dichas secuencias frente a las depositadas en las bases de datos del NCBI con el programa BLAST, reveló homologías con otros genes bacterianos y con sus productos génicos. La mayor homología se detectó con el gen *gtf1624* de *Lb. curvatus* TMW 1.624 de 5.094 pb (número de acceso en GenBank HE972512) y la dextransacarasa codificada por él de 1.697 aminoácidos. Las secuencias se compararon entre sí utilizando el programa MegAlign (DNASTAR 5.0.1) y CLUSTALX 2.1 (anexo II.II). La diferencia en cuanto al número de aminoácidos entre las dos dextransacarosas se debe a la ausencia de 70 aminoácidos de la región C-terminal de DsrLS en la secuencia de *Lb. curvatus* TMW 1.624. Además, el gen *dsrLS* y su producto génico presentaron también una elevada homología con el gen *gtfkg15* de *Lb. sakei* Kg15 de 4.788 pb (número de acceso en GenBank AY697434) y la proteína que codifica de 1.595 aminoácidos (anexo II.II). Así, la dextransacarasa de *Lb. sakei* MN1 posee 172 aminoácidos más que su homóloga de *Lb. sakei* Kg15: 26 de ellos situados en el dominio ii (región variable), uno en el dominio iii (dominio catalítico) y 145 en el dominio iv (dominio C-terminal), de los cuatro dominios postulados para glucansacarosas (apartado 2.1 del capítulo de introducción). En consecuencia, la mayor divergencia de DsrLS con otras dextransacarosas, se localiza en su dominio C-terminal (Fig. 18R).

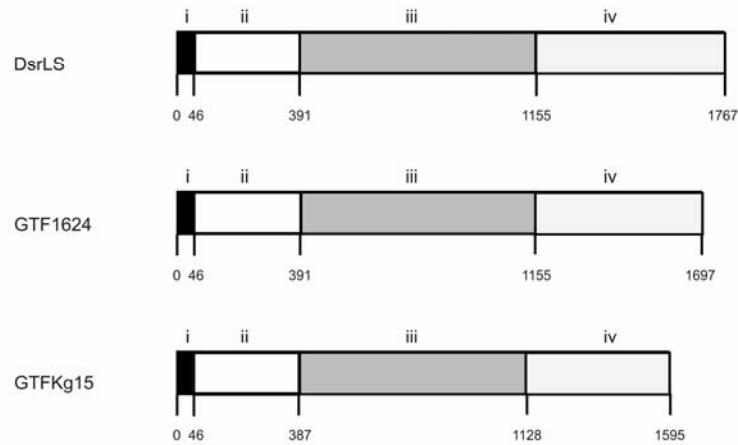


Figura 18R. Representación esquemática de las dextran-sacarosas analizadas. DsrLS de *Lb. sakei* MN1, GTF1624 de *Lb. curvatus* TMW 1.624 y GTFKg15 de *Lb. sakei* Kg15. Se muestran los 4 dominios: (i) N-terminal, (ii) región variable, (iii) dominio catalítico y (iv) C-terminal.

4.3.2. Entorno genético de *dsrLS*

En el plásmido pMN1 se identificó el replicón de 1.674 pb, homólogo a los replicones de la familia de plásmidos, cuyo prototipo es pUCL287 y que replican bidireccionalmente por el mecanismo de tipo *theta* [147]. Dicha región contiene el origen de replicación y los genes *repA* y *repB*, que codifican las proteínas RepA y RepB, respectivamente, implicadas en la iniciación de la replicación del plásmido y en los mecanismos de partición, los cuales son responsables de su estabilidad segregacional (Fig. 19R y anexo I.III). Además, se identificaron diversos iterones: i) 4 repeticiones directas de 11 pb que, de acuerdo con lo estudios realizados con pUCL287 [147], constituyen el origen de replicación del plásmido y presumiblemente el sitio de unión de RepA y ii) 5 repeticiones directas de 22 pb, que podrían estar implicadas en procesos de partición o de incompatibilidad.

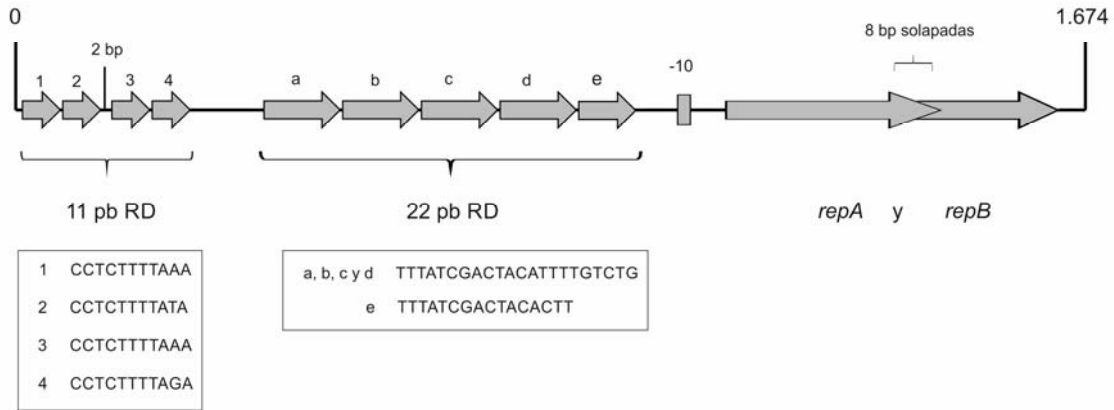


Figura 19R. Organización estructural del replicón de pMN1. Se indican las repeticiones directas (RD) de 11 y 22 pb así como sus secuencias; los genes *repA* y *repB* y la región -10 de su promotor putativo.

Además del replicón y del gen *dsrLS*, en el plásmido pMN1, se identificaron otras 7 pautas de lectura abierta (indicadas del 1 al 7 como ORF) (Fig. 20R y anexo I.III). El análisis BLAST de dichas secuencias frente a las depositadas en las bases de datos del NCBI reveló homologías de las ORF 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con las ORF 13, 12, 11, 10, 9 y 8 del plásmido pRV500 de *Lb. sakei* RV332, respectivamente [148], que pertenece a la misma familia de plásmidos que pMN1.

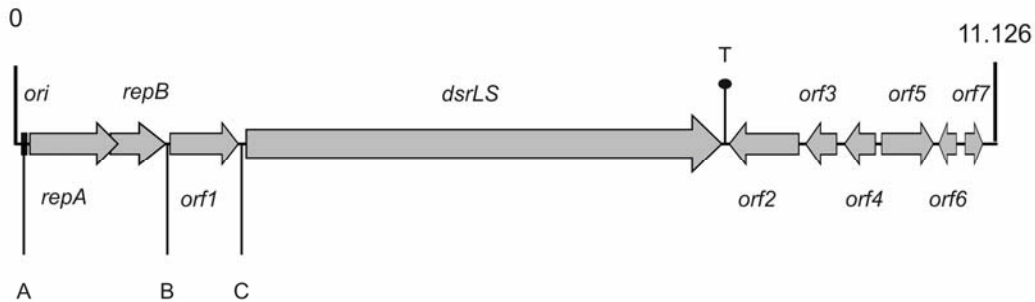


Figura 20R. Mapa físico de pMN1. Se muestran las 10 ORF del plásmido pMN1 con flechas en la dirección de su transcripción putativa. También se indican el origen de replicación (*ori*), un terminador transcripcional putativo localizado corriente abajo de *dsrLS* (T) y la localización de tres posibles regiones promotoras A, B y C.

Los porcentajes de homología a nivel de aminoácidos se muestran en la tabla 4R. En el caso de la *orf1* del plásmido pMN1, aparentemente su producto no sería funcional, al ser un polipéptido de 257, que presenta un 94 % de homología de sus 230

primeros aminoácidos, con el extremo amino de una proteína R de 998 aminoácidos perteneciente a un sistema de modificación y restricción de tipo I de *Lb. sakei* wikim 22 (número de acceso en GenBank KGB13906.1).

Tabla 4R. Homologías a nivel de aminoácidos de las ORF del plásmido pMN1 en la base de datos del NCBI.

ORF	Nº de aminoácidos	Homología en base de datos	% de identidad
<i>repA</i>	311	Proteína de replicación RepA y Proteína de replicación RepA de pRV500	<i>Lb. sakei</i> wikim 22 (KGB15351.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN61991.1) 99 % y 80 %
<i>repB</i>	169	Proteína de replicación RepB y <i>orf6</i> de pRV500 (169 aminoácidos homólogos de 189)	<i>Lb. sakei</i> wikim 22 (KGB13907.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN61992.1) 96 % y 39 %
<i>orf1</i>	257	Subunidad R (restricción) de sistema de restricción y modificación tipo I (230 aminoácidos homólogos de 257)	<i>Lb. sakei</i> wikim 22 (KGB13906.1) 94 %
<i>orf2</i>	262	<i>orf</i> de pKCA15 y <i>orf13</i> de pRV500	<i>Lb. sakei</i> KCA311 (AJQ16959.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN61998.1) 99 % y 98 %
<i>orf3</i>	94	<i>orf12</i> de pRV500 perteneciente a la familia XRE de reguladores transcripcionales	<i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN61999.1) 100 %
<i>orf4</i>	116	<i>orf</i> de pKCA15 perteneciente al módulo toxina RelE de un sistema de toxina- antitoxina y <i>orf11</i> de pRV500	<i>Lb. sakei</i> KCA311 (AJQ16961.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN62000.1) 100 %
<i>orf5</i>	195	<i>orf</i> de pKCA15 Integrasa y <i>orf10</i> de pRV500	<i>Lb. sakei</i> KCA311 (AJQ16962.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN62001.1) 100 % y 99 %
<i>orf6</i>	66	<i>orf</i> de pKCA15 y <i>orf9</i> de pRV500	<i>Lb. sakei</i> KCA311 (AJQ16963.1) y <i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN62002.1) 100 %
<i>orf7</i>	59	<i>orf8</i> de pRV500 (59 aminoácidos homólogos de 70)	<i>Lb. sakei</i> RV332 (AAN62003.1) 97 %

4.4. Expresión génica de *dsrLS*

Para el estudio de la expresión génica de *dsrLS* se obtuvieron preparaciones de RNA total a partir de cultivos de *Lb. sakei* MN1 crecidos en CDMG y CDMS. Con el fin de determinar si existían transcritos conteniendo *dsrLS* y otros genes circundantes y si los niveles de mRNA se veían afectados por la presencia de glucosa o sacarosa en el medio de cultivo, se realizaron 5 reacciones de RT-PCR para generar los amplicones que se muestran en la figura 21R, A. Los resultados del análisis electroforético en gel de agarosa revelaron que todas las reacciones generaron el amplicón del tamaño esperado, excepto la 5 que no generó ningún producto (Fig. 21R, B). Este último resultado era también esperado debido a la polaridad convergente de *dsrLS* y *orf2* y a la existencia de un terminador transcripcional putativo localizado a continuación del extremo 3' del gen *dsrLS*, que hacían preveer la falta de cotranscripción del gen *dsrLS* y la *orf2*.

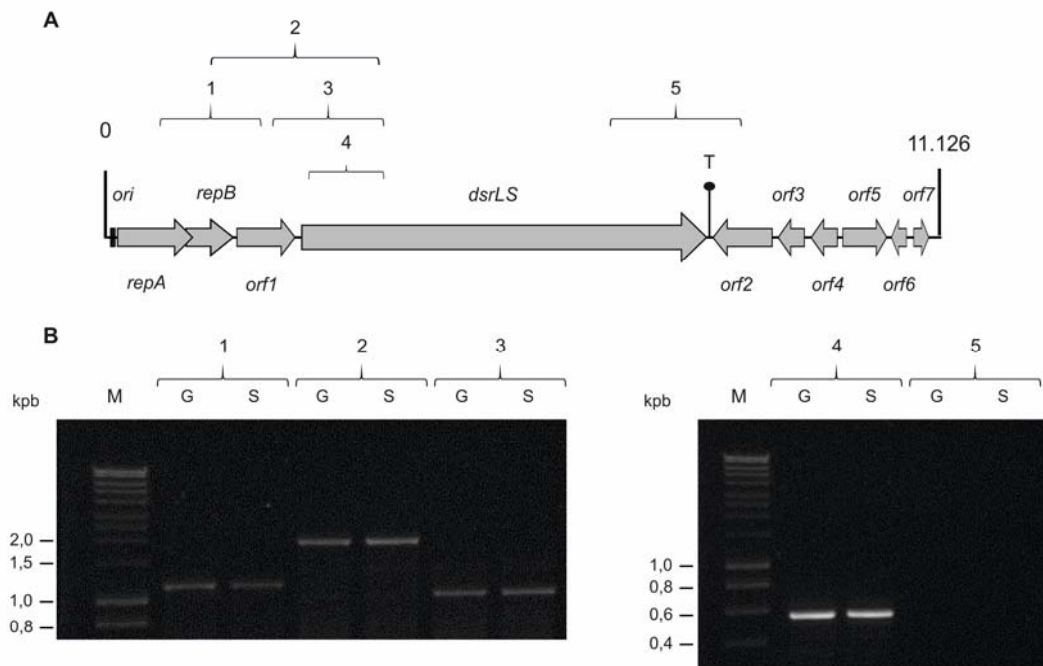


Figura 21R. Detección por RT-PCR de los niveles de mRNA. (A) Mapa físico de pMN1, en el cual se indican los 5 amplicones esperados como productos de 5 reacciones de RT-PCR generadas respectivamente con los oligonucleótidos rt1F y rt1R (1); P2F y rt2R (2); P3F y rt2R (3); rt2F y rt2R (4); rt3F y rt3R (5) (Tabla 2M). (B) Análisis en gels de agarosa de las reacciones de RT-PCR realizadas utilizando preparaciones de RNA total obtenidas a partir de cultivos crecidos en glucosa (G) o sacarosa (S). Marcador de peso molecular (SmartLadder, Eurogentec) (M).

Respecto a los amplicones detectados, la cuantificación de la intensidad de las bandas indicó que los niveles de mRNA no variaban de forma notable cuando los cultivos se crecieron en presencia de sacarosa en lugar de glucosa. Además, los resultados obtenidos mostraron una inesperada cotranscripción de *dsrLS* con los genes *repA* y *repB*.

4.5. Identificación de regiones promotoras en pMN1

Con el fin de detectar posibles regiones promotoras en el plásmido pMN1 de *Lb. sakei* MN1 se amplificaron independientemente las regiones A, B y C, localizadas corriente arriba de *repA*, *orf1* y *dsrLS* (Fig. 20R), respectivamente, y se clonaron en el plásmido pRCR [118] (apartado 3.6 del capítulo de materiales y métodos). Los insertos se localizaron corriente arriba del gen sintético *mrfp*, que codifica la proteína fluorescente mCherry, una versión monomérica de la proteína fluorescente roja de *Dicosoma* sp., y cuyos codones están optimizados para lograr su expresión eficiente en BAL [139]. Así se obtuvieron los plásmidos pRCR13, pRCR14 y pRCR15 que contienen las regiones A, B o C, respectivamente (Fig. 22R).

Los clonajes se realizaron en la cepa *L. lactis* MG1363 y posteriormente los plásmidos fueron transferidos a *Lb. sakei* MN1. También se transfirió a dicha bacteria el plásmido pRCR12 para ser utilizado como control positivo de expresión. Este plásmido contiene la fusión transcripcional del promotor fuerte Px, del gen *malX* de *S. pneumoniae*, al gen *mrfp*, que confiere fluorescencia a lactobacilos [119]. Además, como control negativo se utilizó la estirpe parental *Lb. sakei* MN1 carente de fluorescencia.

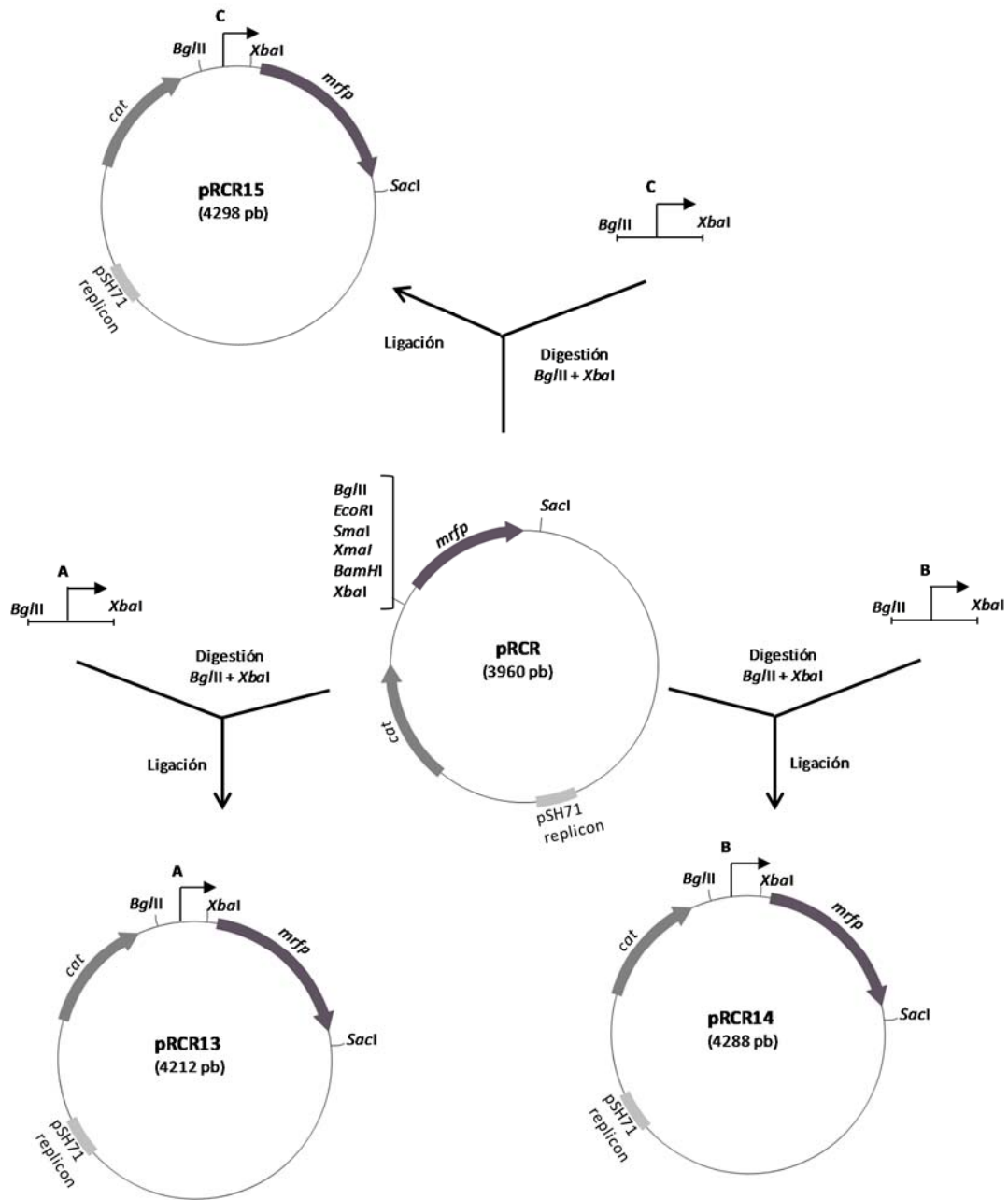
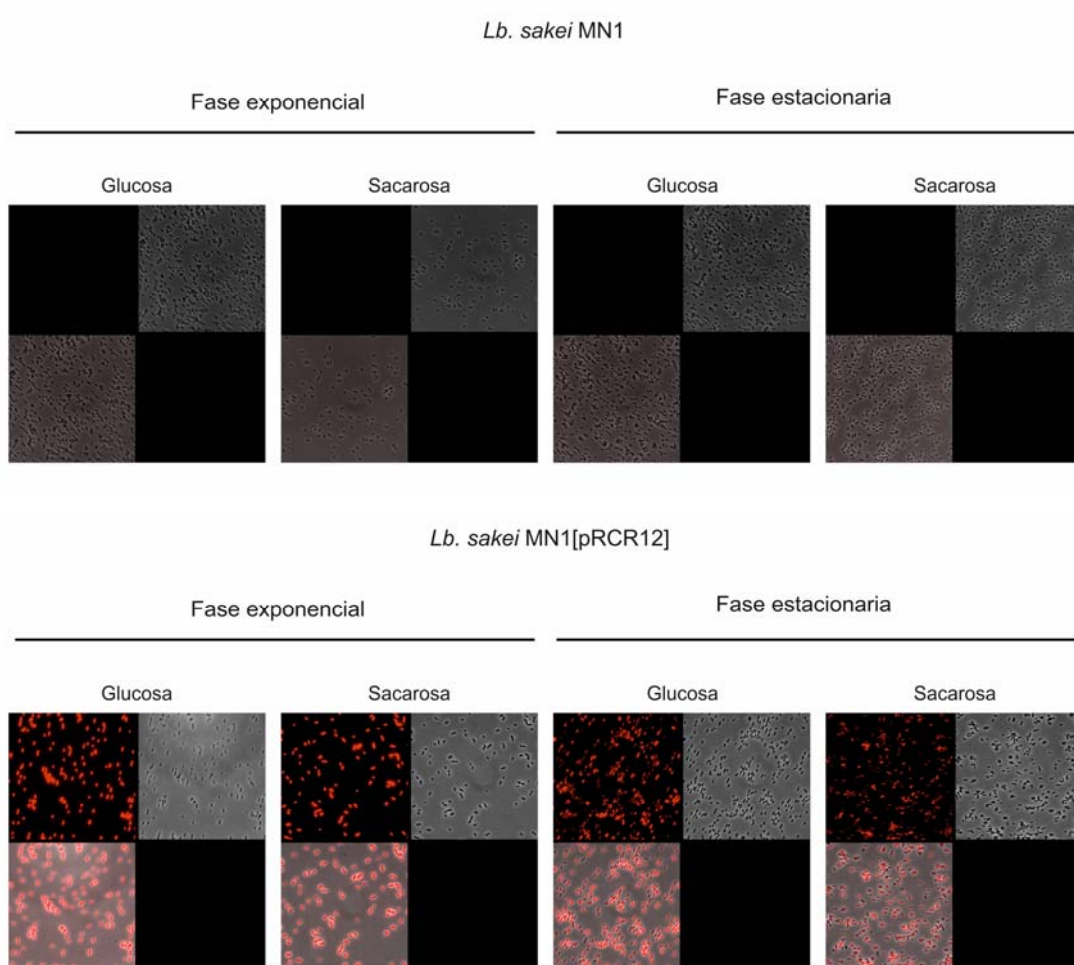


Figura 22R. Diagrama de los plásmidos construidos pRCR13, pRCR14 y pRCR15 a partir del plásmido pRCR. Se muestran los sitios de restricción más relevantes, así como el gen *mrfp*, que codifica la proteína mCherry, y el gen *cat*, que codifica una cloranfenicol acetil transferasa responsable de la resistencia a cloranfenicol. A, B y C hacen referencia a las regiones insertadas en pRCR.

Resultados

Todas las bacterias fueron cultivadas en MRSG y MRSS y analizadas mediante microscopía óptica de contraste de fases y de fluorescencia (Fig. 23R). Como se esperaba, la presencia de pRCR12 confirió fluorescencia a *Lb. sakei* MN1. Además, las células portadoras de pRCR13 y pRCR15 también mostraron fluorescencia en los dos medios utilizados tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, no se detectó fluorescencia en las células portadoras de pRCR14 en ninguna de las condiciones ensayadas.



Resultados

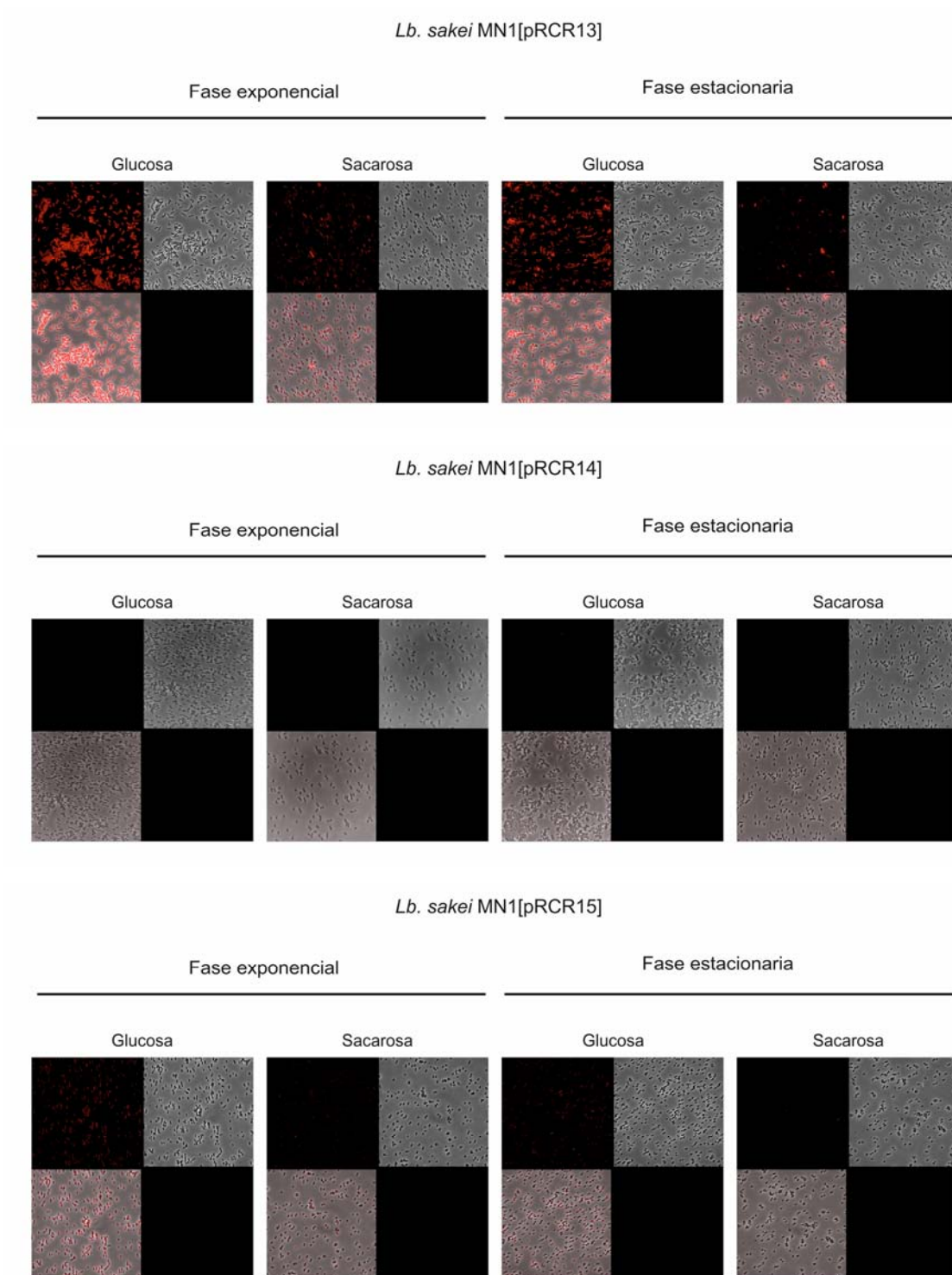


Figura 23R. Análisis de estirpes portadoras del gen *mrfp* por microscopía óptica. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases (parte superior derecha), por microscopía fluorescencia (parte superior izquierda), y el solapamiento de ambas (parte inferior izquierda), de cultivos de las bacterias, crecidos en medio con glucosa o sacarosa, en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria.

Posteriormente se procedió a cuantificar la fluorescencia de los cultivos bacterianos. Así, la detección de los niveles de la proteína autofluorescente mCherry activa se realizó en cultivos de las cepas crecidas en medio MRSG o MRSS, tras la sedimentación de las células y su concentración (20 veces) por resuspensión en tampón PBS (pH 7,4). Se realizó una determinación simultánea de la $A_{480\text{nm}}$ como medida del crecimiento bacteriano y de la fluorescencia de las bacterias. En la tabla 5R aparecen recogidos los niveles de fluorescencia normalizados para la biomasa celular estimada por los valores de $A_{480\text{nm}}$. Los resultados obtenidos confirmaron que en las regiones clonadas A y C y no en la región B, existían promotores transcripcionales, ya que se observaron niveles de fluorescencia significativos en las cepas MN1[pRCR13] y MN1[pRCR15], mientras que en la cepa MN1[pRCR14] sólo se detectaron los mismos niveles que en la estirpe parental *Lb. sakei* MN1 carente de plásmido recombinante (Tabla 5R). Además, la comparación de los niveles de fluorescencia mostró que, en todas las condiciones probadas, la transcripción desde Px era la más elevada y que el promotor presente en la región A era más fuerte que el localizado en la región C (Tabla 5R).

Tabla 5R. Relación de intensidad de fluorescencia respecto a la biomasa celular.

Cepa	Fase exponencial		Fase estacionaria	
	Glucosa	Sacarosa	Glucosa	Sacarosa
<i>Lb. sakei</i> MN1	0,126 ± 0,06	0,091 ± 0,01	0,047 ± 0,01	0,044 ± 0,05
<i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR12]	35,5 ± 3,0	35,1 ± 1,8	22,7 ± 1,4	13,9 ± 0,6
<i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR13]	14,2 ± 1,4	7,6 ± 0,7	14,9 ± 1,1	6,8 ± 0,2
<i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR14]	0,463 ± 0,04	0,200 ± 0,02	0,551 ± 0,03	0,157 ± 0,01
<i>Lb. sakei</i> MN1[pRCR15]	7,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2	4,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Además, los niveles de fluorescencia fueron iguales en MRSS y MRSG para las células portadoras de pRCR12 en la fase exponencial, y ligeramente superiores en MRSG (2 veces) en las estirpes portadoras de pRCR13 y pRCR15 (Tabla 5R). Este hecho podría ser debido a que la presencia del dextrano en los cultivos crecidos en MRSS podría provocar un apantallamiento que enmascarara la fluorescencia. Sin embargo, el

análisis por microscopía de fluorescencia también reveló en células individuales una menor fluorescencia en bacterias crecidas en medio MRSS (Fig. 23R) y, en ambos casos, las células fueron lavadas repetidas veces para eliminar el dextrano. Independientemente de la causa de estas diferencias en fluorescencia, los resultados revelaron que en presencia de sacarosa no hay una inducción transcripcional a partir de los promores presentes en las regiones A y C.

5. CAPACIDAD DE AGREGACIÓN Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN RELACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE DEXTRANO

Durante el desarrollo de este trabajo, se observó que *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 presentaban características diferenciales de crecimiento en medio líquido en presencia de glucosa, lo que condujo a un estudio en profundidad de este comportamiento.

5.1. Análisis de la capacidad de agregación y de formación de biopelículas de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10

Durante el crecimiento de *Lb. sakei* MN1 en estático en medio MRSG y no en medio MRSS, se observó que con el paso del tiempo, la biomasa celular se depositaba en el fondo del tubo de cultivo (Fig. 24R). Este comportamiento diferencial no se observó en los cultivos de *Lc. mesenteroides* RTF10 donde las células se mantenían en suspensión (Fig. 24R).



Figura 24R. Aspecto del crecimiento de *Lc. mesenteroides* RTF10 y *Lb. sakei* MN1 en medio líquido. Fotografía de los cultivos crecidos en medio MRSG y MRSS, durante 24 h a 30 °C en estático.

Esta capacidad de agregación de *Lb. sakei* MN1 en MRSG y no en MRSS, así como la falta de capacidad de agregación de *Lc. mesenteroides* RTF10 se observó también mediante microscopía óptica (Fig. 25R). Para ello, los cultivos fueron sedimentados mediante una centrifugación suave y concentrados 20 veces por resuspensión en PBS (pH 7,4) sin agitación, antes de ser analizados por microscopía de contraste de fases.

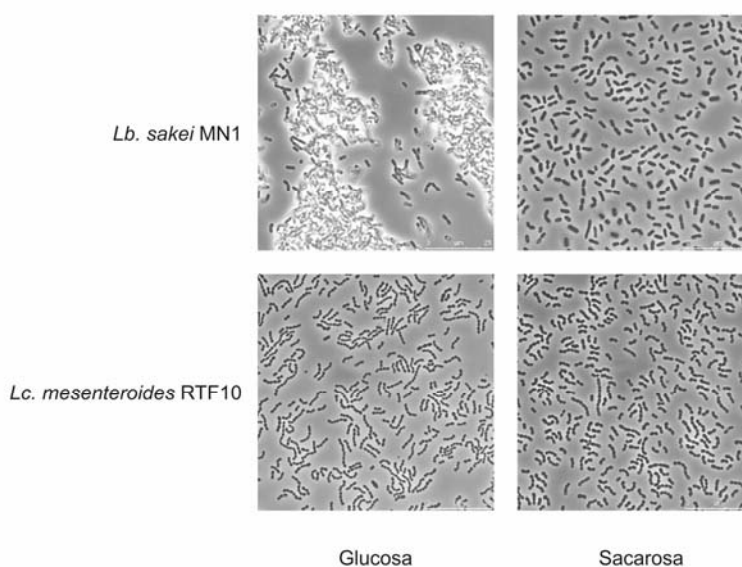


Figura 25R. Observación de la agregación celular al microscopio de contraste fases (100x). Fotografía de cultivos en fresco de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 crecidos en medio líquido MRS con glucosa o sacarosa.

En estas condiciones de cultivo, se llevó a cabo una cuantificación de la producción de EPS en el medio, obteniéndose valores de $2,9 \text{ g L}^{-1} \pm 0,3$ para *Lc. mesenteroides* RTF10 y de $5,1 \text{ g L}^{-1} \pm 0,1$ para *Lb. sakei* MN1, después de 24 h de crecimiento en medio MRSS y no detectándose producción de dextrano en los cultivos de ambas bacterias crecidos en MRSG. Así, los resultados obtenidos indicaron que la presencia del dextrano previene la agregación de las células de *Lb. sakei* MN1.

Además, se estudió la capacidad de las cepas para formar biopelículas tanto sobre superficie de vidrio como en placas de poliestireno tras su crecimiento en medio MRSG o MRSS. Los valores de $A_{595\text{nm}}$ en tubos de vidrio fueron de $0,31 \pm 0,05$ en MRSG y de $0,03 \pm 0,006$ en MRSS para *Lb. sakei* MN1, mientras que para *Lc. mesenteroides* RTF10 fueron de $0,01 \pm 0,009$ tanto en MRSG como en MRSS. Los resultados obtenidos utilizando placas de estireno fueron similares, pero los valores de $A_{595\text{nm}}$ fueron más

elevados, alcanzándose niveles de $2,25 \pm 0,20$ en MRSG, y de $0,46 \pm 0,01$ en MRSS para *Lb. sakei* MN1; mientras que para *Lc. mesenteroides* RTF10 los niveles fueron de $0,01 \pm 0,001$ en MRSG y $0,02 \pm 0,001$ en MRSS. En consecuencia, los resultados obtenidos con los dos métodos mostraron una capacidad de *Lb. sakei* MN1 superior a la de *Lc. mesenteroides* RTF10 para formar biopelícula tanto en ausencia como en presencia de dextrano; estando disminuida la capacidad de *Lb. sakei* MN1 (entre 4 y 10 veces) cuando la cepa se cultivó en MRSS y produjo dextrano (Fig. 26R).

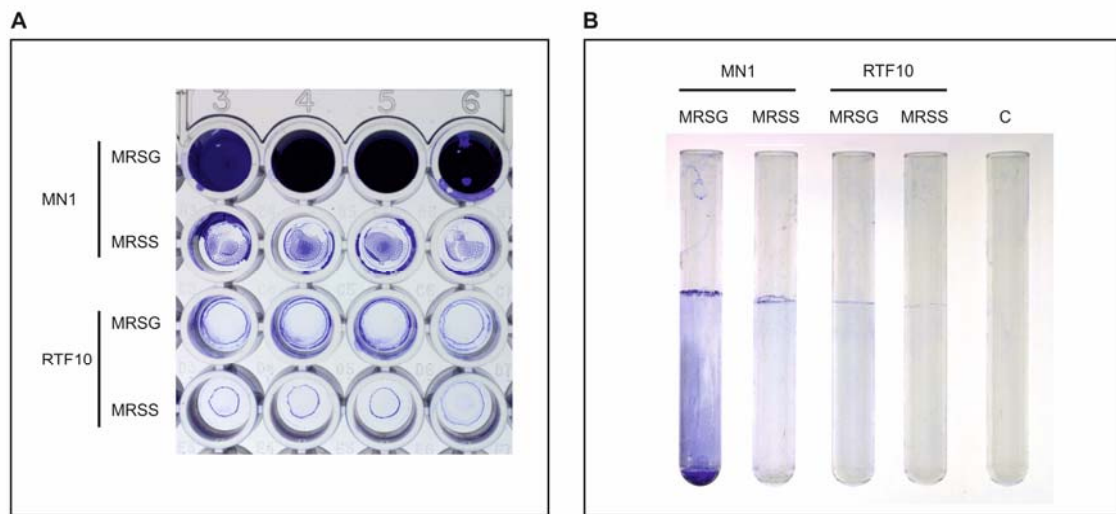


Figura 26R. Detección de la formación de biopelícula. Tinción con cristal de violeta al 0,5 % (w/v) en placa de poliestireno (A) o en tubo de vidrio (B) tras el crecimiento de *Lc. mesenteroides* RTF10 y de *Lb. sakei* MN1, en medio MRSG o MRSS, durante 24 h a 37 °C.

5.2. Análisis de la capacidad de agregación de *Lb. sakei* MN1[pRCR12]

El marcaje fluorescente de las bacterias permite su análisis directo en distintos hábitats y modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ese motivo, con el objeto de evaluar posteriormente la capacidad de colonización de *Lb. sakei* MN1 en modelo *in vivo* de pez cebra, la capacidad de agregación fue también estudiada en la cepa recombinante *Lb. sakei* MN1[pRCR12]. Dicha cepa presentó el mismo crecimiento en medio líquido (Fig. 27R, A) y la misma capacidad de agregación en medio MRSG, que *Lb. sakei* MN1, cuando los cultivos se analizaron mediante microscopía óptica (Fig. 28R). Se determinó, además, la producción del dextrano tanto por crecimiento en placa (Fig. 27R, B) como por el método del fenol-sulfúrico en estas condiciones, obteniéndose

valores de producción $4,8 \text{ g L}^{-1} \pm 0,2$, después del crecimiento de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] en MRSS durante 24 h a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

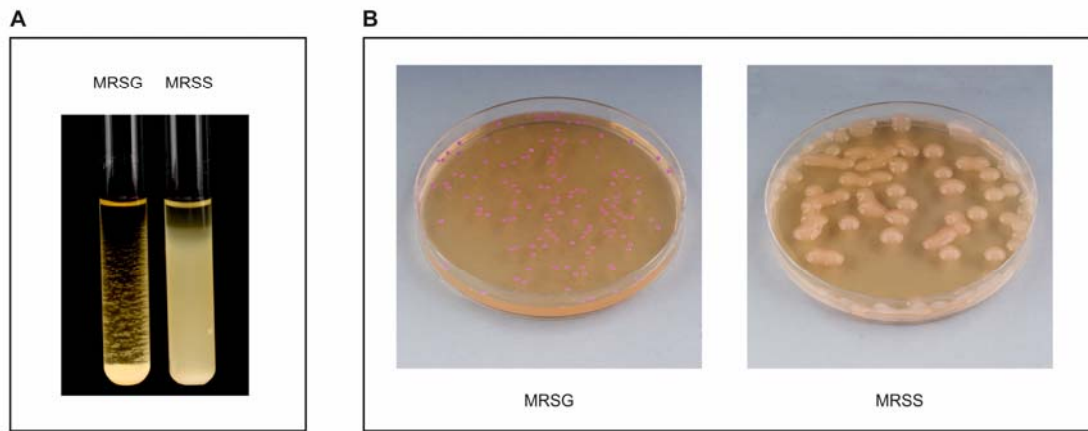


Figura 27R. Aspecto del crecimiento de *Lb. sakei* MN1[pRCR12]. Crecimiento de la cepa en medio MRSG o MRSS líquido (A) y sólido (B) durante 24 h a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

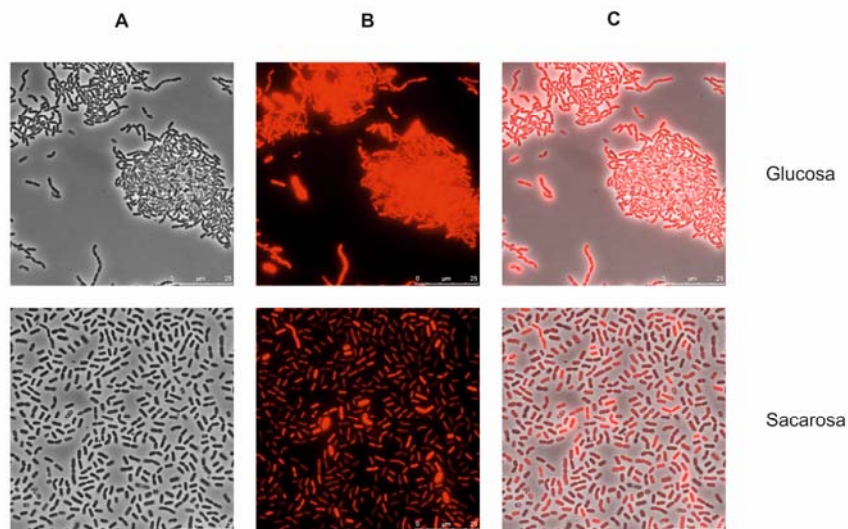


Figura 28R. Agregación celular de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] observada por microscopía de contraste de fases (100x). Imágenes de suspensiones celulares de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] en fresco, procedentes de cultivos crecidos en medio MRS con glucosa o sacarosa analizadas por microscopía de contraste de fases (A), microscopía de fluorescencia (B) y la superposición de ambas (C).

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia del plásmido pRCR12 no afecta ni a la capacidad de producción de dextrano de *Lb. sakei* MN1, ni a su capacidad de agregación.

5.3. Análisis de la capacidad de desagregación de *Lb. sakei* MN1 y *Lb. sakei* MN1[pRCR12]

Los resultados obtenidos en los apartados 5.1 y 5.2 de este capítulo, indicaban que la producción del dextrano interfiere con la capacidad de agregación en *Lb. sakei* MN1. Para validar esta hipótesis se estudió si, tras producirse la agregación de *Lb. sakei* MN1 y *Lb. sakei* MN1[pRCR12] en medio MRSO, podía producirse una desagregación de las mismas, únicamente provocada por la adición de sacarosa al medio de cultivo. Los resultados mostraron que tras la adición del hidrato de carbono a un cultivo crecido en medio MRSO agregado (Fig. 29R, A) se producía la desagregación de las células (Fig. 29R, C), mientras que no tenía lugar este proceso al adicionar glucosa al medio (Fig. 29R, B). En paralelo, se analizó la producción de EPS mediante el método del fenol-sulfúrico confirmándose la síntesis de EPS tras la adición de la sacarosa (datos no mostrados).

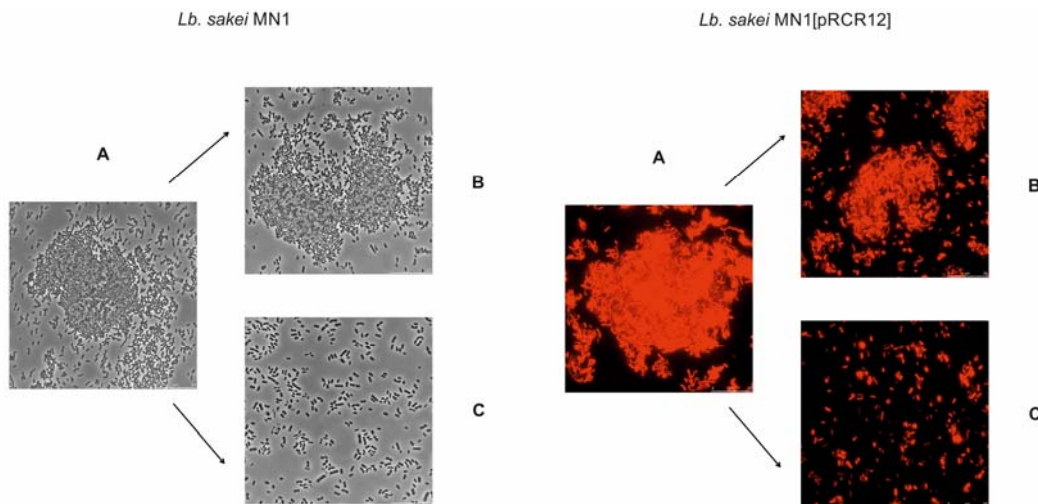


Figura 29R. Desagregación celular en *Lb. sakei* MN1 y *Lb. sakei* MN1[pRCR12] inducida por la adición de sacarosa. Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases para *Lb. sakei* MN1 y por microscopía de fluorescencia para *Lb. sakei* MN1[pRCR12] (100x). Suspensiones celulares en fresco procedentes de cultivos crecidos en MRSO (A), en MRSO tras la adición de glucosa (B) y en MRSO tras la adición de sacarosa (C).

5.4. Evaluación de *Lb. sakei* MN1 en pez cebra como potencial probiótico de peces

Dada la elevada capacidad de agregación y de formación de biopelícula de la cepa *Lb. sakei* MN1, descrita anteriormente, se procedió a estudiar: i) la capacidad de colonizar el intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra y ii) su capacidad para competir con *V. anguillarum*, tomado como ejemplo de bacterias patógenas de peces en este nicho ecológico.

Ya que las larvas de pez cebra son transparentes, se utilizaron cepas marcadas fluorescentemente: *Lb. sakei* MN1[pRCR12] con la proteína mCherry y *V. anguillarum* NB10 con la proteína GFP. Así fue posible detectar *in vivo* la capacidad de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] tanto de colonización como de competición frente a *V. anguillarum* NB10 mediante microscopia de fluorescencia (Fig. 30R).

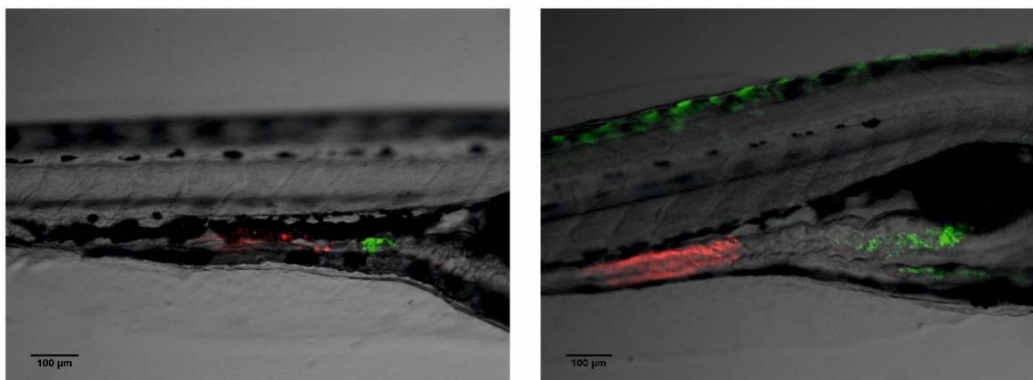


Figura 30R. Competición de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] y *V. anguillarum* NB10 en el intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra. Se muestran imágenes al microscopio de fluorescencia de larvas infectadas con *V. anguillarum* NB10 tratadas previamente con *Lb. sakei* MN1[pRCR12].

Por lo que respecta a la capacidad de colonización de *Lb. sakei* MN1[pRCR12] en presencia de glucosa o sacarosa, los datos de recuento en placa a las 6, 24 y 48 h de exposición mostraron una prevalencia muy superior en el intestino de larvas, cuando la incubación mostraron una prevalencia muy superior en el intestino de larvas, cuando la incubación con las mismas se realizó en presencia de glucosa (Fig. 31R). Este resultado indicó una mayor colonización por las bacterias en condiciones en las que no deberían producir dextrano y agregarse, según los resultados *in vitro* (Fig. 28R). La diferencia en el recuento de colonias (entre 4 y 10 veces) se observó desde el primer análisis a las 6 h y se mantuvo a las 24 h y 48 h (Fig. 31R). El recuento promedio de colonias en

glucosa a las 6 h fue de 40,6 ufc/larva frente a 8,33 ufc/larva en sacarosa. A las 24 h los niveles de bacterias adheridas disminuyeron hasta 16,33 ufc/larva en presencia de glucosa y 1,07 ufc/larva en presencia de sacarosa. A las 48 h, el valor promedio de recuento fue de 5,07 ufc/larva en glucosa y de 0,4 ufc/larva en sacarosa.

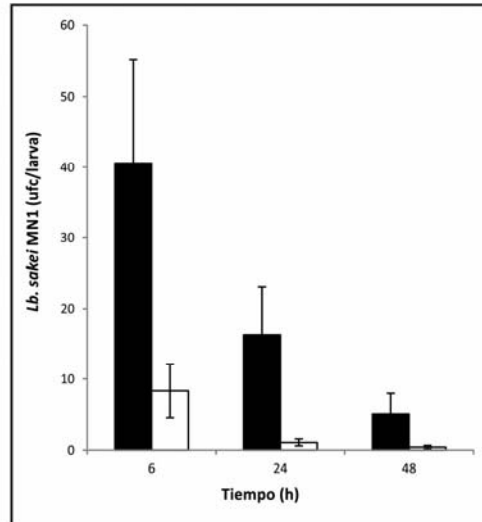


Figura 31R. Colonización del intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra por *Lb. sakei* MN1[pRCR12] en presencia de glucosa (■) o sacarosa (□).

En cuanto a los ensayos de competición con *V. anguillarum* NB10, los resultados obtenidos mostraron que en ausencia de *Lb. sakei* MN1[pRCR12], la mortalidad acumulativa de las larvas tras la infección con *V. anguillarum* NB10 era del 62 %. Sin embargo, el tratamiento previo con *Lb. sakei* MN1[pRCR12] conllevó a disminuir dicha mortalidad hasta niveles del 27 %, cuando todo el experimento se realizó en presencia de glucosa (Fig. 32R). Además la sustitución de la glucosa por sacarosa durante todo el proceso o durante la infección provocó también una considerable disminución de la mortalidad acumulativa hasta valores del 37 % y 38 % (Fig. 32R). Estos resultados indicaron que el efecto probiótico se debe a la cepa en estudio, *per se*, independientemente de su producción de dextrano o de su agregación.

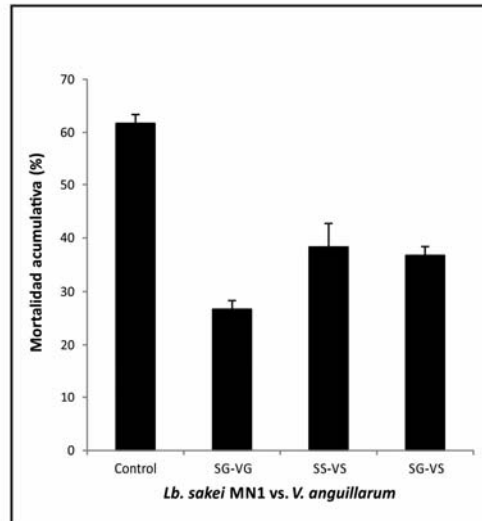


Figura 32R. Competición entre *Lb. sakei* MN1[pRCR12] (S) y *V. anguillarum* NB10 (V) en el intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra. Se muestra la mortalidad acumulativa (%) de larvas: no infectadas (control); con pretratamiento con *Lb. sakei* MN1[pRCR12] e infección con *V. anguillarum* NB10 en presencia de glucosa (SG-VG) o en presencia de sacarosa (SS-VS); o con pretratamiento en presencia de glucosa e infección en presencia de sacarosa (SG-VS).

DISCUSIÓN

1. PRODUCCIÓN DE EPS POR *Lb. sakei* MN1 Y *Lc. mesenteroides* RTF10 Y SU INTERRELACIÓN CON EL METABOLISMO CENTRAL

Los EPS producidos por BAL poseen numerosas propiedades tecnológicas (actuando principalmente como espesantes, estabilizantes y emulsionantes) lo que ha llevado al uso de las bacterias productoras para mejorar las propiedades reológicas y organolépticas de los productos fermentados, mediante la producción de dichos biopolímeros *in situ* [77] [42]. Además, existen estudios *in vitro* e *in vivo* que atribuyen a ciertos EPS efectos beneficiosos para la salud lo que los convierte en candidatos idóneos para su utilización en el desarrollo de alimentos funcionales [93] [149]. Otras propiedades, por ejemplo la viscosidad, que contribuye a la reología de alimentos como los productos lácteos, pueden sin embargo tener efectos deletéreos en otros alimentos como ocurre con las bebidas alcohólicas o los productos cárnicos fermentados. Dichas características han permitido detectar y aislar cepas productoras de EPS, a partir de productos alimentarios alterados, que posteriormente han mostrado poseer propiedades beneficiosas. Por ejemplo, en sidras y vinos, la alteración producida por algunas bacterias, denominada aceitado o ahilado, se debe a la producción de un (1,3)- β -D-glucano con sustituciones en posición O-2. Así, de sidra ahilada se han aislado cepas productoras, como por ejemplo *P. parvulus* 2.6 [47], con propiedades probióticas [150] y cuyo EPS purificado actúa como prebiótico [151] y como agente antiinflamatorio [152].

En productos cárnicos, las BAL forman parte de la microbiota propia de la materia prima y, puesto que son alimentos adecuados para su crecimiento (un elevado grado de humedad, pH casi neutro, glicógeno, péptidos y aminoácidos en abundancia, además de iones metálicos), cuando se limita el oxígeno como método de conservación, las BAL proliferan convirtiéndose en microorganismos alterantes. En productos cárnicos envasados al vacío las principales alteraciones de origen bacteriano son: olores y sabores a “agrio” y “ácido”, decoloraciones, formación de gas y de limos debidos a la producción de EPS. Las especies relacionadas con este tipo de alteraciones pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* [153] [154] [155]. Así, las cepas investigadas en este trabajo, *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides*

RTF10, pertenecen a una colección de BAL aisladas de productos cárnicos envasados al vacío y refrigerados, tras almacenamiento prolongado [156]. Estas cepas fueron seleccionadas al iniciarse este trabajo, por su capacidad para producir EPS utilizando como sustrato sacarosa. En ambas BAL dicha producción fue detectada mediante: i) el cultivo de las bacterias en medio sólido; ii) la detección directa de los EPS por microscopía electrónica y iii) el cultivo de las bacterias en medio líquido, lo que permitió su cuantificación utilizando el método del fenol-sulfúrico (apartado 1.3 del capítulo de resultados).

Tanto el EPS-LS, sintetizado por *Lb. sakei* MN1, como el EPS-LM, sintetizado por *Lc. mesenteroides* RTF10, confieren a las cepas productoras un fenotipo mucoso, que fue detectado en las colonias crecidas en medio sólido conteniendo sacarosa (Fig. 1R). Aunque en medio líquido estos EPS no confieren un fenotipo filamentoso ni viscoso, tras eliminar las células por sedimentación, si se observó turbidez en los sobrenadantes de los cultivos (resultados no mostrados).

La detección mediante microscopía electrónica de transmisión de bacterias productoras de EPS ha sido utilizada previamente por otros grupos de investigación [157] [158]. En dichos estudios se utilizaron cultivos crecidos en medio líquido, que previamente fueron sedimentados por centrifugación. Esta manipulación, en el caso de los EPS capsulares o íntimamente unidos a la superficie celular, no tiene efecto sobre las muestras pero en el caso del EPS-LS y del EPS-LM, la mayoría de las moléculas unidas a las bacterias eran eliminadas después de la centrifugación junto con el sobrenadante o durante la resuspensión de las células (resultados no mostrados). Por ello, en este trabajo se ha desarrollado un método de detección directa de los EPS a partir de las colonias bacterianas crecidas en medio sólido. De esta forma se consiguió minimizar la pérdida de EPS durante la manipulación de las muestras, permitiendo la detección y localización de los EPS asociados a la pared bacteriana o rodeando a las células (Fig. 2R). Creemos que este método de preparación de muestras para su posterior estudio mediante microscopía electrónica de transmisión, no había sido descrito en la literatura hasta ahora.

La cuantificación de los EPS presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos requiere para su recuperación una precipitación previa, generalmente con etanol. A continuación, se determina su concentración por el método del fenol-sulfúrico, consistente en la hidrólisis de los polímeros por el tratamiento con fenol y con ácido sulfúrico y la posterior detección espectrofotométrica de los monosacáridos neutros generados que lo constituyen [73]. Los medios complejos como el MRS, utilizado de forma rutinaria para el crecimiento de BAL, contienen extracto de levadura y los glucomanos, presentes en la pared de estos organismos, son polisacáridos y también precipitan con etanol. Por ello, para evitar las interferencias de algunos componentes de dichos medios complejos, en este trabajo se ha utilizado para el crecimiento bacteriano, el medio definido CDM con sacarosa como fuente de carbono. En este medio, los niveles de producción fueron aproximadamente de 2 g L^{-1} para el EPS-LS y de 1 g L^{-1} para el EPS-LM, en condiciones de crecimiento discontinuo, sin control de pH y con una concentración inicial de sacarosa de 23 mM. Además, esta elevada producción de los EPS por *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 podría mejorarse con una optimización de las condiciones de cultivo (en fermentadores, a pH controlado, y modificando factores como temperatura, nutrientes, tiempo de producción y concentración de sacarosa), ya que se ha comprobado para otras BAL que pueden alcanzarse niveles de producción superiores a 10 g L^{-1} [44]. Cabe destacar que, aunque los niveles de producción de los EPS dependen del tipo de polímero, de la BAL productora y las condiciones de cultivo, en general los valores muy elevados son característicos de α -glucanos, ya que la producción de otros HoPS como los β -glucanos y los HePS es mucho menor, en el rango de $100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$ y de $20\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente [77] [2] [152]. Cuando se utilizaba glucosa, en sustitución de sacarosa las bacterias no producían EPS, y además, no se requería la presencia de ningún otro monosacárido o disacárido en el medio de cultivo para la síntesis de los polímeros (Figs. 1R, 2R y resultados no mostrados). Estos resultados, junto a los niveles de producción obtenidos, parecían indicar que los EPS producidos por ambas cepas eran un tipo de HoPS [159], presumiblemente α -glucanos, y de hecho la caracterización fisicoquímica de los EPS purificados demostró que ambos eran dextranos (apartado 2 del capítulo de resultados).

Los dextranos son sintetizados por las BAL extracelularmente, en una reacción catalizada por las dextransacarasas, utilizando la sacarosa como sustrato y generando en cada reacción como producto de su hidrólisis: i) una molécula de fructosa, que puede ser utilizada como fuente de carbono por algunas bacterias [160] y ii) una molécula de glucosa, que puede ser utilizada para la elongación de las moléculas de dextrano o para la glicolisis. Por ese motivo, un análisis metabólico de los sobrenadantes (utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas), junto con la cuantificación de los niveles de dextrano (mediante el método del fenol-sulfúrico) era idóneo para analizar la interrelación entre el metabolismo primario de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 y la producción de sus EPS, lo que motivó su estudio en este trabajo (apartado 1.4 del capítulo de resultados).

El estudio metabólico mostró que ambas cepas a medida que consumían la sacarosa y sintetizaban el EPS, acumulaban la fructosa en el medio de cultivo (Fig. 4R). También ambas cepas, más eficientemente *Lc. mesenteroides* RTF10, comenzaron a metabolizar la fructosa al final de la fase exponencial coincidiendo con el agotamiento de la sacarosa (aproximadamente 8-9 h) y continuaron con la producción de ácido láctico (Fig. 4R). Este comportamiento de acumulación de fructosa y posterior consumo, tras agotarse la sacarosa, ha sido previamente descrito en otras cepas productoras de dextrano cultivadas en medio con sacarosa [161] [105] [162]. Además de las diferencias en el consumo de fructosa, ambas cepas presentaban distinto patrón de utilización de la glucosa generada por la hidrólisis de la sacarosa. Mientras que en los cultivos de *Lc. mesenteroides* RTF10, se detectaba la presencia de glucosa entre las 7-10 h, no pudo ser detectada en el medio de cultivo de *Lb. sakei* MN1 (Fig. 4R). Esta diferencia posiblemente está relacionada con los niveles de producción de EPS de cada cepa.

Respecto a la producción de los EPS por *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, en valores absolutos se correspondía con la dinámica de crecimiento observada para cada una de las cepas (Fig. 3R). La fase de crecimiento en la cual se alcanza el máximo de producción de EPS es una característica dependiente de cepa. Así, algunas cepas de *Leuconostoc* [161] y *Lactobacillus* [44] tienen una eficiencia máxima durante

la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, en el caso de *Lb. reuteri* 121 esta cepa alcanza su máximo de producción al final de la fase exponencial de crecimiento, mientras que *Lb. reuteri* 180 continua produciendo EPS durante la fase estacionaria de crecimiento [163]. Por este motivo, para determinar la eficiencia de síntesis de los EPS, en este trabajo se calculó la producción relativa a la biomasa presente en el cultivo (concentración de EPS/ A_{600nm}). Así, pudo comprobarse que *Lb. sakei* MN1 alcanzó su máxima eficiencia de producción durante la fase exponencial, mientras que *Lc. mesenteroides* RTF10 mantuvo sus niveles de producción constantes durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria (Fig. 1D).

La diferencia entre los patrones de producción de los EPS está influenciada por diversos factores entre los que se encuentran la capacidad de acidificación del medio de cultivo debida a la producción del ácido láctico por las BAL, y el pH óptimo de la actividad del enzima responsable de sintetizar el EPS [44]. El análisis del pH del medio extracelular (Fig. 3R) y de la producción de ácido láctico (Fig. 4R) reveló que *Lb. sakei* MN1 tenía mayor efecto acidificante que *Lc. mesenteroides* RTF10 (reducción del pH del medio de 7,0 a 4,2 *versus* 4,7 después de 13 h de incubación) así como mayor capacidad de producción de ácido láctico en valores absolutos (45,0 mM *versus* 25,5 mM). Además, el cálculo de la eficiencia de la síntesis del ácido láctico (concentración de ácido láctico/ A_{600nm}) reveló que para *Lb. sakei* MN1 permanecía prácticamente constante (4,7-9,0) durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, mientras que para *Lc. mesenteroides* RTF10 incrementaba progresivamente desde valores de 1,7 al inicio del crecimiento, hasta 7,4, después de 13 h de incubación (Fig. 1D).

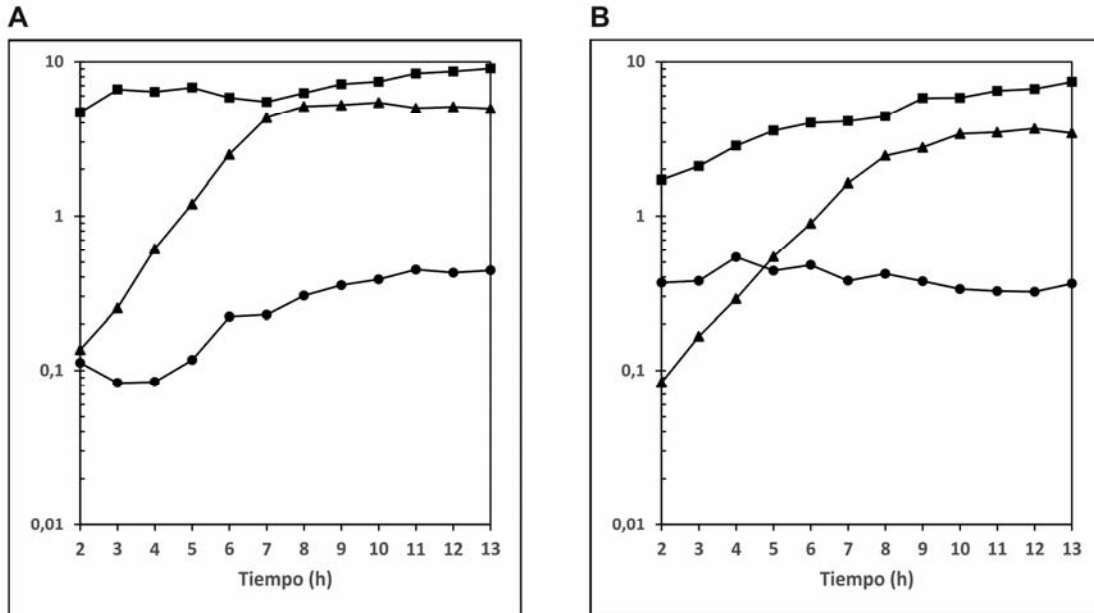


Figura 1D. Estudio de la producción de EPS por *Lb. sakei* MN1 (A) y por *Lc. mesenteroides* RTF10 (B). Análisis de la A_{600nm} (\blacktriangle), EPS/A_{600nm} (\bullet) y ácido láctico/ A_{600nm} (\blacksquare) durante el crecimiento a 30 °C en medio CDMS.

Finalmente, se estimó la eficiencia de las dextransacarasas para sintetizar *in vivo* el dextrano, expresando su concentración como moléculas de glucosa. En el caso de *Lb. sakei* MN1, después de 13 h de cultivo la producción fue de 12 mM y, ya que la concentración inicial de sacarosa en el medio fue de 23 mM, este resultado indicó que aparentemente el 52 % de la glucosa liberada por la hidrólisis de la sacarosa fue utilizada para la síntesis del dextrano. La falta de detección de glucosa en los sobrenadantes podría ser debido al uso de la sacarosa para la síntesis de dextrano y al transporte eficaz del azúcar sobrante al interior para ser utilizado en la glicólisis. En cuanto a *Lc. mesenteroides* RTF10, después de 13 h de cultivo la concentración del EPS-LM fue de 7 mM estimándose una eficiencia del 30 % para su dextransacarasa. La menor eficiencia respecto al enzima de *Lb. sakei* MN1 explicaría la detección de glucosa en los sobrenadantes de *Lc. mesenteroides* RTF10, alcanzando el nivel máximo (7 mM) a las 7 h de incubación. Aparentemente, esta glucosa sería transportada al citoplasma y mayoritariamente metabolizada mediante la glicólisis, ya que se observó un incremento en la producción del ácido láctico por esta bacteria y no del EPS-LM a lo largo de la incubación (Fig. 1D).

2. CARACTERIZACIÓN DEL EPS-LS Y DEL EPS-LM, AISLADOS Y PURIFICADOS

El medio y las condiciones de cultivo influyen la síntesis de los EPS y como consecuencia de ello, los niveles de producción, la masa molecular y la composición [74]. En general, el rendimiento de la síntesis de EPS es superior en medios más complejos que permiten alcanzar unos niveles de biomasa superiores. Sin embargo, el uso de dichos medios implica obtener EPS con un mayor nivel de contaminantes [40]. Por ello, en este trabajo se optimizó la producción de los EPS de ambas bacterias crecidas en el medio definido CDM, así como su recuperación, a partir de los sobrenadantes de los cultivos, por precipitación con etanol y sus posteriores purificaciones, mediante diálisis y fraccionamiento cromatográfico (apartado 2.1 del capítulo de resultados). Se obtuvieron preparaciones con una concentración final de $0,8 \text{ g L}^{-1}$ y de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ para el EPS-LM y el EPS-LS, respectivamente, con una recuperación de los polímeros producidos después de la purificación del 80 % y un grado de pureza del 99 % (Tabla 1R).

El EPS-LM y el EPS-LS fueron caracterizados como HoPS tipo dextrano, prácticamente lineales (apartado 2.2 del capítulo de resultados). Ambos constituidos primordialmente por moléculas de glucopiranosidos unidas por enlaces α -(1-6) y con tan sólo un 3 % (EPS-LS) y un 9 % (EPS-LM) de moléculas con sustituciones en posición O-3, enlaces α -(1-3) (Tabla 2R y Fig. 8R). Esta estructura es muy similar a la del dextrano comercial más utilizado a nivel industrial, el producido por *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F, el cual presenta un 95 % de enlaces α -(1-6) y un 5 % de ramificaciones con enlaces α -(1-3). En la figura 2D se muestran los espectros de infrarrojos de uno de los EPS caracterizados en este trabajo, el EPS-LS y del dextrano comercial T2000 obtenido por hidrólisis del EPS producido por *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F. Ambos espectros son muy similares y en ambos pueden observarse las bandas características de α -anómeros (916 cm^{-1} y 849 cm^{-1} para el EPS-LS y 913 cm^{-1} y 848 cm^{-1} para el dextrano T2000).

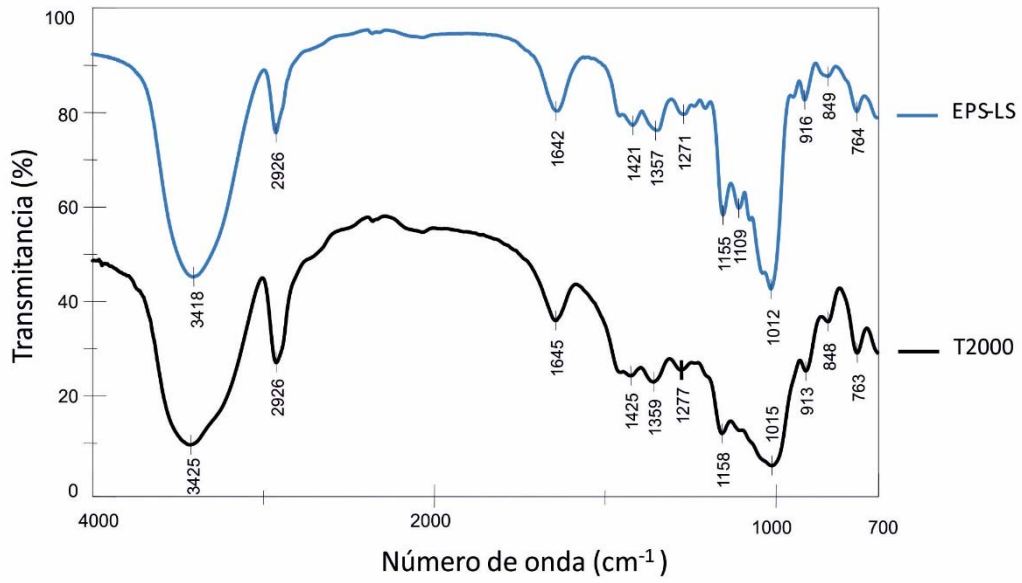


Figura 2D. Espectros de infrarrojos. Se muestran los espectros del EPS-LS y del dextrano comercial T2000.

Además, la comparación de los espectros NMR H^1 del dextrano de *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F comercializado y el de los dos EPS caracterizados en este trabajo (Fig. 3D) confirmó que todos ellos son estructuralmente similares.

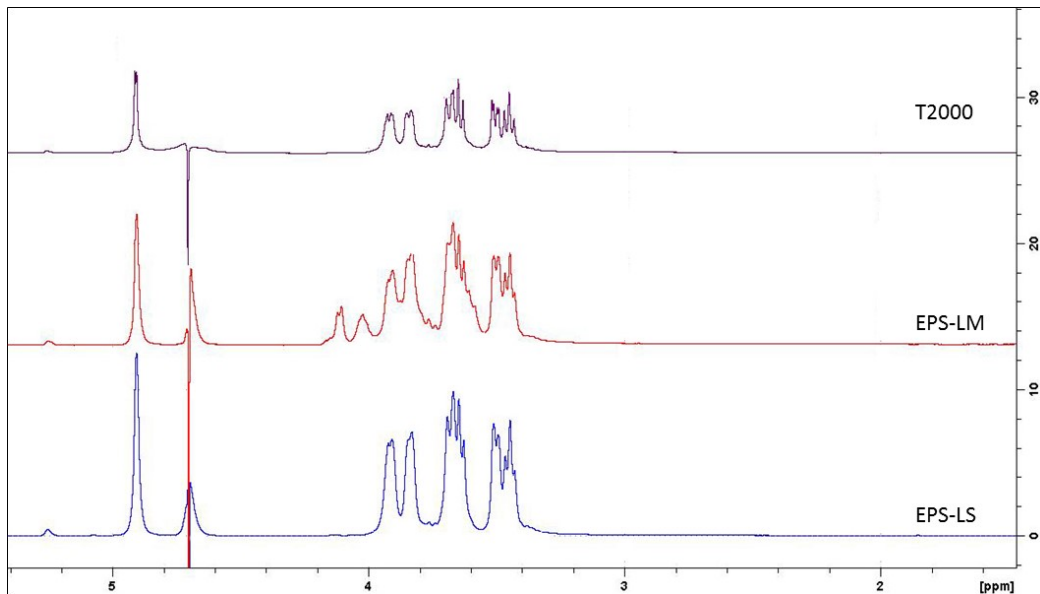


Figura 3D. Espectros de NMR unidimensionales. Se muestran los espectros del EPS-LS, del EPS-LM y del dextrano comercial T2000.

Los dextranos nativos son muy polidispersos, poseen una masa molecular muy elevada entre 10^6 y 10^9 Da y su fraccionamiento mediante hidrólisis ácida genera dextranos de tamaño conocido [164]. Existen varias técnicas para determinar la masa molecular, entre ellas la cromatografía de exclusión utilizada en este trabajo. No obstante, debido a las limitaciones de esta técnica y a la ausencia de estándares de dextranos de masa molecular superior a 2×10^6 Da, no se pudo determinar la masa promedio del EPS-LM y del EPS-LS. Lo que sí pudo confirmarse por estudios bidimensionales de RMN (2D-DOSY) es, que ambos EPS presentan una masa molecular superior a 2×10^6 Da (Fig. 9R). Estos resultados concuerdan con los descritos para otros dextranos caracterizados por el mismo tipo de técnicas, donde se ha determinado una masa también superior a 2×10^6 Da [165]. Además, la masa molecular del dextrano producido por *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F ha sido determinada y su valor promedio oscila entre 9×10^6 y 5×10^8 Da [75]. Así, estos antecedentes indican que la masa molecular promedio del EPS-LM y del EPS-LS puede ser muy elevada y para determinarla será necesario en un futuro utilizar otras técnicas como son la cromatografía hidrodinámica, el fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico [166] o el uso de un equipo de dispersión de luz multiángulo [167].

3. GENES *dsrLS* Y *dsrLM* Y EL PLÁSMIDO pMN1

En este trabajo, a partir de 14 secuencias depositadas en el banco de datos del NCBI, se diseñaron los oligonucleótidos *dsrR* y *dsrF*, localizados dentro de la región conservada que codifica el centro catalítico de las dextransacarasas. Estos oligonucleótidos no degenerados nos permitieron detectar los genes *dsr* de *Lb. sakei* MN1 y de *Lc. mesenteroides* RTF10 (Fig. 16R), de igual modo que los oligonucleótidos degenerados descritos por Kralj [168] y Tieking [169] han permitido la detección de genes que codifican glucansacarasas en BAL pertenecientes al género *Lactobacillus*.

Los genes de *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10 han sido localizados en dos plásmidos diferentes, presentes en sus genomas, denominados pMN1 y pRTF10 (Fig. 17R). Utilizando estándares de plásmidos monoméricos covalentemente cerrados, estimamos que su masa molecular era de aproximadamente 13,7 kpb para pMN1 y de 20,6 kpb para pRTF10. Además, también se ha determinado en este trabajo la

secuencia completa de nucleótidos del plásmido pMN1 (11.126 pb), portador del gen *dsrLS* de *Lb. sakei* MN1.

La localización plasmídica de los genes codificantes de proteínas responsables de la producción de EPS, han sido descritos con anterioridad [170]. Se ha determinado, mediante curado de plásmido, que los genes responsables de la producción de un HePS en *Lb. casei* CG11 se encuentran localizados en un plásmido de 30 kpb [171]. Del mismo modo se ha identificado y localizado, en un plásmido de aproximadamente 35 kpb, el gen *gtf* que codifica la glicosiltransferasa GTF de *P. parvulus* 2.6R. Por lo que respecta a la producción de dextrano, también se ha determinado, por curado de plásmido, que el gen responsable de su producción en dos cepas de *Lactobacillus* aisladas de productos cárnicos, se encuentra en un plásmido de 11 kpb [172], que podría ser idéntico o similar a pMN1. Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera vez que se ha secuenciado por completo el plásmido portador de un gen que codifica una dextransacarasa.

El plásmido pMN1 está compuesto de: i) un origen de replicación; ii) los genes *repA*, *repB* y *dsrLS* y iii) 7 marcos de lectura abierta (indicadas del 1 al 7 como ORF) (Fig. 20R). El análisis BLAST, de comparación de dichas secuencias frente a las depositadas en los bancos de datos del NCBI, permitió detectar que distintas regiones del plásmido presentaban una elevada homología con varias secuencias primordialmente plasmídicas. Teniendo en cuenta la secuencia de nucleótidos del replicón (Fig. 19R) formado por el origen de replicación y los genes *repA* y *repB*, que codifican respectivamente proteínas implicadas en la iniciación de la replicación y/o en la partición y control del número de copias, fue posible incluir a pMN1 dentro de una familia de plásmidos que replican por el mecanismo de tipo *theta* y cuyo prototipo es pUCL287 [147]. Respecto a las ORF, se observó casi una total identidad de sus productos proteicos con otras proteínas (Tabla 4R). En el caso de la *orf1* presente en pMN1, parece ser una secuencia truncada de un gen que inicialmente debía codificar una desoxirribonucleasa específica (proteína R), perteneciente a un sistema de restricción y modificación de tipo I. Además, las ORF 2, 3, 4, 5, 6 y 7 son homólogas a ORF del plásmido pRV500 (Fig. 4D y Tabla 4R) de *Lb. sakei* RV332, que también

pertenece a la familia de pUCL287 [148] y por tanto también existe homología entre los replicones de los dos plásmidos. La mayor diferencia entre pRV500 y pMN1 radica en que el primero porta los genes codificantes de un sistema de restricción y modificación tipo I en lugar del gen *dsrLS*.

La mayoría de los lactobacilos portan más de un plásmido y tanto pMN1 (este trabajo) como pRV500 [148] han sido detectados en estirpes de *Lb. sakei* aisladas de productos cárnicos, aunque en distintos países. Así, dichos plásmidos, parecen proceder de un plásmido parental compuesto de un replicón y de las ORF 2-7 (Fig. 4D), que posteriormente mediante procesos de transposición incorporaron módulos que permiten la síntesis del dextrano o de un sistema de restricción y modificación. Posiblemente, la adquisición de uno u otro módulo y su fijación se deben a la ventaja selectiva que supone para sus hospedadores frente al estrés ambiental o a la infección por bacteriófagos.

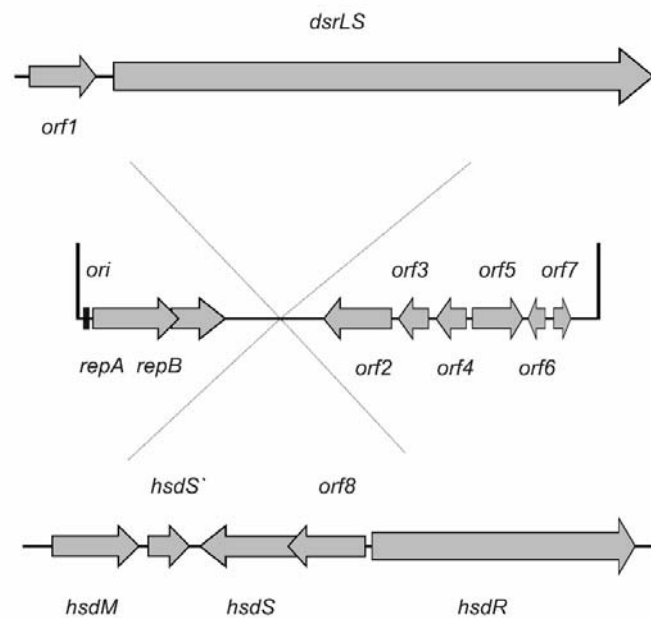


Figura 4D. Mapa parental de pMN1 y de pRV500. En la parte superior se muestran el gen *dsrLS* y la *orf1* (extremo 5' de un gen *hsdR* putativo, no homólogo a su homónimo en pRV500) sólo presentes en pMN1. En la parte inferior se muestran los genes que codifican un sistema de restricción modificación únicamente presente en pRV500. En la parte central se muestran los genes y el origen de replicación presentes en pMN1 y pRV500 y que se hipotetiza que estarían presentes en un plásmido parental, a partir del cual habrían sido generados durante la evolución ambos plásmidos.

4. LA PROTEÍNA DsrLS

Respecto al producto génico de *dsrLS* (DsrLS) la secuencia deducida reveló que es una proteína compuesta por 1.767 aminoácidos que posee una masa molecular de 190.039 Da y, por homología con otras proteínas presentes en la base de datos, que se trata de una glucansacarasa. Este tipo de enzimas, como la DsrLS, son proteínas con una masa molecular promedio de 160.000 Da, que presentan cuatro dominios basándose en su secuencia de aminoácidos (apartado 2.1 del capítulo de introducción): i) un péptido señal; ii) una región variable; iii) un dominio catalítico y iii) un dominio C-terminal, donde se ha postulado que se encuentran los dominios de unión al glucano.

Hasta la fecha no se ha conseguido determinar experimentalmente la estructura 3D completa de ninguna glucansacarasa. Sólo se han obtenido, por estudios de cristalización y análisis por difracción de rayos X, las estructuras parciales de: i) la proteína DSR-E-ΔN de *Lc. mesenteroides* NRRL B-1299 (PDB: 3TTQ); ii) la GTF-SI de *S. mutans* (PDB: 3AIE); iii) la GTFA-ΔN de *Lb. reuteri* 121 (PDB: 4AMC) y iv) la GTF180-ΔN de *Lb. reuteri* 180 (PDB: 3KLL, 4AYG, 3HZ3). A partir de dichas estructuras cristalinas resueltas, se ha determinado que existen 5 dominios estructurales denominados A, B, C, IV y V [166]. La nomenclatura de dichos dominios ha sido establecida en base a su alineamiento estructural con los dominios A, B y C de la familia GH13 (α -amilasas). Los otros dos dominios (IV y V) no presentan similitudes estructurales con dominios de la familia de las GH13, por lo que se utiliza para ellos una nomenclatura diferente [173]. Estos dominios no se encuentran de forma consecutiva en la cadena polipeptídica, sino que se disponen en forma de "U" siguiendo el patrón V, IV, B, A, C, A, B, IV y V (Fig. 5D).

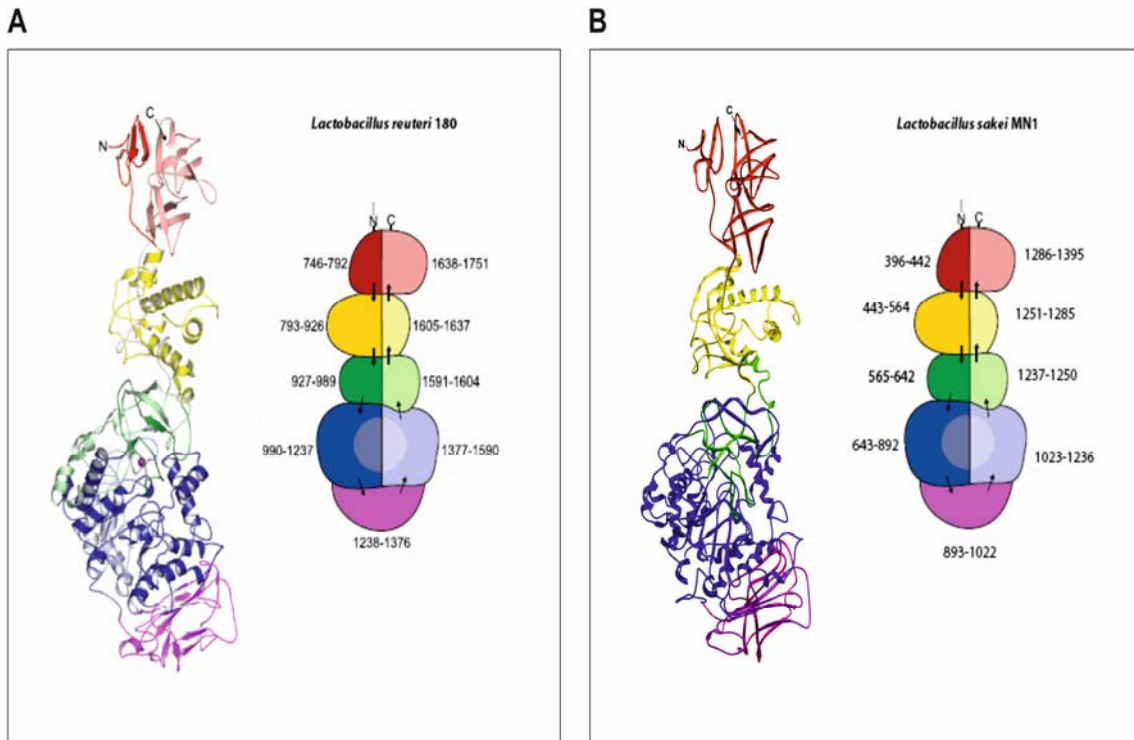


Figura 5D. Estructura 3D de la glucansacarasa GTF180-ΔN de *Lb. reuteri* 180 (A) y modelado de la estructura de DsrLS de *Lb. sakei* MN1 (B). Se muestran en ambos casos los 5 dominios estructurales (A en azul, B en verde, C en morado, IV en amarillo y V en rojo), así como las posiciones aminoacídicas de cada uno de ellos. En el caso de *Lb. reuteri* ha sido obtenida a partir de los datos de difracción de rayos X del cristal. En el caso de *Lb. sakei* se ha generado del modelo obtenido a partir de la estructura de GTF180-ΔN con el programa I-TASSER [128]

La secuencia de aminoácidos de la proteína DsrLS (desde el 396 al 1395) muestra una identidad del 48,18 % con los residuos de la proteína GTF180-ΔN de *Lb. reuteri* 180 (PDB 3HZ3) (Fig. 5D y anexo II.III). Basado en esta homología ha sido posible establecer un modelo de la estructura 3D de DsrLS, con excepción de sus regiones N y C-terminal, el cual predice la existencia de los mismos dominios existentes en su homónima de *Lb. reuteri* 180 (Fig. 5D y 6D).

El dominio A comprende un barril (β/α)₈ y contiene el sitio catalítico del enzima. El análisis del alineamiento estructural del modelo de DsrLS sugiere que los aminoácidos que configuran el centro catalítico del enzima constituyen una tríada compuesta por dos residuos aspartatos (D678 y D789) y un residuo glutamato (E716) (Fig. 7D).

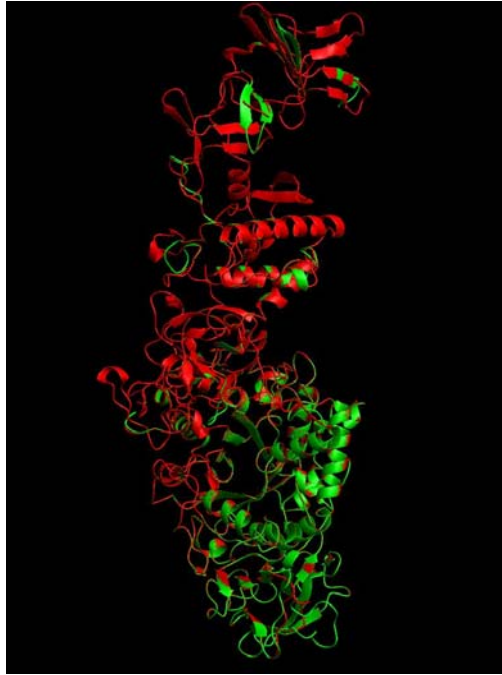


Figura 6D. Superposición del modelo estructural de DsrLS (en rojo) y de la estructura cristalina de GTF180-ΔN (en verde). Superposición realizada con el programa CE [129] ejecutado en el servidor <http://source.rcsb.org>.

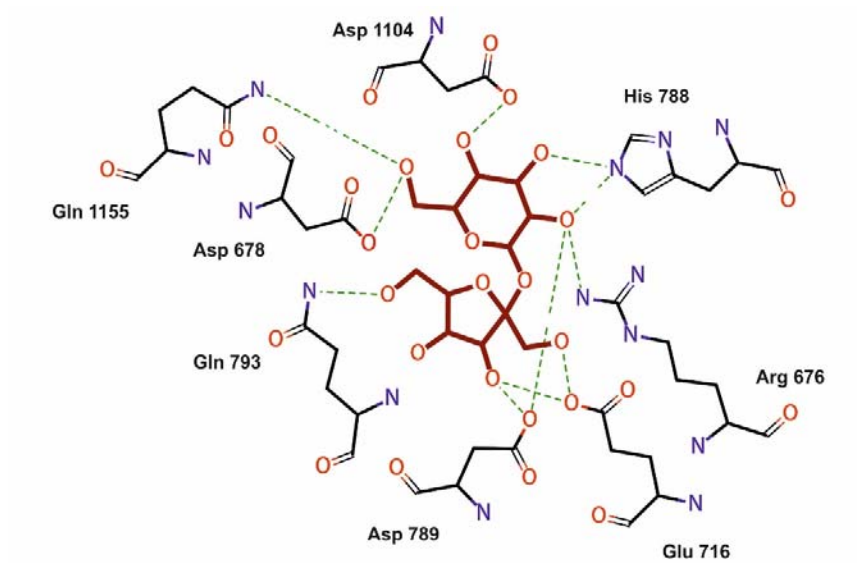


Figura 7D. Modelo de interacción de los aminoácidos del centro catalítico de DsrLS con el sustrato sacarosa (en granate). Obtenido por la superposición del modelo 3D de la proteína DsrLS sobre el cocrystal de la proteína GTF180-ΔN y su sustrato sacarosa.

Se ha demostrado que la presencia de calcio es esencial para la actividad de la GTFA-ΔN de *Lb. reuteri* 121 [174] y la GTF180-ΔN de *Lb. reuteri* 180 [173]. El dominio B, situado adyacente al dominio catalítico, parece ser esencial para la función de las glucansacarosas por dos motivos: i) residuos del dominio A y B forman el sitio de unión

a calcio y ii) algunos bucles del dominio B contribuyen a dar forma al dominio A. Por lo que respecta al dominio C, aunque esta conservado en las glucansacarosas, todavía no tiene adscrita una función. El dominio IV conecta los dominios B y V y se ha estipulado que podría actuar a modo de “bisagra” para acercar el dominio V al centro catalítico [175]. El dominio V está formado por las regiones N- y C-terminal, que presentan una serie de módulos estructurales que contienen dos o tres “ $\beta 2/\beta 3$ unidades” de aproximadamente 20 residuos. Así pues, en las glucansacarosas existen repeticiones en tándem A-/C- o bien repeticiones YG que forman bloques, en sus dos extremos terminales, formando el dominio V. En el caso de *Lb. sakei* MN1, la dextranasa no presenta repeticiones de tipo A-/C-, pero si YG en ambos extremos. Las diferencias entre las glucansacarosas están determinadas por el número de bloques, así como por la forma en que estos estén conectados y empaquetados debido a su secuencia.

En las especies de *Lactobacillus*, el extremo N-terminal presenta entre 200 y 700 residuos y, mutaciones o deleciones en dicha región, pueden alterar su función. Así, en el caso de GTFA, afectan a la relación entre la actividad hidrolítica y la actividad transglucosidasa [174]. Por lo que respecta al extremo C-terminal, está compuesto por aproximadamente 300 residuos y se le han atribuido implicaciones en diferentes funciones: i) en la polimerización o estructura del glucano; ii) en la transferencia de productos al centro catalítico y iii) en la localización de la proteína en la superficie celular. En el caso de la GTFA su deleción disminuye la afinidad por la sacarosa [174]. Sin embargo, el papel concreto de esta región C-terminal todavía se desconoce [176]. Las repeticiones de la región C-terminal de las glucansacarosas presentan homología con los motivos de unión a la pared celular presentes en las proteínas de unión de colina, toxinas y otras proteínas de superficie localizadas en varias bacterias [166]. La proteína DsrLS presenta 307 aminoácidos en su región C-terminal que están presentes en menor medida en la proteína GTF124 y Kg15, pero no se encuentran en la proteína de *Lb. reuteri* 180 (anexo II.II). Ha sido posible modelar el plegamiento general del fragmento C-terminal de DsrLS (Fig. 8D), identificado por métodos de “threading”, a partir de la estructura 3D de uno de los monómeros (cadena A) de la proteína homodimérica PcsB de *S. pneumoniae* [177] (PBD 4CGK y Fig. 8D, B). PcsB es una proteína esencial de superficie (residuos 1-40, péptido líder), que está implicada en la

separación de las células hijas y que posee actividad muralítica [177]. Cada cadena monomérica de PcsB contiene tres regiones características: i) un dominio “coiled-coil” (CC, residuos 41-266); ii) una región conectora (residuos 267-278) y iii) un dominio CHAP (residuos 279-392), que contiene el centro catalítico del enzima. La homología estructural de DsrLS con PcsB incluye los residuos 1422-1767 de la dextranasa y los residuos 42-355 del enzima de *S. pneumoniae*. En consecuencia, DsrLS posee un dominio CC, una región conectora y un dominio CHAP incompleto y presumiblemente sin actividad catalítica. En el caso de PcsB el dominio CC está compuesto de cinco α -hélices (Fig. 8D, B): i) tres largas hélices curvadas con un número elevado de residuos ($\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$), las dos primeras antiparalelas y la tercera con la misma polaridad que la primera, y ii) dos hélices cortas ($\alpha 2$ y $\alpha 5$). En el caso de DsrLS (Fig. 8D) existe, además de estas 5 α -hélices, otra hélice extra localizada en el extremo N-terminal del fragmento (denominada $\alpha 1^*$) con polaridad contraria a la hélice $\alpha 1$. Los dominios CC contienen secuencias repetidas que conllevan a un plegamiento, con una estructura secundaria de tipo α -hélices incluyendo residuos hidrofóbicos los cuales contribuyen a la interacción entre cadenas.

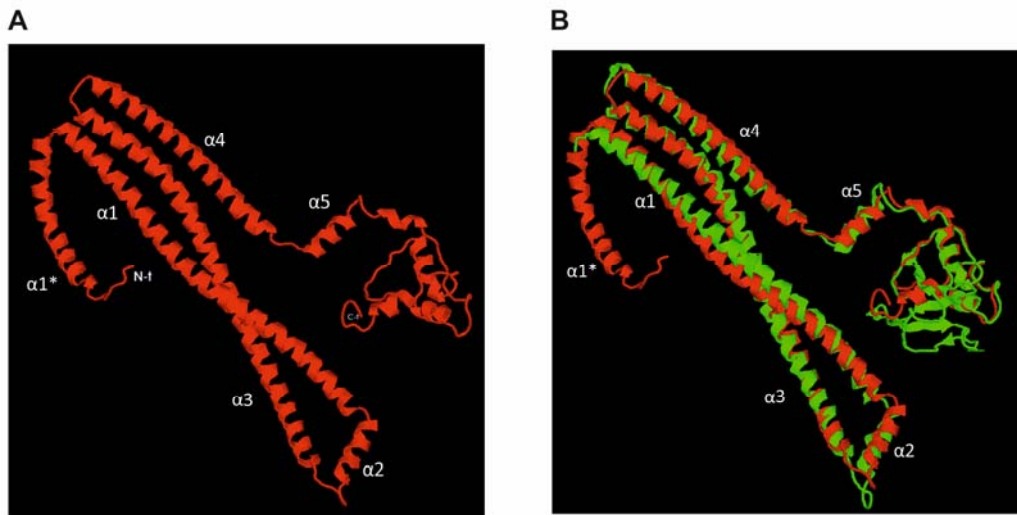


Figura 8D. Predicción del plegamiento general de la región C-terminal de DsrLS basado en la estructura de PcsB. Se muestra: (A) el modelo para el esqueleto polipeptídico de DsrLS obtenido por “threading” y mejor clasificado por el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) y (B) el alineamiento estructural del modelo de DsrLS (en rojo) y de la estructura cristalina PcsB (en verde) realizado con el algoritmo TM-align a partir del modelo.

En el caso de PcsB, el dominio CC posee residuos de leucina en las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$, lo que se conoce como “cremalleras de leucinas”, mientras que en el caso de DsrLS este dominio contiene, en las mismas α -hélices que PcsB, residuos alanina, específicamente una en la hélice $\alpha 2$ y tres en la hélice $\alpha 4$ (Fig. 9D) y por tanto son “cremalleras de alaninas”. Ambas estructuras comparten funcionalidad y en muchos casos están implicadas en los procesos de generación de homodímeros. En consecuencia, es factible que la proteína DsrLS activa, al igual que PcsB, posea una estructura homodimérica.

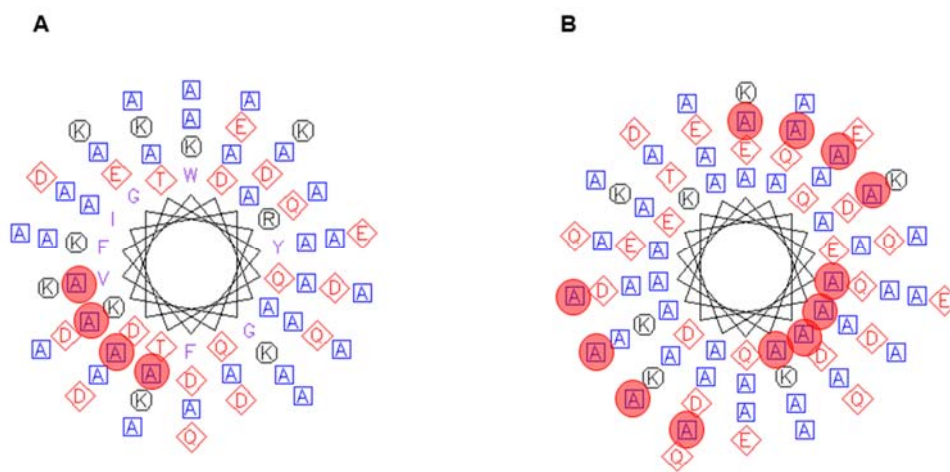


Figura 9D. Proyecciones axiales de las α -hélices: $\alpha 2$ (A) y $\alpha 4$ (B) de DsrLS. Los diagramas “helical Wheel” se obtuvieron utilizando el programa PEPWHEEL del paquete de análisis EMBOSS [130]. Se muestran en rojo resaltado las alaninas que podrían constituir “cremalleras de alaninas”.

5. EXPRESIÓN DEL GEN *dsrLS*

A pesar de la importancia de los dextranos y de las dextran-sacarosas para la síntesis de los mismos, poco se conoce de la regulación de la expresión de dichas enzimas. Hasta la fecha, se ha determinado que su síntesis es constitutiva en cepas del género *Streptococcus* [178] [179], mientras que es inducible por sacarosa en cepas del género *Leuconostoc* [180] [103], aunque se desconocen los mecanismos moleculares de dicha inducción. En *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F se ha demostrado que dicha proteína se expresa en bajos niveles en presencia de fuentes de carbono, que no son la sacarosa [181]. En el género *Weissella*, la expresión de las dextran-sacarosas estudiadas hasta la fecha indica que es constitutiva [182]. Los datos de regulación y expresión de

glucansacarosas en el género *Lactobacillus* también apuntan a una expresión constitutiva de los mismos. Este es el caso de *Lb. reuteri* TMW 1.106 [183] productor de un glucano y *Lb. reuteri* 121 productor de reuterano [56] en los que se ha determinado que la síntesis de los mismos es constitutiva. En el caso de *Lb. reuteri* 180 y *Lb. parabuchneri* 33, Kralj y cols. [56] describieron que estas bacterias son productoras de dextrano y manifestaron, como resultados no publicados, que la síntesis de las proteínas es constitutiva. En este trabajo se ha determinado, mediante reacciones de RT-PCR, que la expresión del gen *dsrLS* de *Lb. sakei* MN1 no se ve incrementada cuando la sacarosa, sustrato para la síntesis del dextrano, está presente en el medio de cultivo, no siendo por tanto este azúcar un agente inductor de la expresión de *dsrLS*. Además, los resultados obtenidos revelaron que *dsrLS* se cotranscribe con genes localizados corriente arriba de él (Fig. 21R).

Para estudiar la expresión génica *in vivo* en *Lb. sakei* MN1, se utilizaron vectores plasmídicos desarrollados en el laboratorio de la Dra. Paloma López [118] [119], que permiten en lactobacilos la detección de las bacterias (pRCR12) y de la expresión génica (pRCR) en tiempo real debido a la valoración de la actividad de la proteína fluorescente mCherry. La transferencia del plásmido pRCR12 a *Lb. sakei* MN1 permitió comprobar que el gen *mrfp*, que codifica la proteína mCherry, es funcional en *Lb. sakei* y que su presencia permite la detección fluorescente de esta bacteria. Además, la clonación de regiones localizadas corriente arriba del gen *dsrLS*, en el vector de expresión pRCR fusionadas al gen *mrfp* (Fig. 22R), ha permitido detectar la existencia de dos regiones promotoras (P1 y P2) y apoya la existencia de un transcrito monocistrónico conteniendo *dsrLS* y un transcrito policistrónico conteniendo *repA*, *repB* y *dsrLS*. Creemos que este es el primer caso descrito de cotranscripción de genes implicados en la replicación plasmídica y un gen que codifica una proteína implicada en la síntesis de EPS. Sin embargo, no es el primer caso detectado de cotranscripción de genes de replicación junto a otros genes, ya que también se ha observado para *dysl*, un gen que codifica para la proteína Dysl de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* [184]. Por otro lado, la detección por microscopía óptica de fluorescencia (Fig. 23R) y la cuantificación por espectrometría de fluorescencia (Tabla 5R) en cultivos portadores de las fusiones P1-*mrfp* y P2-*mrfp*, confirmaron que la sacarosa presente en el medio

de cultivo no era un agente inductor de la expresión del gen *dsrLS*. Además, en ambas bacterias recombinantes los niveles de fluorescencia en cultivos crecidos en presencia de glucosa fueron el doble que en aquellos crecidos en medio conteniendo sacarosa, tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento. Estos resultados fueron sorprendentes y podrían ser debidos a que la presencia del dextrano, sólo sintetizado en los cultivos crecidos en el medio MRSS, provocara un efecto de apantallamiento de la fluorescencia de la proteína mCherry. Sin embargo, tanto para la cuantificación como para el estudio por microscopia de fluorescencia, las células se lavaron repetidas veces y el dextrano se eliminó. Además, la diferencia de los niveles de fluorescencia no fue detectada en las células portadoras del plásmido pRCR12, que contiene la fusión transcripcional P_x -*mrfp*. Por ello, una hipótesis alternativa es que la elevada síntesis de dextrano (2 g L^{-1} en medio mínimo), aunque no parece afectar el crecimiento bacteriano, podría ser finalmente una carga energética para la bacteria y el propio dextrano induciría la activación de un mecanismo inhibitorio de su propia síntesis a nivel transcripcional. Otra hipótesis, más factible, es que la fructosa sintetizada como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa, y que penetra en la célula, sea el efector de la inhibición. Sin embargo, será necesario realizar en un futuro más estudios para poder llegar a elucidar la causa real del efecto detectado.

El factor sigma vegetativo de las RNA polimerasas bacterianas se une a secuencias denominadas promotoras presentes en el DNA, específicamente a las regiones -35 (TTTGACA) y -10 (TATAAT) y el análisis de las regiones promotoras clonadas en los plásmidos pRCR13 (P1) y pRCR15 (P2) reveló dos posibles secuencias -10 (anexo I.III). Corriente arriba del gen *repA* existe una secuencia TATtAT que tan sólo se desviaba en un nucleótido de la secuencia -10 consenso. También, corriente arriba del gen *dsrLS* existe la secuencia TGTTATtAT, que tan sólo se desvía en un nucleótido de la secuencia consenso TGNTATAAT de la región -10 extendida característica de promotores de bacterias Gram positivas. Además, en ninguno de los dos casos se detectó una región -35 indicando que los promotores serían débiles, aunque fue posible detectar la expresión a partir de ellos utilizando como método de detección la proteína mCherry.

6. BIOACTIVIDAD DE LOS DEXTRANOS Y DE *Lb. sakei* MN1

La obtención de los EPS con un alto grado de pureza, nos ha permitido estudiar su potencial actividad biológica y atribuirles el efecto observado de una forma directa e inequívoca.

Los experimentos realizados *in vitro*, con el EPS-LS y el EPS-LM (Figs. 11R–13R), e *in vivo* con el EPS-LS (Fig. 14R), han demostrado actividad antiviral de los dextranos frente a dos virus de salmónidos: el VNHI y el VNPI. Además, la evaluación conjunta con dextranos comerciales de diversas masas moleculares, en experimentos realizados *in vitro* utilizando líneas celulares, han revelado que sólo las preparaciones de dextranos de elevada masa molecular, no comercializadas en la actualidad, tienen potencial como agentes antivirales eficientes (Tabla 3R).

Rodríguez Saint-Jean y cols. [185] comprobaron que ciertas fracciones de hidrolizados de caseína también tienen un efecto inhibitorio frente al virus VNHI, con un índice de selectividad de 30-32, mientras que para el virus VNPI era de 3. En este trabajo de tesis doctoral se comprobó que el índice de selectividad para el EPS-LS y el EPS-LM fue superior a 5 para VNPI y de 10 (EPS-LS) y 6 (EPS-LM) para VNHI. En el caso de los hidrolizados de caseína, Rodríguez Saint-Jean y cols. [185] sugirieron que el posible mecanismo de acción de los péptidos podría deberse a su unión a la superficie de las células de tal forma que bloquearan los receptores de los virus y, por tanto, la fusión de membranas. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que el efecto inhibitorio de los EPS se produce en etapas posteriores del ciclo de infección. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que el tratamiento con los dextranos, simultáneamente o 60 minutos después de la infección, es más efectivo que si se suministran 30 minutos antes del tratamiento con el virus (Fig. 13R).

Además del papel del EPS-LS como antiviral, en este trabajo se ha comprobado con experimentos *in vivo* que este dextrano es un inmunoestimulador de truchas arcoíris, ya que el tratamiento con el mismo aumentó de forma significativa los niveles de expresión del IFN-1 (inmunidad innata) e IFN- γ (inmunidad adquirida). En

vertebrados, los interferones son secretados por las células hospedadoras (macrófagos, linfocitos, células “natural killer” y fibroblastos) en respuesta a intermediarios de RNA de doble cadena, como son los virus VNHI y VNPI [186]. Los fibroblastos y leucocitos producen IFN de tipo I en respuesta a infecciones virales, mientras que las células “natural killer” y linfocitos T producen IFN de tipo II (como el IFN- γ) en respuesta a IL-12, IL-8, mitógenos o antígenos [187]. El incremento de IFN- γ conlleva a una activación de los macrófagos para actuar contra todo tipo de patógenos (bacterias, protozoos y virus). El mecanismo de acción de los dextranos es desconocido pero los resultados obtenidos muestran que el dextrano de *Lb. sakei* MN1 puede actuar como inmunoestimulante tanto de la respuesta innata como de la adquirida. De hecho, en el presente estudio se ha evidenciado que las truchas tratadas con EPS-LS presentaron menor mortalidad que las truchas no tratadas e infectadas con ambos virus (VNHI y VNPI) (Fig. 14R) y, además, el tratamiento con este dextrano provocó un incremento notable de la expresión de IFN-1 e IFN- γ (Fig. 15R).

En conjunto los resultados obtenidos indican que el EPS-LS tiene potencial biotecnológico en el campo de la acuicultura, como componente de piensos funcionales para salmónidos. Por ello, la cepa productora *Lb. sakei* MN1 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número 8329 y tanto la bacteria como la metodología de producción del EPS-LS han sido protegidas por aplicación de patente PCT [188] con el fin de proteger la posible transferencia al sector industrial.

Además del interés del EPS-LS producido por *Lb. sakei* MN1, los estudios realizados en AZTI-Tecnalia y descritos en este trabajo, han mostrado *in vivo* la capacidad de la cepa productora para colonizar el intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra y para competir con un patógeno bacteriano como es *V. anguillarum*. Estos experimentos se realizaron con *Lb. sakei* MN1, porque a diferencia de *Lc. mesenteroides* RTF10, presentó alta capacidad de agregación (Figs. 24R y 25R) y de formación de biopelícula *in vitro* (Fig. 26R). Para ello se utilizó la cepa *Lb. sakei* MN1[pRCR12], que presenta las mismas características que *Lb. sakei* MN1 (Figs. 27R, 28R y 29R) y que está fluorescentemente marcada con la proteína mCherry. Los

resultados obtenidos demostraron que la colonización de *Lb. sakei* MN1 es superior en presencia de glucosa que en presencia de sacarosa (Fig. 31R), correlacionándose con la mayor capacidad de la bacteria *in vitro* para agregarse (Fig. 25R) y formar biopelícula (Fig. 26R). Así, parece que la presencia de dextrano disminuye la capacidad de adhesión de *Lb. sakei* MN1 y este no es un efecto generalizado de los EPS de BAL.

Los EPS bacterianos parecen estar implicados en la formación de biopelículas, favoreciendo la adhesión a superficies abióticas y bióticas o causando la agregación de las células [189]. Este es el caso de los (1-3)- β -D-glucanos con ramificaciones en posición O-2 producidos por BAL aisladas de sidra, para los cuales se ha demostrado que su presencia incrementa la capacidad de adhesión de las bacterias productoras [150] [51]. Sin embargo, también se ha demostrado que otros HoPS y HePS pueden tener el efecto contrario, como es el caso de *Lactobacillus johnsonii* FI9785, bacteria para la cual la reducción en la producción de su HePS provoca un incremento de su capacidad para agregarse, formar biopelículas y adherirse a células del epitelio [190]. Así mismo, para *Lb. rhamnosus* GG, una bacteria probiótica que produce EPS rico en galactosa, se ha comprobado, mediante la obtención de mutantes no productores y la comparación con la estirpe silvestre, que la presencia del biopolímero en su superficie disminuye su capacidad de adhesión [191]. Posiblemente en estos casos, la presencia del EPS dificulte el acceso a otras moléculas de superficie, por ejemplo adhesinas, o tenga un efecto sobre la hidrofobicidad de la superficie bacteriana que afecte a la capacidad de agregación [192] [193]. En el caso de los dextranos producidos por BAL, la primera hipótesis es más plausible ya que en este trabajo se ha comprobado que el dextrano EPS-LM producido por *Lc. mesenteroides* RTF10, que es casi idéntico al EPS-LS de *Lb. sakei* MN1, no afecta a la capacidad tanto de agregación (Fig. 25R) como de formación de biopelícula (Fig. 26R) de la bacteria productora.

Por otro lado, los resultados obtenidos para *Lb. sakei* MN1 en el sistema modelo gnotobiótico de larvas de pez cebra apuntan a un efecto protector en el intestino de las mismas ante una infección con *V. anguillarum* NB10 (Fig. 31R). Esta protección puede ser debida a un efecto directo de *Lb. sakei* MN1 inhibiendo la colonización (por competición) o del crecimiento (por productos sintetizados, por ejemplo: ácido láctico

o bacteriocinas) de *V. anguillarum* NB10 o a que el pretratamiento con *Lb. sakei* MN1 reduzca indirectamente la infección de *V. anguillarum* NB10, debido a un mecanismo de inmunomodulación. Con los resultados obtenidos hasta el momento no es posible discernir cual es la hipótesis correcta y en un futuro será necesario, para dilucidar el mecanismo de acción de *Lb. sakei* MN1, realizar experimentos complementarios como por ejemplo, investigar la influencia del tratamiento con *Lb. sakei* MN1 sobre la expresión de una batería de genes del pez cebra [142].

Independientemente de los mecanismos de acción del EPS-LS, como antiviral e inmunomodulador, y de *Lb. sakei* MN1, como inhibidor de la infección por bacterias patógenas, cabe resaltar que dicha bacteria presenta potencial como microorganismo probiótico y su EPS como inmunomodulador y antiviral. Así, los resultados de este trabajo de tesis doctoral sientan las bases para el desarrollo futuro de piensos funcionales conteniendo el EPS-LS y/o su bacteria productora para la alimentación de peces en piscifactorías.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Las bacterias lácticas *Lb. sakei* MN1 y *Lc. mesenteroides* RTF10, aisladas de productos cárnicos, en presencia de sacarosa como fuente de carbono producen homopolisacáridos tipo dextrano que han sido denominados EPS-LS y EPS-LM, respectivamente. Su análisis fisicoquímico ha demostrado que ambos son polímeros primordialmente lineales con enlaces α -(1-6) en su cadena principal y muestran un 3 % (EPS-LS) o un 9 % (EPS-LM) de ramificaciones con enlaces α -(1-3).
2. Los niveles de producción de EPS-LS y EPS-LM (tras 8 h de crecimiento discontinuo, sin control de pH y con una concentración inicial de sacarosa de 23 mM) fueron de aproximadamente 2 g L⁻¹ y 1 g L⁻¹, respectivamente. Ambas bacterias productoras de dextrano consumieron la sacarosa en su totalidad, pero presentaron diferencias metabólicas en el perfil de producción/consumo de fructosa, glucosa y ácido láctico, lo que pone de manifiesto las diferentes vías metabólicas utilizadas por ellas.
3. Los genes *dsr*, que codifican las dextransacarasas responsables de la producción de EPS-LS y EPS-LM han sido localizados, mediante hibridación de Southern, en plásmidos con una masa molecular de aproximadamente 13,7 kpb y 20,6 kpb, y han sido denominados pMN1 y pRTF10, respectivamente.
4. El análisis bioinformático del plásmido pMN1, portador del gen *dsrLS* de *Lb. sakei* MN1, en base a la secuencia completa de nucleótidos (11.126 pb) determinada en este trabajo, ha revelado que: i) pertenece a una familia de plásmidos que replican por el mecanismo de tipo *theta* y cuyo prototipo es pUCL287 y ii) contiene un origen de replicación, los genes *repA*, *repB* y *dsrLS*, así como 7 pautas de lectura abierta.

5. En cuanto a la transcripción del gen *dsrLS*, su análisis *in vitro* mediante RT-qPCR, e *in vivo* mediante fusiones transcripcionales, indican que: i) la presencia de sacarosa en el medio de cultivo no incrementa el nivel de expresión de *dsrLS*, no siendo por tanto este azúcar el agente inductor de la expresión; ii) muestran que tiene lugar una cotranscripción de *dsrLS* con los genes que le preceden *repA* y *repB* y iii) revelan que además de una región promotora corriente arriba de *repA*, existe una región promotora corriente arriba del gen *dsrLS*. En consecuencia, la proteína DsrLS parece sintetizarse a partir de un transcrito monocistrónico y otro policistrónico implicado en la replicación del plásmido, siendo este el primer ejemplo de expresión sincronizada de una dextranasa (producto del gen *dsrLS*) y de la maquinaria replicativa (RepA y RepB) de un plásmido.

6. La dextranasa DsrLS, constituida por 1.767 aminoácidos con una masa molecular de 190.039 Da, presenta un péptido líder en su extremo N-terminal, lo que indica que es una proteína extracelular. A partir de la homología a nivel de aminoácidos (48,18 %) con la proteína GTF180-ΔN de *Lb. reuteri* 180 (PDB 3HZ3) se ha establecido un modelo de la estructura 3D de DsrLS, con excepción de sus regiones terminales, que apoya: i) su capacidad para sintetizar dextrano; ii) indica la existencia de 5 dominios estructurales (A, B, C, IV y V) implicados en su actividad y iii) revela los aminoácidos potencialmente implicados en su interacción con la sacarosa, sustrato de la reacción que cataliza. Además, el modelado del plegamiento general del fragmento C-terminal de DsrLS, realizado a partir de la estructura 3D de uno de los monómeros (cadena A) de la proteína de superficie homodimérica PcsB de *S. pneumoniae*, indica la existencia de un dominio “coiled-coil”, compuesto por 5 α-hélices, que podría estar implicado en la dimerización de DsrLS.

7. Se han establecido las condiciones óptimas de producción de ambos dextranos, EPS-LS y EPS-LM, en medio definido CDM, así como su recuperación a partir de los sobrenadantes de los cultivos, por precipitación con etanol, y sus posteriores purificaciones mediante diálisis y fraccionamiento cromatográfico. Con este procedimiento se ha conseguido recuperar el 80 % de los dextranos producidos con un grado de pureza del 99 %, indispensable para evaluar su actividad biológica.
8. En cuanto a la actividad biológica, tanto el EPS-LS como el EPS-LM han mostrado actividad antiviral *in vitro* protegiendo líneas celulares de salmónidos frente a la infección por el VNHI y el VNPI. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan que dicha actividad está relacionada con el elevado tamaño molecular de estos dextranos. Además, se ha observado que el tratamiento de truchas arcoíris con el EPS-LS *in vivo* presenta también actividad antiviral y provoca un incremento de los niveles de expresión de los interferones IFN-1 e IFN- γ , evidenciando su efecto estimulante de la respuesta inmune y adquirida en este salmónido.
9. Se ha puesto de manifiesto que *Lb. sakei* MN1 y no *Lc. mesenteroides* RTF10 tiene la capacidad de agregarse y formar biopelículas cuando crece en presencia de glucosa y no produce EPS-LM, pero no en presencia de sacarosa. Esta característica ha permitido demostrar su efecto probiótico como colonizadora del intestino de larvas gnotobióticas de pez cebra en estudios de competición con el patógeno de peces *V. anguillarum*. Los resultados demuestran que la colonización de *Lb. sakei* MN1 es superior en condiciones de no producción de EPS-LM e indican un efecto cepa-específico del dextrano, como antiagregante e inhibidor de la formación de biopelícula.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G.** (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. Williams y Wilkins. Edición 1ª. Volumen 2.
2. **Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., de los Reyes-Gavilan, C.G.** (2009). Biosynthesis and Chemical Composition of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. En: *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Ed. Ullrich, M. pp. 279-310.
3. **Felis, G.E., Salvetti, S., Torriani, S.** (2015). Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. En: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 2nd Edition. Eds. Mozzi, F. pp. 25-31.
4. **Buchanan, R.E., Gibbons, N.R.** (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eds. Williams y Wilkins. Edición 8ª.
5. **Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I., Decaris, B.** (1996). 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter- and Intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 102-111.
6. **Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T., Oyaizu, H.** (1998). Phylogenetic Analysis of the Genus *Bifidobacterium* and Related Genera Based on 16S rDNA Sequences. *Microbiology and Immunology*. 42: 661-667.
7. **Lugli, G.A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Ferrario, C., Viappiani, A., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Taminiau, B., Delcenserie, V., van Sinderen, D., Ventura, M.** (2014). Investigation of the Evolutionary Development of the Genus *Bifidobacterium* by Comparative Genomics. *Applied and Environmental Microbiology*. 80: 6383-6394.
8. **Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F.** (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*. 24: 128-138.
9. **van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., Maguin, E.** (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82: 187-216.
10. **Leroy, F., De Vuyst, L.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.
11. **Wood, B.J.B.** (1992). The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. En: *The Lactic Acid Bacteria*. Ed. Wood, B.J.B. Volumen 1.
12. **Von Wright, A., Axelsson, L.T.** (2004). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects*. Eds. Salminen, S., von Wright A., Ouwehand, A., Dekker, M. Edición 3ª.
13. **Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta G., Villani, F.** (2010). Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. *Journal of Food Science*. 75: 28-35.
14. **Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P.** (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advance*. 29: 54-66.
15. **Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P., Spano, G.** (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96: 1383-1394.
16. **Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D.** (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*. 109: 66-74.

17. **Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G., Metaxopoulos, J.** (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 649-660.
18. **Lyhs, U., Koort, J.M.K., Lundström, H-S., Björkroth, K.J.** (2004). *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 207-218.
19. **Hammes, W., Hertel, C.** (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: The Prokaryotes. Eds. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. pp. 320-403.
20. **Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I.** (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*. 22: 529-538.
21. **Champomier-Vergès, M-C., Chaillou, S., Cornet, M., Zagorec, M.** (2001). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*. 152: 839-848.
22. **Katla, T., Møretrø, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K.** (2001). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*. 18: 431-439.
23. **de Paula, A.T., Jeronymo-Ceneviva, A.B., Todorov, S-D., Penna, A.L.B.** (2014). The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. *Food Reviews International*. 31: 147-171.
24. **Björkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., Holzapfel, W.H.** (2014). The genus *Leuconostoc*. En: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. Eds. John Wiley y Sons. pp. 391-404.
25. **Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C.** (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. 14: 467-494.
26. **Gomez-Casado, E., Estepa, A., Coll, J.M.** (2011). A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*. 29: 2657-2671.
27. **Rodríguez Saint-Jean, S., De las Heras, A., Carrillo, W., Recio, I., Ortiz-Delgado, J.B., Ramos, M., Gomez-Ruiz, J.A., Sarasquete, C., Pérez-Prieto, S.I.** (2013). Antiviral activity of casein and α s2 casein hydrolysates against the infectious haematopoietic necrosis virus, a rhabdovirus from salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 36: 467-481.
28. **Kruse, H., Sørum, H.** (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 4015-4021.
29. **Cabello, F.C.** (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8: 1137-1144.
30. **de las Heras, A.I., Pérez Prieto, S.I., Rodríguez Saint-Jean, S.** (2009). In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 120-129.
31. **Salonius, K., Simard, N., Harland, R., Ulmer, J.B.** (2007). The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 8: 635-641.

32. Ringø, E., Olsen, R.E., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Song, S.K. (2012). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *Journal of Marine Science: Research and Development*. 2: 1-22.
33. Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 4596-601.
34. Guzman-Villanueva, L. T., Tovar-Ramirez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F.A., Cuesta, A. Meseguer, J., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.A. (2014). Dietary administration of beta-1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol*. 39: 34-41.
35. Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H., Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. 431: 1-11.
36. Sanders, M.E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*. 46: S58-S61.
37. Ringø, E., Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160: 177-203.
38. Gómez, G.D., Balcázar, J.L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 52: 145-154.
39. Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Hermosillo, O.A.M, Ramírez Saad, H.C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*. 2012: 1-13.
40. Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C.G. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 88: 843-856.
41. Suresh Kumar, A., Mody, K., Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*. 47: 103-117.
42. Pérez-Ramos, A., Nácher-Vázquez, M., Notararigo, S., López, P., Mohedano, M.L. (2015). Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides. En: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Eds. Preedy, V.R., Watson, R.R. ISBN: 9780128021897
43. Ruas-Madiedo, P. (2014). Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. En: Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. Eds. Moreno, F.j., Sanz, M.L.
44. Rühmkorf, C., Bork, C., Mischnick, P., Rübsam, H., Becker, T., Vogel, R.F. (2013). Identification of *Lactobacillus curvatus* TMW 1.624 dextranucrase and comparative characterization with *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 and *Lactobacillus animalis* TMW 1.971 dextranucrases. *Food Microbiology*. 34: 52-61.
45. Amari, M., Gomez Arango, L.F., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Moulis, C., Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Fontagné-Faucher, C. (2013). Characterization of a novel dextranucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 5413-5422.
46. Llaubères, R.M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., Fournet, B. (1990). Structure of an exocellular β -d-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*. 203: 103-107.

47. **Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero Mateo, P., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M.** (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*. 303: 453-458.
48. **Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M.** (1998). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. G-77. *Carbohydrate Research*. 307: 125-133.
49. **Ibarburu, I., Soria-Díaz, M.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Velasco, S.E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A.M., Irastorza-Iribas, A., Dueñas-Chasco, M.T.** (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 477-486.
50. **Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., Lonvaud-Funel, A.** (2008). Characterization on *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genome of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 4079-4090.
51. **Garai-Ibabe, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L., Fernández de Palencia, P.** (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*. 101: 9254-63.
52. **van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, G.H.** (2006). Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 157-176.
53. **Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., López, P.** (2006). *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*. 69: 161-169.
54. **Werning, M.L., Corrales, M.A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., López, P.** (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 5259-5262.
55. **Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 37(Database issue): D233-D238.
56. **Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M.G., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L.** (2004). Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology*. 150: 3681-3690.
57. **De Vuyst, L., Degeest, B.** (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 23: 153-177.
58. **De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelmem, F., Degeest, B.** (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11: 687-707.
59. **Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst L.** (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing

- lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4431-4435.
60. **Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L.** (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. 118: 250-258.
 61. **Glucksmann, M.A., Reuber, T.L., Walker, G.C.** (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. 175:7045-7055.
 62. **Lin, W.S., Cunneen, T., Lee, C.Y.** (1994). Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 176: 7005-7016.
 63. **García, E., Llull, D., Muñoz, R., Mollerach, M., López, R.** (2000). Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Research in Microbiology*. 151: 429-435.
 64. **Laws, A., Gu, Y., Marshall, V.** (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. 19: 597–625.
 65. **Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F., de los Reyes-Gavilán, C.G.** (2008). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. En: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. Eds. Mayo, B., López, P., Pérez-Martín, G. pp. 137-166.
 66. **Jolly, L., Stingle, F.** (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in Lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11: 773-745.
 67. **Gänzle, M., Schwab, C.** (2009). Biosynthesis and Chemical Composition of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. En: Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Ed. Ullrich, M. pp. 263-278.
 68. **Ruas-Madiedo, P., Moreno, J.A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., de Los Reyes-Gavilán, C.G.** (2007). Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 4385-4388.
 69. **Hidalgo-Cantabrana, C., Ordoñez, I., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A.** (2015). Degenerate PCR primers for detecting putative priming glycosyltransferase genes in *Bifidobacterium* strains. *Beneficial Microbes*. 6: 553-562.
 70. **Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventorino, V., Pepe, O.** (2012). Polyphasic Screening, Homopolysaccharide Composition, and Viscoelastic Behavior of Wheat Sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* Exopolysaccharide-Producing Starter Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 2737-2747.
 71. **Goh, K.K.T., Haisman, R.D., Singh, H.** (2005). Examination of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Using Confocal Laser Scanning and Scanning Electron Microscopy Techniques. *Journal of Food Science*. 70: M224-M229.
 72. **Hassan, A.N., Frank, J.F., Elsoda, M.** (2003). Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 13: 755-762.

73. **Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith F.** (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
74. **Dueñas, M.T., Munduate, A., Perea, A., Irastorza, A.** (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 113-120.
75. **Sarwat, F., Qader, S.A.U., Aman, A., Ahmed, N.** (2008). Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*. 4: 379-386.
76. **Capek, P., Hlavoňová, E., Matulová, M., Mislovicová, D., Růžička, J., Koutný, M., Keprdová, L.** (2011). Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydrate Polymers*. 83: 88-93.
77. **Werning, M.L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., López, P.** (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. En: *Food additives*. Ed. El-Samragy, Y. pp: 83-114.
78. **Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M.L., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Aznar, R., López P., Prieto A.** (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 93: 57-64.
79. **Vijayendra, S.V.N., Sharath Babu, R.S.** (2008). Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 643-648.
80. **Germond, J.E., Delley, M., D'Amico, N., Vincent, S.J.** (2001). Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *European Journal of Biochemistry*. 268: 5149-5156.
81. **Marshall, V.M., Rawson, H.L.** (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*. 34: 137-143.
82. **Broadbent, J.R., McMahan, D.J., Oberg, C.J., Welker, D.L.** (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*. 11: 433-439.
83. **Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, S.** (2004). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5533-5538.
84. **Liu, J-R., Wang, S-Y., Lin, Y-Y., Lin, C-W.** (2002). Antitumor Activity of Milk Kefir and Soy Milk Kefir in Tumor-Bearing Mice. *Nutrition and Cancer*. 44: 183-187.
85. **Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M.** (2007). Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*. 2: 1022-1033.
86. **Tanriseven, A., Doğan, Ş.** (2002). Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. *Process Biochemistry*. 37: 1111-1115.
87. **Levander, F., Svensson, M., Radstrom, P.** (2001). Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. *BMC Microbiology*. 1: 1-23.

88. **Ibarburu, I., Puertas, A.I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M.A., Prieto, A., Dueñas, M.T.** (2015). Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Food Microbiology*. 214: 54-62.
89. **Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Prieto, A., Calle, L.P., de Los Reyes-Gavilán, C.G.** (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* NB667 and its cholate-resistant derivative strain IPLA B667dCo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 1028-1035.
90. **Van Calsteren, M.R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., Roy, D.** (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal*. 363: 7-17.
91. **Kimmel, S.A., Roberts, R.F., Ziegler, G.R.** (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*RR Grown in a Semidefined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 659-664.
92. **Macedo, M.G., Laporte, M.F., Lacroix, C.** (2002). Quantification of exopolysaccharide, lactic acid, and lactose concentrations in culture broth by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1774-1779.
93. **Patel, A., Prajapati, J.B.** (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advance in Dairy Research*. 1: 107.
94. **Scheibler, C.** (1874). Investigation on the nature of the gelatinous excretion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices. *Z Dtsch Zucker-Ind.* 24: 309-335.
95. **Pasteur, L.** (1861). On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bulletin mensuel de la Société chimique de Paris*. 11: 30-31.
96. **Van Tieghem, P.** (1878). On sugar-mill gum. *Ann Sci Nature Bot Biol Veg.* 7: 180-203.
97. **Dimopoulou, M.V.M., Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C.** (2014). Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni*: From Genes to Phenotypes. *PLoS ONE*. 9: e98898.
98. **Germaine, G.R., Schachtele, C.F.** (1976). *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high-molecular-weight dextran and role in cellular aggregation. *Infection and Immunity*. 13: 365-372.
99. **Katina, K., Maina, N.H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M., Laitila, A.** (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*. 26: 734-743.
100. **Misaki, A., Torii, M., Sawai, T., Goldstein, I.J.** (1980). Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydrate Research*. 84: 273-285.
101. **Korakli, M., Vogel, R.F.** (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 790-803.
102. **Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R-M., Remaud-Simeon, M.** (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11: 675-685.
103. **Neely, W.B., Nott, J.** (1962). Dextransucrase, an Induced Enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry*. 1: 1136-1140.

104. **Kim, D., Robyt, J.F.** (1994). Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme and Microbial Technology*. 16: 659-664.
105. **Quirasco, M., López-Munguía, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Farrés, A.** (1999). Induction and Transcription Studies of the Dextranase Gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5504-5509.
106. **Robyt, J.F., Walseth, T.F.** (1979). Production, purification, and properties of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydrate Research*. 68: 95-111.
107. **Robyt, J.F.**, (1985). Dextran. En: Encyclopedia of Polymer Science. Eds. Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G. pp. 753-767.
108. **Leathers, T.D.** (2002). Dextran, in Biopolymers. En: *Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Eds. Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbuchel, A. pp. 299-321.
109. **Ruiz-Matute, A.I., Brokl, M., Sanz, M.L., Soria, A.C., Côté, G.L., Collins, M.E., Rastall, R.A.** (2011). Effect of Dextranase Cellobiose Acceptor Products on the Growth of Human Gut Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 3693-3700.
110. **Remaud-Simeon, M., Willemot, R-M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk G., Monsan, P.** (2000). Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10: 117-128.
111. **Erhardt, F.A., Kügler, J. Chakravarthula, R.R., Jördening, H-J.** (2008). Co-immobilization of dextranase and dextranase for the facilitated synthesis of isomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*. 100: 673-683.
112. **Ölçer, Z., Tanriseven, A.** (2010). Co-immobilization of dextranase and dextranase in alginate. *Process Biochemistry*. 45: 1645-1651.
113. **Mizutani, N., Yamada, M., Takayama, K., Shoda, M.** (1994). Constitutive mutants for dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 77: 248-251.
114. **Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., Vandamme, E.J.** (2005). *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80: 845-860.
115. **Marijke, M.F.A., Schols, D.** (2012). Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy. *Journal of Tropical Medicine*. 2012: 628475.
116. **Yamada, H., Moriishi, E., Haredy, A.M., Takenaka, N., Mori, Y., Yamanishi, K., Okamoto, S.** (2012). Influenza virus neuraminidase contributes to the dextran sulfate-dependent suppressive replication of some influenza A virus strains. *Antiviral Research*. 96: 344-352.
117. **Gasson, M.J.** (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*. 154: 1-9.
118. **Mohedano, M.L., García-Cayuela, T., Pérez-Ramos, A., Gaiser, R., Requena, T., López, P.** (2015). Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 42: 247-253.

119. **Russo, P., Iturria, I., Mohedano, M.L., Caggianiello, G., Rainieri, S., Fiocco, D., Pardo, M.A., López, P., Spano G.** (2015). Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99: 3479-3490.
120. **O'Toole, R., von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P-E., Wolf-Watz, H.** (2004). Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*. 37: 41-46.
121. **de Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.** (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 23: 130-135.
122. **Poolman, B., Hellingwerf, K.J., Konings, W.N.** (1987). Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 169: 2272-2276.
123. **Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
124. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
125. **Dornan, S., Collins, M.** (1987). High efficiency electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230. *Letters in Applied Microbiology*. 11: 62-64.
126. **Berthier, F., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Ehrlich, S.D., Morel-Deville, F.** (1996). Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiology*. 142: 1273-1279.
127. **Akin, D.E., Rigsby, L.L.** (1990). Preservation of ruminal bacterium capsules by using lysine in the electron microscopy fixative. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2933-2935.
128. **Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5: 725-738.
129. **Shindyalov, I.N., Bourne, P.E.** (1998). Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Engineering*. 11: 739-747.
130. **Rice, P., Longden, I., Bleasby, A.** (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 16: 276-277.
131. **Laine, R.A., Esselman, W.J., Sweeley, C.C.** (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology*. 28: 159-167.
132. **Ciucanu, I., Kerek, F.** (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131: 209-217.
133. **Needs, P.W., Selvendran, R.R.** (1993). Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate Research*. 245: 1-10.
134. **Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, S.I.** (2006). Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 110: 1-10.
135. **Pérez-Prieto, S.I., García-Rosado, E., Rodríguez Saint-Jean, S., Castro, D., Borrego, J.J.** (2001). Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology*. 82: 11-25.

136. **de las Heras, A.I., Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, S.I.** (2010). Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 28: 562-570.
137. **Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 25: 402-408.
138. **Nieto, C., Puyet, A., Espinosa, M.** (2001). MalR-mediated Regulation of the *Streptococcus pneumoniae malMP* Operon at Promoter PM: Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 14946-14954.
139. **García-Cayuela, T., de Cadinanos, L.P., Mohedano, M.L., Fernández de Palencia, P., Boden, D., Wells, J., Peláez, C., López, P., Requena T.** (2012). Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96: 171-81.
140. **Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penadés, J.R., Lasa, I.** (2009). Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections. *Infection and Immunity*. 77: 3978-3991.
141. **Sullivan, C., Kim, C.H.** (2008). Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology*. 25: 341-350.
142. **Oyarbide, U., Iturria, I., Rainieri, S., Pardo, M.A.** (2014). Use of Gnotobiotic Zebrafish to Study *Vibrio anguillarum* Pathogenicity. *Zebrafish*. 12: 71-80.
143. **Rendueles, O., Ferrières, L., Frétaud, M., Bégaud, E., Herbomel, P., Levraud, J.P.** (2012). A new Zebrafish model of oro-Intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria. *PLoS Pathogens*. 8: e1002815.
144. **De Martinis, E.C.P., Públio, M.R.P., Santarosa, P.R., Freitas F.Z.** (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 32-37.
145. **Holt, S.M., Al-Sheikh, H., Shin, K.J.** (2001). Characterization of dextran-producing *Leuconostoc* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 185-189.
146. **McLeod, A., Nyquist, O.L., Snipen, L., Naterstad, K., Axelsson, L.** (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*. 31: 393-403.
147. **Benachour, A., Frere, J., Novel, G.** (1995). pUCL287 plasmid from *Tetragenococcus halophila* (*Pediococcus halophilus*) ATCC 33315 represents a new theta-type replicon family of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 128: 167-175.
148. **Alpert, C.A., Crutz-Le Coq, A.M., Malleret, C., Zagorec, M.** (2003). Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 5574-5584.
149. **Ryan, P.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Caplice, N.M., Stanton, C.** (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*. 6: 679-693.
150. **Fernández de Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Corbí, A.L., López, P.** (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied Environmental Microbiology*. 75: 4887-4891.

151. **Russo, P., López, P., Capozzi, V., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Spano, G., Fiocco, D.** (2012). Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 6026-6039.
152. **Notararigo, S., de las Casas-Engel, M., Fernández de Palencia, P., Corbí, A.L., López, P.** (2014). Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)- β -D-glucan from *P. parvulus* 2.6. *Carbohydrate Polymers*. 112: 109-113.
153. **Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y.** (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 33: 103-120.
154. **Korkeala, H.J., Björkroth, K.J.** (1997). Microbiological Spoilage and Contamination of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. *Journal of Food Protection*. 60: 724-731.
155. **Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J.** (2000). Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 83-94.
156. **Chenoll, E., Macián, M.C., Elizaquível, P., Aznar, R.** (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 498-508.
157. **Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D.** (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 2108-2113.
158. **Dertli, E., Colquhoun, I.J., Gunning, A.P., Bongaerts, R.J., Le Gall, G., Bonev, B.B., Mayer, M.J., Narbad, A.** (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* F19785. *Journal of Biological Chemistry*. 288: 31938-31951.
159. **Bounaix, M-S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C.** (2009). Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 10889-10897.
160. **Barrière, C., Veiga-da-Cunha, M., Pons, N., Guédon, E., van Hijum, S.A.F.T., Kok, J., Kuipers, O.P., Ehrlich, D.S., Renault, P.** (2005). Fructose Utilization in *Lactococcus lactis* as a Model for Low-GC Gram-Positive Bacteria: Its Regulator, Signal, and DNA-Binding Site. *Journal of Bacteriology*. 187: 3752-3761.
161. **Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N.D., Monsan, P.F.** (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2159-2165.
162. **Santos, M., Teixeira, J., Rodrigues, A.R.** (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. 4: 177-188.
163. **van Geel-Schutten, G.H., Fleisch, F., Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L.** (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 697-703.
164. **Rehm, B.H.A.** (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 578-592.

165. **Ahmed, R.Z., Siddiqui, K., Arman, M., Ahmed, N.** (2012). Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3. *Carbohydrate Polymers*. 90: 441-446.
166. **Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L.** (2013). Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*. 163: 250-272.
167. **Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Pérez, P.F., Abraham, A.G.** (2010). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of Applied Microbiology*. 109: 2079-2086.
168. **Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., van der Maarel, M., Dijkhuizen, L.** (2003). Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in *Lactobacillus* strains. *Biocatalysis and Biotransformation*. 21: 181-187.
169. **Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R.F., Gänzle, M.G.** (2005). Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 692-702.
170. **Wang, T-T., Lee, B.H.** (1997). Plasmids in *Lactobacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17: 227-272.
171. **Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J., Topisirovic, L.** (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 4086-4088.
172. **Ahrné, S., Molin, G., StÅhl, S.** (1989). Plasmids in *Lactobacillus* Strains Isolated from Meat and Meat Products. *Systematic and Applied Microbiology*. 11: 320-325.
173. **Vujcic-Zagar, A., Pijning, T., Kralj, S., López, C.A., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W.** (2010). Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 21406-21411.
174. **Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L.** (2004). Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology*. 150: 2099-2112.
175. **Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A.D., Iwata, S.** (2011). Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*. 408: 177-186.
176. **Olvera, C., Fernández-Vázquez, J.L., Ledezma-Candanoza, L., López-Munguía, A.** (2007). Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology*. 153: 3994-4002.
177. **Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., Hermoso, J.A.** (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications*. 5: 3842.
178. **Wenham, D.G., Hennessey, T.D., Cole, J.A.** (1979). Regulation of Glucosyl- and Fructosyltransferase Synthesis by Continuous Cultures of *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology*. 114: 117-124.

179. **Janda, W.M., Kuramitsu, H.K.** (1978). Production of Extracellular and Cell-Associated Glucosyltransferase Activity by *Streptococcus mutans* During Growth on Various Carbon Sources. *Infection and Immunity*. 19: 116-122.
180. **Funane, K., Yamada, M., Shiraiwa, M., Takahara, H., Yamamoto, N., Ichishima, E., Kobayashi, M.** (1995). Aggregated Form of Dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and Its Constitutive Mutant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 59: 776-780.
181. **Neubauer, H., Bauché, A., Beat Mollet, B.** (2003). Molecular characterization and expression analysis of the dextranucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology*. 149: 973-982.
182. **Bounaix, M.S., Robert, H., Gabriel, V., Morel, S., Remaud-Simeon, M., Gabriel, B., Fontagne-Faucher, C.** (2010). Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextranucrase expression. *FEMS Microbiology Letters*. 311: 18-26.
183. **Schwab, C., Walter, J., Tannock, G.W., Vogel, R.F., Gänzle, M.G.** (2007). Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Systematic and Applied Microbiology*. 30: 433-443.
184. **Swe, P.M., Heng, N.C.K., Cook, G.M., Tagg, J.R., Jack, R.W.** (2010). Identification of DysI, the Immunity Factor of the Streptococcal Bacteriocin Dysgalactin. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 7885-7889.
185. **Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez Prieto, S.I., López-Expósito, I., Ramos, M., de las Heras, A.I. Recio, I.** (2012). Antiviral activity of dairy proteins and hydrolysates on salmonid fish viruses. *International Dairy Journal*. 23: 24-29.
186. **Haller, O., Kochs, G., Weber, F.** (2006). The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*. 344: 119-130.
187. **Robertsen, B.** (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20: 172-191.
188. **Nácher, M., López, P., Prieto, A., Pérez, S.I., Rodríguez, S., Mohedano, M.L., Aznar, R.** (2014). *Secuencia de nucleótidos codificante de una enzima con actividad dextranacaras, células que la expresan y su uso para la obtención de exopolisacáridos con actividad antiviral y composiciones que los contienen*. PCT/ES2014/070464
189. **Nwodo, U.U., Green, E., Okoh, A.I.** (2012). *Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 14002-14015.
190. **Dertli, E., Mayer, M.J., Narbad, A.** (2015). Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* F19785. *BMC Microbiol*. 15: 1-8.
191. **Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J.** (2009). Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 3554–3563.
192. **Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D.** (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31: 438-442.

193. **Pérez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A., De Antoni, G.L.** (1998). Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 21-26.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO I. Secuencias

I.I. Secuencia parcial del gen del rRNA 16S de *Lb. sakei* MN1 (1.345 pb) (número de acceso en GenBank KJ161303).

```
GCTATACATGCAAGTGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCCTGATTGATAAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTG
AGTAAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAACACCGCATGGTGT
AGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTG
ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACCCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTAT
CTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTG
CATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG
CCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTAC
CAGGCTTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC
AACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
```

I.II. Secuencia parcial del gen del rRNA 16S de *Lc. mesenteroides* RTF10 (1.292 pb) (número de acceso en GenBank KJ161304).

```
GGTCTTGACACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGA
TGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAGGCGCTTCGGCGTCACTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAG
TTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCC
AAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGcCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCG
GGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACAGAAAGGGACGGCTAAA
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTTATTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGAACTCCATGTGTA
GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGG
TAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCGCGCTCTTAGTGCCGAAGC
TAACGCATTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGACCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGAC
AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGT
TGCCAGCATTCAGATGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGTTAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTT
CGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
```

I.III. Secuencia del plásmido pMN1 de *Lb. sakei* MN1 (11.126 pb). Se muestra la secuencia de aminoácidos de sus ORF y genes con su dirección de transcripción: *repA*, *repB*, *orf1*, *orf2*, *orf3*, *orf4*, *orf5*, *orf6* y *orf7*. Además recuadrados se señalan los diferentes iterones y en gris los promotores y un terminador (con flechas divergentes) putativos.

```

1 CCTCTTTTAA ACCTCTTTTA TAAACCTCTT TAAACCTCT TTTAGACCCC
  CCTCTTTTAA ACCTCTTTTA TAAACCTCTT TAAACCTCT TTTAGACCCC
51 TCTTGAGGCT TACTCTCCCA AGGCTTATAG AAGTTTATCG ACTACATTTT
  TCTTGAGGCT TACTCTCCCA AGGCTTATAG AAGTTTATCG ACTACATTTT
101 GTCTGTTTAT CGACTACATT TTGTCTGTTT ATCGACTACA TTTTGTCTGT
  GTCTGTTTAT CGACTACATT TTGTCTGTTT ATCGACTACA TTTTGTCTGT
151 TTATCGACTA CATTTTGTCT GTTTATCGAC TACACTTATT TACTTCTGTA
  TTATCGACTA CATTTTGTCT GTTTATCGAC TACACTTATT TACTTCTGTA
201 TTCAAATAAA GTAGTATTAT TCAAGGAGGT TATTTTATGA GCAATGAATT
  TTCAAATAAA GTAGTATTAT TCAAGGAGGT TATTTTATGA GCAATGAATT
  -10 M S N E L rep A
251 AGTTAAATAT GATCCAGAAC TGAATACAAT TCCTCTGAGA AGATTTACTC
  AGTTAAATAT GATCCAGAAC TGAATACAAT TCCTCTGAGA AGATTTACTC
  V K Y D P E L N T I P L R R F T P rep A
301 CTGTAGAAAT GAATCTTTTC TTTTCGGTTG TTTCTAGAAT GCGCGATAAA
  CTGTAGAAAT GAATCTTTTC TTTTCGGTTG TTTCTAGAAT GCGCGATAAA
  V E M N L F F S V V S R M R D K rep A
351 GGTGATGATA CTGTTCCGGT TACTTTTGAT CAGTTAAAAG AATTAAGCGC
  GGTGATGATA CTGTTCCGGT TACTTTTGAT CAGTTAAAAG AATTAAGCGC
  G D D T V R F T F D Q L K E L S A rep A
401 GTATAAGCCG ACCGCAAATA ATCGATTAT TGATGACATA CAAAGTACAT
  GTATAAGCCG ACCGCAAATA ATCGATTAT TGATGACATA CAAAGTACAT
  Y K P T A N N R F I D D I Q S T Y rep A
451 ATCAAAAAAT ATTAGGTCTT AGATTTGGCT CTAGAAGTAA AGATGGACTT
  ATCAAAAAAT ATTAGGTCTT AGATTTGGCT CTAGAAGTAA AGATGGACTT
  Q K I L G L R F G S R S K D G L rep A
501 GATAGAGAAA TGTTTGTTCAT GTTACTCGA TTTGAAATCA AGGGTTCGGC
  GATAGAGAAA TGTTTGTTCAT GTTACTCGA TTTGAAATCA AGGGTTCGGC
  D R E M F V M F T R F E I K G S A rep A
551 AGAAGTCCCT TATGTTGATA TTCAAATTTA CCCCAGGCA TTGAAACTTC
  AGAAGTCCCT TATGTTGATA TTCAAATTTA CCCCAGGCA TTGAAACTTC
  E V P Y V D I Q I Y P K A L K L L rep A
601 TAAATAATCT TGAAAGCTGG GTTCGATATG CTTTAGCAGA GTTCAGAGAT
  TAAATAATCT TGAAAGCTGG GTTCGATATG CTTTAGCAGA GTTCAGAGAT
  N N L E S W V R Y A L A E F R D rep A
651 TTAAAGAGTA GTTATGCAAA AACGATGTTT CGTCTCCTTA AACAAATTCG
  TTAAAGAGTA GTTATGCAAA AACGATGTTT CGTCTCCTTA AACAAATTCG
  L K S S Y A K T M F R L L K Q F R rep A
701 AACTACTGGT TATGCTTATT TTTCTAAAAG TGATTTTTTT GAATTACTION
  AACTACTGGT TATGCTTATT TTTCTAAAAG TGATTTTTTT GAATTACTION
  T T G Y A Y F S K S D F F E L L D rep A
751 ATATTCCGCA AAGCTATTGG AATAAACCTG CAAACGTTGA ATCCAGAGTT
  ATATTCCGCA AAGCTATTGG AATAAACCTG CAAACGTTGA ATCCAGAGTT
  I P Q S Y W N K P A N V E S R V rep A
801 ATTCAGCCAA TTAAAGAAGA ACTAACTCCT CTTTTAGGG GTCTAGCTAT
  ATTCAGCCAA TTAAAGAAGA ACTAACTCCT CTTTTAGGG GTCTAGCTAT
  I Q P I K E E L T P L F R G L A I rep A
851 TAGAAAAAAA TATGGTAAAG GCCGTGGCAA GCCGGTTATT GGTACTCAT
  TAGAAAAAAA TATGGTAAAG GCCGTGGCAA GCCGGTTATT GGTACTCAT
  R K K Y G K G R G K P V I G Y S F rep A
901 TTACCTGGAA ATCAGAAAAA AAGAACGCAG ACGACTTCTC ACAAGGTCAA
  TTACCTGGAA ATCAGAAAAA AAGAACGCAG ACGACTTCTC ACAAGGTCAA
  T W K S E K K N A D D F S Q G Q rep A
951 TTTCAAGATG AACGTCAAAA ACTCTTTAAC ATTCAGCATA ATGGTGAATT
  TTTCAAGATG AACGTCAAAA ACTCTTTAAC ATTCAGCATA ATGGTGAATT
  F Q D E R Q K L F N I Q H N G E L rep A
1001 AACAGAGCAG GAAAAATGGC GTGCCATTGA CAAAGTTAAG GGGTTGACTT
  AACAGAGCAG GAAAAATGGC GTGCCATTGA CAAAGTTAAG GGGTTGACTT
  T E Q E K W R A I D K V K G L T L rep A
1051 TAGGCTCCAC TGAGAAACAA GCATTGGCTG AGAAACAAGC GGAACACGAT
  TAGGCTCCAC TGAGAAACAA GCATTGGCTG AGAAACAAGC GGAACACGAT
  G S T E K Q A L A E K Q A E H D rep A
1101 AAAAAAATAA GAGATCAAGC AAGAAAAGAA GCACTTGCTG AACTCCGAAA
  AAAAAAATAA GAGATCAAGC AAGAAAAGAA GCACTTGCTG AACTCCGAAA
  K K I R D Q A R K E A L A E L R K rep A
1151 GGGGTTTGGG AATCATGCCT AAAACTATTA GAGAACTTGC TGATGAATTG
  GGGGTTTGGG AATCATGCCT AAAACTATTA GAGAACTTGC TGATGAATTG
  G F G N H A * rep A
  M P K T I R E L A D E L rep B

```

1201 GGCCTTTCAA AGCAAAGAAT TCAACAAATT ATCGCCAAAT TATCGGCAAG
G V S K Q R I Q Q I I A K L S A S *rep B*
1251 TAAACACCA AATAAGGAAG GCAATAGATA CGTTTTAAAC GCCCAAGATG
K T P N K E G N R Y V L N A Q D V *rep B*
1301 TCAAAAATAT AAAGGATTG ATGGGTTTG ATAATGACAA GTCATCGACA
K N I K D L M G F D N D K S S T *rep B*
1351 AGTGAATCGA CAAATAGACT TGTCGATTAT GATGTTTACT TAGATGTGAT
S E S T N R L V D Y D V Y L D V I *rep B*
1401 AGATTCCATA AAAGAAAAAG ATGAACAGAT AAAAAATTTA TTAGAAGTTC
D S I K E K D E Q I K I L L E V Q *rep B*
1451 AAAAAACAAC ACAAATCTT CTAGATCAGC AACCAACGGTT AGCCTTACAG
K Q T Q N L L D Q Q Q R L A L Q *rep B*
1501 GACAAACAAC TGCTCGAAGA ATACAAGGCA GAAATTAAGG ACTTGAAAGC
D K Q L L E E Y K A E I K D L K A *rep B*
1551 CTTAACGATG GCACCACATG ATGATGGTGA AAAAAAGATG GCAGCACAAA
L T M A P H D D G E K K M A A Q K *rep B*
1601 AACAAACGGA ACCAGAACAT AGCACTCCTG ATTCGCAACC TAAACCTAAA
Q P E P E H S T P D S Q P K P K *rep B*
1651 AAGTGGTGGC GTTTTGGTAA ATAGTTATAA CTAAAAATA AAAGAAGACT
K W W R F G K * *rep B*
1701 AGTTAAATGG CGGAAGATA ATTTGAACAA GCTGTAATTG ACAAGTTAAA
M A E D K F E Q A V I D K L K *orf1*
→
1751 GAGCGAGGGG TGGGATTACC TCAGTGAGTA TTCTGGTGTG ACGGTTGATC
S E G W D Y L S E Y S G V T V D R *orf1*
1801 GGTATATGA TCACTGGCGA GATATTCTGA ATGCCAACAA TCGTAAACGA
L Y D H W R D I L N A N N R K R *orf1*
1851 CTAGAAGATA CGCCATTATC TGATAATGAG TTTGAACAAG TGAAGTTGGA
L E D T P L S D N E F E Q V K L E *orf1*
1901 ACTCACGAAG AATAAAACGC CGTATGATGC GCAACTCATG TTGGCGGGTG
L T K N K T P Y D A Q L M L A G A *orf1*
1951 CGGGTGGTGT TGGGACCGTA CCGTTGAATC GTGATGATGG GACGCAGCTA
G G V G T V P L N R D D G T Q L *orf1*
2001 GAACTTGAAG TATTCTATGG TAATGAAGTG GCTGGTGGAC ATTCACGTTA
E L E I F Y G N E V A G G H S R Y *orf1*
2051 TGAAGTCGTT AACCAAATTA CGTTTTACGGA TTTAGCCACG AGTCTCAGAT
E V V N Q I T F T D L A T S L R S *orf1*
2101 CTAAGCGTCG AATTGATATC ATGTTGCTGA TTAACGGGCT ACCTGTGGCC
K R R I D I M L L I N G L P V A *orf1*
2151 CACATTGAAG AAAAAAGATG GTCCTTGCAA AACCAATGGA ATGCGTTTGA
H I E E K D E S L Q N Q W N A F E *orf1*
2201 ACAGTTCCAA AAGTATGACG GTGACGGCAT GTACACGGGA CTCTTTTCTT
Q F Q K Y D G D G M Y T G L F S F *orf1*
2251 TTGTGCAAGT GCAGTTTGTG TGTCGCAAAA ATTCAGCGCA CTATTTTGCA
V Q V Q F V L S Q N S A H Y F A *orf1*
2301 CGACCAAAGA ATAGCCACTC TTATAACCGT GATTTTGCCCT TTGGTTGGCG
R P K N S H S Y N R D F A F G W R *orf1*
2351 TGACGATGAC GGCAAGAATG TCACGAATAC GATGACGTTA CTCCAAATTA
D D D G K N V T N T M T L L Q I N *orf1*
2401 ACCAGAGACC GCTTAAATA CTTGACTGGA AAACACCGTA TCAGGTTATG
Q R P L K I L D W K T P Y Q V M *orf1*
2451 CTGACCAATT TGTCAAAAA TCCGGATTAA ATTTGCAATC TACCTTTTTA
L T N L S K N P D * *orf1*

2501 TGAACATGA ATAATTCAGG TCTAATTATG **TTATTATAAA** TGTGTTTTAT
-10 **extendido**
2551 TAATACCACT TAATTAATAA CGGGGCTTTA GCATGATTC AAATAAATA
2601 GTGTGAAAGG TAGTTTTTTA TGTTAAGGAA TAATTATTTT GGAGAGACTA
M L R N N Y F G E T K *dsrLS*
→
2651 AAACGCATTA TAAATTATAT AAATGCGGTA AGAACTGGGC TGTCATGGGG
T H Y K L Y K C G K N W A V M G *dsrLS*
2701 ATTTTCATTAT TTCCGCTGGG ATTAGGGATG CTAGTTACCA GCCAGCCAGT
I S L F P L G L G M L V T S Q P V *dsrLS*
2751 GTCAGCTGAT GTGACAGCCA CCAGCACCTC AAGCAGTGCA GTGAGGACCG
S A D V T A T S T S S S A V R T D *dsrLS*
2801 ATGCAATCAG TGAAAGTAGT AGCAGTGCAG CAAAGGCTGA AACGACTAGT
A I S E S S S S A A K A E T T S *dsrLS*
2851 GCAAGTAGTA GCAGTGCAGT GAAGGCCGAA ACGACTAGTG CAAGTAGTAG
A S S S S A V K A E T T S A S S S *dsrLS*
2901 CAGTGCAGCA AAGGCTGAAA CGGCTGCGAT CACTACTGCA GGTGTTGCAA
S A A K A E T A A I T T A G V A N *dsrLS*
2951 ATGCTGATTC ACAAACATCA GCAGAAGTAA CCGCTGACTC TACTTCTACC
A D S Q T S A E V T A D S T S T *dsrLS*
3001 AGCCAAGTGG TAACTAATAA TTCCAATAAT CAAAATAATA CAGCACAGCC
S Q V V T N N S N N Q N N T A Q P *dsrLS*
3051 AGCCGGTCAA GAAGCAGCCC CGGTATCAGA GGACACATCA TCTGATGATA
A G Q E A A P V S E D T S S D D S *dsrLS*
3101 GTGAGAGAAC TACACCAACA GTTGCAAATA ATGATAAGCC AGCAATTGAT
E R T T P T V A N N D K P A I D *dsrLS*
3151 TCAGTTGACA CTTCACAACC TGCAACTGCA GCGCCAAAAG CAGACTGTA
S V D T S Q P A T A A P K A D T D *dsrLS*
3201 TGTATCAACG CTACAAGTAG ATGCAACTAC GAAGACCGAT TCAGACATAA
V S T L Q V D A T T K T D S D I K *dsrLS*
3251 AAGAGGATAC ACCAACAGAT AAGACAACCG ATACAAAGAC TGTGCAATTA
E D T P T D K T T D T K T V Q L *dsrLS*
3301 ACCACTGTTG AAGGAACGTC CAAGCAAGTG GTAACGACGC CGAAGGAAGA
T T V E G T S K Q V V T T P K E E *dsrLS*
3351 GAGCTCAACT GACAAATCTT CGTCTGTGGT TTCTAAACAG ACAGACAAAA
S S T D K S S S V V S K Q T D K T *dsrLS*
3401 CGTCTTTGCC AACCGTAGCA ACAGCAACAG CGACGACAGT GTCTAAGATT
S L P T V A T A T A T T V S K I *dsrLS*
3451 CCTTCAGTGA CAGGTGATTA CCAGTTTGAC GAAAAGACGA AGACTTATAC
P S V T G D Y Q F D E K T K T Y T *dsrLS*
3501 GTTCACAGGT AAAGATGGTC ATCCCATAAC TGGGTGGTT TACGCGAATA
F T G K D G H P V T G L V Y A N N *dsrLS*
3551 ATATCCTGCA ATACTTTGAT GAAACGGGTC ATCAAGTAAA AGGTCAATAC
I L Q Y F D E T G H Q V K G Q Y *dsrLS*
3601 GTTACAATTG CAGGTTCATG ATATTATTTT GACCCAGCCA GCGGCGCTGC
V T I A G H V Y Y F D P A S G A A *dsrLS*
3651 ACAAACAGGT GTTAATCAAA TCGATGGTAA GATGGTTGGG TTTAAATCTG
Q T G V N Q I D G K M V G F K S D *dsrLS*
3701 ATGGGTCAACA AATTACGTCA GGTTTTTCTA ATGATAACGC CGGAAATTCT
G S Q I T S G F S N D N A G N S *dsrLS*
3751 TACTACTTTG ATGAGTCTGG AACCATGGTG ACAGGGCGGC AAACATTTGC
Y Y F D E S G T M V T G R Q T I A *dsrLS*

3801 TGGTAAGACG TATTACTTTG ACAAAGACGG GCATCTCCGT AAGGGTATT
G K T Y Y F D K D G H L R K G Y S *dsrLS*

3851 CCACTATTAT TGATAATCAA TTGTACTATT TCGATTTGAA AACAGGAGAG
T I I D N Q L Y Y F D L K T G E *dsrLS*

3901 TCTGTTTCAA CAACGACGTC CAATTTCAAA TCTGGCTTGA CATCACAAAC
S V S T T T S N F K S G L T S Q T *dsrLS*

3951 GGATGACACA ACACCACATA ATAGTGCGGT TAATATGTCT AAGGATAGTT
D D T T P H N S A V N M S K D S F *dsrLS*

4001 TTACCACCGT TGATGGATTG TTGACAGCTG AGTCATGGTA TGTACCTAAA
T T V D G F L T A E S W Y V P K *dsrLS*

4051 GATATTCAAA CATCTGCGAC GGACTGGCGT GCATCAACGC CTGAAGATTT
D I Q T S A T D W R A S T P E D F *dsrLS*

4101 CCGTCCGATC ATGATGACTT GGTGGCCAAC GAAGCAAATT CAAGCAGCGT
R P I M M T W W P T K Q I Q A A Y *dsrLS*

4151 ATTTGAACCA TATGGTCTCC GAAGGATTGT TGTCATCAGA TAAGAAGTTC
L N H M V S E G L L S S D K K F *dsrLS*

4201 TCCGCAACGG ATGATCAAAC GTTGTGAAC CAAGCAGCAC ACGCGTTCA
S A T D D Q T L L N Q A A H A V Q *dsrLS*

4251 ATTGCAAATT GAATTGAAGA TTCAACAGAC AAAGTCTGTT GAATGGTTGC
L Q I E L K I Q Q T K S V E W L R *dsrLS*

4301 GAACAACGAT GCACAATTC ATTAAGTCAC AACCAGGATA CAATGTTACT
T T M H N F I K S Q P G Y N V T *dsrLS*

4351 AGTGAAACGC CAAGTAACGA CCACCTTCAA GGTGGCGCAT TAAGCTACAT
S E T P S N D H L Q G G A L S Y I *dsrLS*

4401 TAACAGTGT TTAGCAGCTG ATGCGAACTC AAATTTCCGT TTGATGAACC
N S V L T P D A N S N F R L M N R *dsrLS*

4451 GTAATCCAAC ACAACAAGAT GGTACGCGTC ATTACAACAC TGATACATCT
N P T Q Q D G T R H Y N T D T S *dsrLS*

4501 GAGGGTGGAT ATGAGTTGCT GTTAGCCAAT GACGTGGATA ATTCTAACCC
E G G Y E L L L A N D V D N S N P *dsrLS*

4551 AGTTGTTCAA GCAGAACAAT TGAAGTGGTT GACTTCTTG ACGCATTTGC
V V Q A E Q L N W L Y F L T H F G *dsrLS*

4601 GTGAAATTGT TAAGAACGAT CCGTCAGCTA ACTTTGATAG TGTTAGAGTG
E I V K N D P S A N F D S V R V *dsrLS*

4651 GATGCGGTAG ACAACGTGGA TGCCGACCTG CTAAACATTA CAGCCGCTTA
D A V D N V D A D L L N I T A A Y *dsrLS*

4701 TTTTAGAGAT GTGTATGGCG TCGATAAAAA CGATTTGACA GCTAATCAAC
F R D V Y G V D K N D L T A N Q H *dsrLS*

4751 ATTTGTCTAT TTTGGAAGAT TGGGGCCACA ATGACCCATT ATATGTCAAG
L S I L E D W G H N D P L Y V K *dsrLS*

4801 GACCACGTA GTGATCAGTT GACGATGGAT GATTACATGC ATACCCAATT
D H G S D Q L T M D D Y M H T Q L *dsrLS*

4851 GATTTGGTCA TTAACAAAAA ATCCAGATAA TCGTAGTGCG ATGCGACGAT
I W S L T K N P D N R S A M R R F *dsrLS*

4901 TTATGGAGTA TTATTTGGTC GACCGTGCTA AGGACAATAC GTCTGATCAG
M E Y Y L V D R A K D N T S D Q *dsrLS*

4951 GCAATTCCTA ATTACAGCTT TGTCCGTGCA CACGATAGTG AAGTTCAAAC
A I P N Y S F V R A H D S E V Q T *dsrLS*

5001 GGTATCGGT GATATTGTTG CGAAGTTGTA TCCGGATGTT AAAAATTCAT
V I G D I V A K L Y P D V K N S L *dsrLS*

5051 TGCGGCCATC TATGGAACAA TTGGCGGCAG CCTTTAAGGT ATATGATGCG
A P S M E Q L A A A F K V Y D A *dsrLS*

5101 GATATGAATT CTGTTAATAA GAAGTATACG CAATACAACA TGCCAGCAGC
D M N S V N K K Y T Q Y N M P A A *dsrLS*

5151 GTATGCCATG TTAATAACGA ATAAAGACAC AATTCCACGT GTTTACTATG
Y A M L L T N K D T I P R V Y Y G *dsrLS*

5201 GTGATATGTA TACGGATGAT GGTCAATATA TGGCAACTAA GTCACCATAT
D M Y T D D G Q Y M A T K S P Y *dsrLS*

5251 TACGATGCCA TCTCAGCGTT GTTGAAAGCC CGTATTAAGT ATGTGGCTGG
Y D A I S A L L K A R I K Y V A G *dsrLS*

5301 TGGACAAACC ATGGCTGTAG ATAAACACGA TATCTTAACA TCAGTTCGCT
G Q T M A V D K H D I L T S V R F *dsrLS*

5351 TTGGTGTGGG GATCATGAAT GCATCTGATA AGGGTAGCAC GACGGCCCGT
G D G I M N A S D K G S T T A R *dsrLS*

5401 ACCCAAGGAA TTGGCGTGAT TGTCAGCAAT AATGATGCGT TAGCGTTGAA
T Q G I G V I V S N N D A L A L K *dsrLS*

5451 GGGAGACACT GTGACCCTTC ATATGGGTAT CGCTCACGCC AACCAGGCAT
G D T V T L H M G I A H A N Q A Y *dsrLS*

5501 ACCGTGCTTT GTTGTTAACG ACGACAGATG GACTAATGAA ATACACGTCC
R A L L L T T T D G L M K Y T S *dsrLS*

5551 GATAATGGCG CGCCAATTCG CTATACGGAT GCAAATGGTG ACTTGATTTT
D N G A P I R Y T D A N G D L I F *dsrLS*

5601 CACTAGCGCA GACATTAAGG GATACCAAAA CGTTGAGGTA TCCGGATTCT
T S A D I K G Y Q N V E V S G F L *dsrLS*

5651 TGTCAGTGTG GGTACCAGTC GGTGCATCCG ACACACAGGA TGCGCGCGCA
S V W V P V G A S D T Q D A R A *dsrLS*

5701 ACAGGGTCTA GCGCTGCAAA CAAAAGTGGT GACACCTTAC ATTCAAATGC
T G S S A A N K T G D T L H S N A *dsrLS*

5751 AGCATTGGAC TCAAATGTGA TTTATGAAGG TTTTCTAAT TTCCAAGAGA
A L D S N V I Y E G F S N F Q E M *dsrLS*

5801 TGCCAACAAC CCACGATGAG TTTACAAAACG TAAAGATCGC TCAAAAATGCT
P T T H D E F T N V K I A Q N A *dsrLS*

5851 GATTTGTTTA AGTCATGGGG TGTGACAAGT TTCCAAGTGG CACCACAATA
D L F K S W G V T S F Q L A P Q Y *dsrLS*

5901 TCGTTCAAGT GATGACACAT CATTTTTGGG TTCTATTATT AAGAATGGAT
R S S D D T S F L D S I I K N G Y *dsrLS*

5951 ATGCGTTTAC AGACCGCTAT GACTTGGGCT TTAATACGCC AACAAAGTAC
A F T D R Y D L G F N T P T K Y *dsrLS*

6001 GGAGACGTTG ACGACCTAGC AGATGCAATT AGAGCAATGC ACAGTGTGG
G D V D D L A D A I R A M H S V G *dsrLS*

6051 TATTCAGGTC ATGGCTGACT TTGTCCCTGA CCAAATTTAT AATTTGCCAG
I Q V M A D F V P D Q I Y N L P G *dsrLS*

6101 GTCAAGAAGT AGTTGCTGTT AATCGTACTA ATAACCTTGG TACACCAAAC
Q E V V A V N R T N N F G T P N *dsrLS*

6151 CAGGATTCAG ATCTACAAAA CCAGTTGTAT GTTACAAATT CAAAGGGTGG
Q D S D L Q N Q L Y V T N S K G G *dsrLS*

6201 CGTGAAATAC CAAGCTAAGT ATGGTGGTGA GTTCTTGGAT CTTTTCGCTC
G E Y Q A K Y G G E F L D L L R L *dsrLS*

6251 TGGAACACCC TGATTTGTTT ACAACAAATC AGATTTTCGAC TGGTGTACCA
E H P D L F T T N Q I S T G V P *dsrLS*

6301 ATCGATGGGT CCACGAAGAT TAAAGAATGG TCTGCAAAGT ACTTCAATGG
I D G S T K I K E W S A K Y F N G *dsrLS*

6351 TTCTGACATC CAAGGTAAGG GCGCTGATTA CGTATGAAG GATGGTGCAT
S D I Q G K G A D Y V L K D G A S *dsrLS*

6401 CTCAAGAATA TTTCAAGATT ACGTCTAATG CGAACGATGA GTCCTTCTTG
Q E Y F K I T S N A N D E S F L *dsrLS*

6451 CCAAAACAAT TTATGAATCA AGATGCCATG ACTGGGTTCA CCACAGATGA
P K Q F M N Q D A M T G F T T D E *dsrLS*

6501 AAAGGCACA ACTTATTATT CAACAAGTGG TTACCAAGCT AACAGTCGT
K G T T Y Y S T S G Y Q A K Q S F *dsrLS*

6551 TTATCCAAGG TGATGATGGA CAATATTATT ACTTTGATGC AGACGGATAC
I Q G D D G Q Y Y Y F D A D G Y *dsrLS*

6601 ATGGTGACGG GCTCACAAAC CATTAAATGGT AAGCAATATT ACTTCTTGCC
M V T G S Q T I N G K Q Y Y F L P *dsrLS*

6651 AAATGGCGTT GAGTTAAGAG AAGCATTTTT ACAAATGCA TCTGGTAACA
N G V E L R E A F L Q N A S G N T *dsrLS*

6701 CGGTTTATTA TGGCAAGACT GGCTCAGCAG TTAAGTCTAA ATATGTAGTC
V Y Y G K T G S A V K S K Y V V *dsrLS*

6751 GATCAAAGCG GTGTGGCTTA TTACTTTGAT GTAAACGGTA ATATGGTCGC
D Q S G V A Y Y F D V N G N M V A *dsrLS*

6801 AGATCGTATG ATGATTCTTG ATGGACACAC GCAATATTTT TTTGCGGGTG
D R M M I L D G H T Q Y F F A G G *dsrLS*

6851 GTTCACAAGC TAAGGACCAA TTTTGTATTG GGTGAGATGG TAACTTACGT
S Q A K D Q F L I G S D G N L R *dsrLS*

6901 TACTTTGACC AAGGTAGTGG TAATATGGTT ACAAATCGTT TTGCAGTAAA
Y F D Q G S G N M V T N R F A V N *dsrLS*

6951 CCGAAACGGG GATTGGTTCT ACTTCAATGG CGATGGTATC GCGTTGAAGG
R N G D W F Y F N G D G I A L K G *dsrLS*

7001 GTTGGCAAAC AATTGCTGGT AAGACTTATT TCTTTGATGC TGATGGACGT
W Q T I A G K T Y F F D A D G R *dsrLS*

7051 CAAGTCAAGG CTGCCGCTGA CAAGGCTGCT GCTGACAAGG CTGCCGCTGA
Q V K A A A D K A A A D K A A A E *dsrLS*

7101 ACAAGCCGCT GCTGACAAGG CCGCTGCTGA CAAGGCTGCC GCTGAACAAG
Q A A A D K A A A D K A A A E Q A *dsrLS*

7151 CTGCCGCTGA CAAGGCTGCT GCTGACAAGG CTGCCGCTGA ACAAGCTGCC
A A D K A A A D K A A A E Q A A *dsrLS*

7201 GCTGACAAGG CTGCCGCTGA CAAGGCTGCC GCTGAACAAG CTGCCGCTGA
A D K A A A D K A A A E Q A A A D *dsrLS*

7251 CAAGGCTGCT GCTGACAAGG CTGCCGCTGA ACAAGCTGCC GCTGAACAAG
K A A A D K A A A E Q A A A E Q A *dsrLS*

7301 CTGCCGCTGA CAAGGCTGCC GCTGAACAAG CCGCTGCTGA CAAGGCTGCC
A A D K A A A E Q A A A D K A A *dsrLS*

7351 GCTGAACAAG CCGCTACTGA CAAGGCCGCT GCTGACAAGG CTGCCGCTGA
A E Q A A T D K A A A D K A A A E *dsrLS*

7401 ACAAGCTGCC GCTGACAAGG CTGCTGCTGA CAAGGCTGCC GCTGAACAAG
Q A A A D K A A A D K A A A E Q A *dsrLS*

7451 CTGCCGCTGA ACAAGCTGCC GCTGACAAGG CTGCCGCTGA ACAAGCTGCT
A A E Q A A A D K A A A E Q A A *dsrLS*

7501 GCTGACAAGG CTGCCGCTGA ACAAGCTGCC GCTGACAAGG CTGCCGCTGA
A D K A A A E Q A A A D K A A A E *dsrLS*

7551 ACAAGCCGCT GCTGACAAGG CTGCCGCTAA GGATAAGCAA ACTCAAGCTG
Q A A A D K A A A K D K Q T Q A V *dsrLS*

7601 TAGCTTACGC TGCTACCAAG GCTAAGAACA ATATTGATCA AGCTACTACA
A Y A A T K A K N N I D Q A T T *dsrLS*

7651 GCTGATGGCA TCAATGATGC CCAAGCAACT GGTATCACTG ATATTGATAA *dsrLS*
A D G I N D A Q A T G I T D I D N
7701 CCAGCATGTT CCTGGTACTT CTGTTGATAA TCAAAAGCAA GCTGAGAAGG *dsrLS*
Q H V P G T S V D N Q K Q A E K V
7751 TAACTGAAGA TATCAAGAAT GATCCAGATA ATAAGACTTT GCCTGAAGCT *dsrLS*
T E D I K N D P D N K T L P E A
7801 ATCGAATTAC CAAATACGGG CGTTGATAAG ACAGAAAGTA TTACTIONT *dsrLS*
I E L P N T G V D K T E S I T I T
7851 CGGTGTAGTT ATGCTAATCC TCACTACTAT TTTTGGTCTG TTGTTTACAA *dsrLS*
G V V M L I L T T I F G L L F T S
7901 GTAAAAAGCA TAAAAAAGAT TAGTGTAGAT AGCTATACCA AAGGGAGTTA *dsrLS*
K K H K K D *
7951 ACATAACATC GATTATTTAG ATATGAACTT ATTTAGGGAC TATAATTAAC
8001 AAATCGCCCC TCAAAAACAT TGAAAGAATA GCCCCAATA TCTATAATGT
8051 AGATATTGGG GGCTATTAT ATGTTTATAC AATTTATAGT CCCTTGATAA
8101 GGACCCTATT TATATTATT CTGCTTCAAT AATTTTATA TCTTTTTCAT *orf2*
* I I E A E I I K I D K E
8151 AATCTCTTTC TGAATAATTC TGTTCAAATC CCCTTAATAA CTCTGAATTT *orf2*
Y D R E S Y N Q E F G R L L E S N
8201 AGTTTCTTAG CTGACATTC CATTCCAATC ATAGTTATAC TTCCCGAAGT *orf2*
L K K A S M E M G I M T I S G S T
8251 AACCCACCA ACGACTGGAA CAATTTTCGC AATTCAGAG GCTAGTCCCT *orf2*
V G G V V P V I K A I G S A L G
8301 TTTTGGTTAG TGTTTTGTCA GCAACTATCC TAGTTATTTT TTTAATAAT *orf2*
K K T L T K D A V I R T I K K L L
8351 GGGTACCACA AAGTTTTTCAT TAAGGGTTTC CCTAATATTT GTTTAGAAGC *orf2*
P Y W L T K M L P K G L I Q K S A
8401 ATACTTTTATA GCATTAGAAC TTGACACCCG CAACAAAGAA GCTGATCCAT *orf2*
Y K I A N S S S V R L L S A S G
8451 TTACTIONT CATTGTTTCT AAAAATAATA ACAATCCATT TGTTTGAATT *orf2*
N V G A M T G L F L L L G N T Q I
8501 TTCCATCTT CTTCGATCAA ATCATCAAAA TCATATATAT AGGCTAATTG *orf2*
K G D E E I L D D F D Y I Y A L Q
8551 TTGAGCCAAT CTGATGGAGT AAACCATGTT TTGAATAATA TCGCCGGTTA *orf2*
Q A L R I S Y V M N Q I I D G T
8601 TTGTCCCTGC TATTGCAATT CCCCCGGGAA TTCCAGTAAG AAAAGAAATA *orf2*
I T G A I A I G G P I G T L F S I
8651 ACAGTAGTAT TTCTTACCGT TGCTGTAATT TGTTTTTGTG CAACTTTTTT *orf2*
V T T N R V T A T I Q K Q A V K K
8701 TCTTCTTTT AAGGAAATAT CTAAGTGCCC ATTGATAATA TCTGATTCTG *orf2*
R E K L S I D L H G N I I D S E
8751 TTACTIONT TACTTTTGTCT AAATATTCAG ATCTGTTAAC ATGTGCAATT *orf2*
T V K F V K A L Y E S R N V H A I
8801 GGATTTTCAA CACTAATTT TAAGAGTGAG CGAAAATCAT GATTGGTGAT *orf2*
P N E V V L K L L S R F D H N T I
8851 TGCTTCTAAC ATTTTATTAT TATTTAATGA TTGCTTACCT GAATCCATTA *orf2*
A E L M K N N N L S Q K G S D M
8901 TTCTAGCTC CTTAGCATTG GTAGTTTTTA ATTATATTAC CGGCATAAAT *orf3*
* I V P M F

8951 TGAATGGTTA ATCGCTGATT AGTTGCCTGA GCAATCTCAG ATAATACCCT
Q I T L R Q N T A Q A I E S L V R orf3
9001 AGTCGAAGCA TTCATCGATC CATTTCATCAAT CCTAGCAATG GTTGATTGTG
T S A N M S G N E I R A I T S Q orf3
9051 GTTTGCCAAT TAGACTAGCA AATGCACGTT GACTCATAAC CATATTTTCA
P K G I L S A F A R Q S M G M N E orf3
9101 CGGAGATCAC GGACTTTAAC TGCTACCTCT AAATTGATGT TTTCTTGTTT
R L D R V K V A V E L N I N E Q E orf3
9151 AACGAGTTTT GCAAAATCAG GATTGTTTTT ACTTCTTTCA GTAACATATG
V L K A F D P N N K S R E T V Y orf3
9201 CGTCAATTTT ACTCATTGTT GGTCCCTCCTT GTTAAAATAC TTGCTGCGTC ←
A D I K S M orf3
* Q Q D E K N F Y K S R orf4
9251 GATTCCGAGC AATTTTCTTT TCACTTTCTG GTGTTTTTTG CGTTTTCTTT
R N R A I K K E S E P T K Q T K K orf4
9301 GTGAATGCAT TGGTGATTAA GTACTGAGAT CCTTGTAAGT GGAAATAGAT
T F A N T I L Y Q S G Q V Q F Y I orf4
9351 AGCTCTCTGA ATATTTGAAG CTCTCTTAGA ACGAATCTCA TAGAGATTGT
A R Q I N S A R K S R I E Y L N orf4
9401 TTTCTAGCTT TTTGACCCAT AATTGACGTT CTGCGATGAT TAGACCGTTA
N E L K K V W L Q R E A I I L G N orf4
9451 TTTTCAATAT TTTGAATGGT CGCAATTAAT TTGGCAGCGT CTTTATCAGG
N E I N Q I T A I L K A A D K D P orf4
9501 TAATTGATCC AAAAATTGTT TAAATTCATT CCAGTCATAA TAGTCAAATT
L Q D L F Q K F E N W D Y Y D F orf4
9551 CCATTTTTTT CATATTCACA TGATAGCTTA TTGGCTATCA AAAAGCAAAC ←
E M K K M orf4
9601 AAATATGTTA TTACACAAAT CCTTGGTACA AGCGGAAGTG TGAAATTCAT
9651 ATTTCCGCTT GTACCAAGGG ATTACGTCTC CACCAACGAG GTGATTTTTA
9701 TATGCATCAA ATGTGCCTAC CAATCAAAGA TTCGAATGTA CTTAATGATG
M H Q I V L P I K D S N V L N D V orf5
9751 TTCAAGATAC TTTACTCAAT AACTTTAAAG CTGGCCGGCG TAACTATACA
Q D T L L N N F K A G R R N Y T orf5
9801 GTTTTTCAAG TTGGCAAGGC GACACTATTG CGAGTCAGTG ATGTCATGCG
V F Q V G K A T L L R V S D V M R orf5
9851 CTTGAAACAG ACCGATATTT TTAATCCGGA CGGTTCTATT AAACAAAATG
L K Q T D I F N P D G S I K Q N A orf5
9901 CGTTCATTCA CGATCGAAAA ACAGGTAAAC CTAATACCTT GTACCTCAAA
F I H D R K T G K P N T L Y L K orf5
9951 CCAGTTCAAA CAGAGCTCTT ATTGTATCGC CAATGGCTAC TTAATCATCA
P V Q T E L L L Y R Q W L L N H Q orf5
10001 GCTAGATTCT GAATGGCTCT TTCCGTCAT TCAACACCCA GAACGCATA
L D S E W L F P S I Q H P E R H I orf5
10051 TTACGGAAAA ACAGTTCTAT AAAATCATGA GCAAAGTCGG CGATCTTTTA
T E K Q F Y K I M S K V G D L L orf5
10101 AGCATTAAAT ACCTTGGTAC CCACACTATG CGCAAACTG GGGCTTATCG
S I N Y L G T H T M R K T G A Y R orf5
10151 CGTTTATACG CAATCCAATT ACAATATTGG CTTAGTCATG CACTTATTA
V Y T Q S N Y N I G L V M H L L N orf5
* A S I L orf6

10201 ATCATTCAAG TGAAGCCATG ACTTTAGCTT ATTTAGGCTT AGACCAAGCC *orf5*
H S S E A M T L A Y L G L D Q A *orf6*
D N L H L W S K L K N L S L G L

10251 AGTACCGAAA GTATGTTAGA TCAAATGAT TTTGGTAGT TTTATTTGGA *orf5*
S T E S M L D Q I D F G * *orf6*
W Y R F Y T L D F Q N Q N T K N P

10301 TTTTATGTTG TTGCCGAAGG CGACTTCTGA TACAGGAAAT TTAGCACAAA *orf6*
N K T T A S P S K Q Y L F N L V F

10351 CACCAGCAAT TTTAATTGTG GTGTGTAAGT GCGCATTGAC CTCGTTTCAC *orf6*
V L L K L Q P T Y T R M S R T E

10401 TCGGTCTGCT GATAACCATA AAATCAATTT CTGCTATTGT TGAATTGACT ← *orf6*
S P R S I V M

10451 ATATTTTTAA TTCAATTTAT GTTTGCACCT AACTAAGATT GTTATGTTTT

10501 AAATATTTAA AAAGTGTTC AGATTACGCT GTTTTAAGCC AAAATTTTTT

10551 AATTGCTTTG TGCAGAGAAT TTTTATAAGT TTGGTAACAA ATTTTGAATA

10601 ACGGTGTTGT AAGATCTATA AATTTAAACT GAAATCATT TTTTGATGTT *orf7*
M L →

10651 AGGAGTCATT AAGATTGACG AAAAGAAAGT ATTAAAACCA ATTAATGAAA *orf7*
G V I K I D E K K V L K P I N E M

10701 TGCTTGCTGA TCCTTGGCAA ATTGATATTC AAGAATTGTT TGAAGCTTCT *orf7*
L A D P W Q I D I Q E L F E A S

10751 GTCAATGAAC CTGACGAGAT TAAAAAGAAT TTGTATGATT CCTTATACAC *orf7*
V N E P D E I K K N L Y D S L Y T

10801 TTATATTTTG CAAAAAAGAC AATAAGATAT TATTAATCGT CCTGGCTTCG *orf7*
Y I L Q K R Q *

10851 TTATTTAGCC TCTAAGAGCC TGTTGAGGGC TTTTATTTT GCTTTGGTAT

10901 AAATATATAT AACAGTCTC AAAACCGCTA AAAACGAAAA ATAAGCCCT

10951 TAAAAACGAA TATAGCAGTT AGATCCTTGT CAAGATTCAA AAAAACTGA

11001 CTGTTTGTG TCAATAGTGG CGGACAATCA ATGCGTGGGA GCATAGTGAC

11051 TTGAATTTAA TGTGAACCGA TTTTGTAGTC GCTCCTTTGT GTTTTATTAT

11101 TGAGGTTTGG CTCTGTACA GTAGTA

ANEXO II

ANEXO II. Alineamientos

II.I. Alineamiento múltiple (CLUSTALX 2.1) de 14 secuencias de nucleótidos de genes que codifican dextransacarasas de cepas de *Lc. mesenteroides* depositadas en el banco de datos GenBank. Se indican los nucleótidos idénticos en todas las secuencias (*). Además, en gris se señalan los nucleótidos utilizados para el diseño de los oligonucleótidos *dsrF* y *dsrR*. También se muestran las secuencias de los amplicones, que contiene parte de la secuencia de *dsrLM* y *dsrLS*, obtenidos utilizando preparaciones de DNA genómico de *Lc. mesenteroides* RTF10 y de *Lb. sakei* MN1, respectivamente.

DEX	GTCTATTATGGCGATTTATATACAGATGATGGTCAATATATGGCAACAAAGTCACCATAC	2478
dsrD	GTCTATTATGGCGATTTATATACAGATGATGGTCAATATATGGCAACAAAGTCACCATAC	2748
dexYG	GTCTATTATGGCGATTTATATACAGATGATGGTCAATATATGGCAACAAAGTCACCATAC	2250
dsrX	GTCTATTATGGCGATTTATATACAGATGATGGTCAATATATGGCAACAAAGTCACCATAC	2235
dsrB	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	2894
dsrb742	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	2893
dsrBCB4	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	2783
dsrC	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	2913
dsrb742cb	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	2888
dsrR	GTTTATTATGGTGAATTTATACACCGATGATGGTCAATATATGGCAATAAGTCCCCTTAT	1662
dsrP	GTGACTATGGTGAATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGTCACTTTAT	3093
dsrT	GTGACTATGGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGTCACTTTAT	3219
U38181	GTTTATTATGGGGATATGTTCACGGATGATGGCCAATACATGGCTAAACAATCACCTTAC	2388
dsrE	GTTTATTATGGTGAATTTATTCATGATGGACAGTATATGTACAGAAAGTCACCATAC	2743
dsrLM	GATGATGGTCAATATATGGCAACAAAGTCACCATAC	36
dsrLS	GATGATGGTCAATATATGGCAACTAAGTCACCATAT	36
	***** ** ** ** **	** ** *
DEX	TATGATGCGATTAACACTTTGCTAAAGGCTAGAGTTCAGTATGTTGCTGGTGGCCAATCG	2538
dsrD	TATGATGCGATTAACACTTTGCTGAAGGCTAGAGTCCAATATGTTGCTGGTGGCCAATCG	2808
dexYG	TATGATGCGATTAACACTTTGCTGAAAGCTAGAGTTCAGTATGTTGCTGGTGGCCAATCG	2310
dsrX	TATGATGCGATTAACACTTTGCTGAAAGCTAGAGTTCAGTATGTTGCTGGTGGCCAATCG	2295
dsrB	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	2954
dsrb742	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	2953
dsrBCB4	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	2843
dsrC	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	2973
dsrb742cb	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	2948
dsrR	TTTGATGCCATCAACGGCTTGCTAAAGTCACGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAGTCA	1722
dsrP	TACGATGCAATTGATACTTTGCTGAAAGTCTCGTATCAAGTATGTTTCTGGCGGGCAAACA	3153
dsrT	TACGATGCAATTGATACTTTGCTGAAAGTCTCGTATCAAGTATGTTTCTGGCGGGCAAACA	3279
U38181	TATCAAGCGATTGATGCGTTGTTGAAAGCTCGTATCAAGTATGCTGCTGGTGGTCAAACC	2448
dsrE	TATGACGCCATTACGTCACTTTTGAAGCCGTATCAAATATGTTGCTGGTGGTCAAAGT	2803
dsrLM	TATGATGCGATTAACACTTTGCTAAAGGCTAGAGTTCAGTATGTTGCTGGTGGCCAATCG	96
dsrLS	TACGATGCCATCTCAGCGTTGTTGAAAGCCCGTATTAAGTATGTTGGTGGTGGACAACCC	96
	* * * * *	* * * * * * * * * * * * * *
DEX	ATGTCCGT---TGATAGTAATGAC-----	2559
dsrD	ATGTCCGT---TGATAGTAATGAC-----	2829
dexYG	ATGTCCGT---TGGTAGTAATGAC-----	2331
dsrX	ATGTCCGT---TGATAGTAATGAC-----	2316
dsrB	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	2975
dsrb742	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	2974
dsrBCB4	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	2864
dsrC	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	2994
dsrb742cb	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	2969
dsrR	ATGGCTGT---TGATCAAACGAT-----	1743
dsrP	ATGTCTATGAAATATATGCAAGGTGATAGTAGTATGGC-----TGCTGACAGTTATAGA	3207
dsrT	ATGTCTATGAAATATATGCAAGGTGATAGTAGTATGGC-----TGCTGACAGTTATAGA	3333
U38181	ATGAAAATGAACTATTTCCAGATG-----AACAA	2478
dsrE	ATGAAATGACGTACTTGATGAGTGGCTTTGATCCAGCAAAAATGAGACAAAGCCACAA	2863
dsrLM	ATGTCCGT---TGATAGTAATGAC-----	117
dsrLS	ATGGCTGT---AGATAAACACGAT-----	117
	*** *	*

DEX ---GTGTTAACAAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACAGCTTCTGACACTGGAACA 2616
 dsrD ---GTGTTAACAAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACGGCTTCTGACACTGGAACA 2886
 dexYG ---GTGTTAACAAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACAGCTTCTGACACTGGAACA 2388
 dsrX ---GTGTTAACAAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACAGCTTCTGACACTGGAACA 2373
 dsrB ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 3032
 dsrb742 ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 3031
 dsrBCB4 ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 2921
 dsrC ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 3051
 dsrb742cb ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 3026
 dsrR ---ATCCTGACAAATGTTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGAGTGTGACAGATAGCGGTAAT 1800
 dsrP GGCATTTTGACATCAGTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGACTGCTACCGATGCAGGGACA 3267
 dsrT GGCATTTTGACATCAGTTCGTTATGGTAAAGGTGCCATGACTGCTACCGATGCAGGGACA 3393
 U38181 TCTGTTATGACATCAGTTCGTTATGGTAAAGGTGCCAATGACGGCAAGTACTCTGGTAAC 2538
 dsrE GGTGCTTAAACATCAGTACGTTACGGTAAAGGTGCGATGACGGCTGACGATTTGGGTAAT 2923
 dsrLM ---GTGTTAACAAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACAGCTTCTGACACTGGAACA 174
 dsrLS ---ATCTTAAACATCAGTTCGTTTGGTGATGGGATCATGAATGCATCTGATAAGGGTAGC 174
 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DEX TCTGAGACGCGTACTGAAGGTATTGGAGTCATCGTCAGCAATAACGCGGAGCTACAATTA 2676
 dsrD TCTGAGACGCGTACTGAAGGTATTGGGGTCATCGTCAGCAACAACGCGGAGCTACAATTA 2946
 dexYG TCTGAGACGCGTACTGAAGGTATTGGAGTCATCGTCAGCAACAACGCGGAGCTACAATTA 2448
 dsrX TCTGAGACGCGTACTGAAGGTATTGGAGTCATCGTCAGCAACAACGCGGAGCTACAATTA 2433
 dsrB GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 3092
 dsrb742 GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 3091
 dsrBCB4 GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 2981
 dsrC GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 3111
 dsrb742cb GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 3086
 dsrR GCAGACACACGAACACAAGGTATTGGTGTGATTGTCAGTAATAAAGAAAAATCTGGCCTTA 1860
 dsrP AATGAAACACGTACGCATGTTTGCAGTAATTGAAAGTAATAACCCAGATTTGAAGTTG 3327
 dsrT AATGAAACACGTACGCATGTTTGCAGTAATTGAAAGTAATAACCCAGATTTGAAGTTG 3453
 U38181 CAAGAGACACGCTATCAAGGTATTGGACTTGTGTCAACAATCGCCAGATTTGAAACTA 2598
 dsrE AGTGACACACGCTCAACAAGGTATTGGTTTGGTGATTAATAAAGCCATTCTTGAATTTA 2983
 dsrLM TCTGAGACGCGTACTGAAGGTATTGGAGTCATCGTCAGCAATAACGCGGAGCTACAATTA 234
 dsrLS ACGACGCGCCGTACCCAAGGAATTGGCGTGATTGTCAGCAATAATGATGCGTTAGCGTTG 234
 * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DEX GAGGATGGGCATACATGTCACATTGCATATGGGGGAGCTCATAAGAACCAGCTTATCGT 2736
 dsrD GAGGATGGGCATACATGTCACATTGCATATGGGGGAGCTCATAAGAACCAGCTTATCGT 3006
 dexYG GAGGATGGGCATAGTGTACATTTGCATATGGGGGAGCTCATAAGAACCAGCTTATCGT 2508
 dsrX GAGGATGGGCATAGTGTACATTTGCATATGGGGGAGCTCATAAGAACCAGCTTATCGT 2493
 dsrB AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 3152
 dsrb742 AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 3151
 dsrBCB4 AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 3041
 dsrC AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 3171
 dsrb742cb AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 3146
 dsrR AAATCAGGGGACACGGTGACATTACACATGGGTGCCGCTCACAAAAATCAAGCATTGAGA 1920
 dsrP AGCAGTACAGATCAAGTAGTTGTAGATATGGGCATAGCGCACAAAAACCAGGCTTATCGT 3387
 dsrT AGCAGTACAGATCAAGTAGTTGTAGATATGGGCATAGCGCACAAAAACCAGGCTTATCGT 3513
 U38181 TCTGACAAAGATGAAGTCAAAATGGATATGGGTGCCGACATAAAAACCAAGATTATCGC 2658
 dsrE AATGATGATGAACAAATTTGCTCAATATGGGTGCTGCTCACAAAAATCAAGCTTACCGA 3043
 dsrLM GAGGATGGGCATACATGTCACATTGCATATGGGGGAGCTCATAAGAACCAGCTTATCGT 294
 dsrLS AAGGG---AGACACTGTGACCCCTTACATATGGGTATCGCTCACGCCAACCCAGGATCCGT 291
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

DEX GCTTTGTTATCAACAACACTGCAGATGGATTAGCTTATTATG---ATACTGATGAAAATGCA 2793
 dsrD GCTTTGTTATCAACAACACTGCAGATGGATTAGCTTATTATG---ATACTGATGAAAATGCA 3063
 dexYG GCTTTGTTATCAACAACACTGCAGATGGATTAGCTTATTATG---ATACTGATGAAAATGCA 2565
 dsrX GCTTTGTTATCAACAACACTGCAGATGGATTAGCTTATTATG---ATACTGATGAAAATGCA 2550
 dsrB TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 3206
 dsrb742 TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 3205
 dsrBCB4 TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 3095
 dsrC TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 3225
 dsrb742cb TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 3200
 dsrR TTATTATTAGGGACAACACTGCTGACAATTTGTCTTATTATG---ATAAT---GACAACGCC 1974
 dsrP CCTGCTTTGTTAACAACTAAAGATGGCATAGATACTTATGTATCTGATAGTGTATCTCA 3447
 dsrT CCTGCTTTGTTAACAACTAAAGATGGCATAGATACTTATGTATCTGATAGTGTATCTCA 3573
 U38181 CCAGTTTGTGACGACAAAAATCAGGATTTAAAGTCTACA---GCACTGATGCAAAATGCA 2715
 dsrE CCACTTATGTTGACAAACAAAATCTGGCTTCAAAATTTACG---ATAAGGATGCGGAGCG 3100
 dsrLM GCTTTGTTATCAACAACACTGCAGATGGATTAGCTTATTATG---ATACTGATGAAAATGCA 351
 dsrLS GCTTTGTTGTTAACGACGACAGATGGACTAATGAAATACACGTCCGATAATGG---CGCG 348
 * * * * * * * * * * * *

DEX CCTG-----TGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATT 2847
 dsrD CCTG-----TGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATT 3117
 dexYG CCTG-----TGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATT 2619
 dsrX CCTG-----TGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATT 2604
 dsrB CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 3260
 dsrb742 CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 3259
 dsrBCB4 CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 3149
 dsrC CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 3279
 dsrb742cb CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 3254
 dsrR CCAG-----TAAAGTACACCAATGATCAGGGCGATTTAATTTTTGATAAATACTGAAATC 2028
 dsrP CAAAGCTTGATAAAGATATACAAAATAGTAATGGGCAACTTATTTCAATAGTTCAGATATT 3507
 dsrT CAAAGCTTAAATAAGATATACAAAATAGTAATGGGCAACTTATTTCAATAGTTCAGATATT 3633
 U38181 CCTG-----TCGTTCGAACTGACGCCAATGGCCAAATTAACCTTTAAGGCAGACATGGTA 2769
 dsrE CCAG-----TTGTTTATACTAACGATGCTGGTCAACTTATTTTTAAGTCAGATATGGTC 3154
 dsrLM CCTG-----TGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATT 405
 dsrLS CCAA-----TTCGCTATACGGATGCAAAATGGTGACTTGATTTTCACTAGCGCAGACATT 402
 * * ** * ** * * * * *

DEX TATGGTGTACAAAATCCACAAG-TTTCTGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGC 2906
 dsrD TATGGTGTACAAAATCCACAAG-TTTCTGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGC 3176
 dexYG TATGGTGTACAAAATCCACAAG-TTTCTGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGC 2678
 dsrX TATGGTGTACAAAATCCACAAG-TTTCTGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGC 2663
 dsrB TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 3319
 dsrb742 TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 3318
 dsrBCB4 TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 3208
 dsrC TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 3338
 dsrb742cb TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 3313
 dsrR TATGGTGTCCGTAACCCGCAAG-TCTCTGGCTTCTTAGCTGTTTTGGGTGCCTGTTGGGGC 2087
 dsrP GTTGGTACAGCAAAATCCACAAG-CTTCTGGATACTTGGCGGTCTGGGTACCCGTTGGTGC 3566
 dsrT GTTGGTACAGCAAAATCCACAAG-CTTCTGGATACTTGGCGGTCTGGGTACCCGTTGGTGC 3692
 U38181 TATGGTGTAAACGACCCACAAG-TGTCTGGGTACATTGCGGCTTGGGTACCCAGTAGGGGC 2828
 dsrE TATGGTGTACAGCAATCCACAAG-TATCTGGTTATTTGCTGCATGGGTACCCAGTCCGGTGC 3213
 dsrLM TATGGTGTACAAAATCCACAAG-TTTCTGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGC 464
 dsrLS -AAGGGATACAAAACGTTGAGGTATCCGGATTCTTGTCAAGTGTGGGTACCCAGTCCGGTGC 461
 ** * * ** * * * * *

DEX GCAACAAGATCAAGATGCACGAACGGCCTCTGATACAACAACAACACAGAGTGATAAAGT 2966
 dsrD GCAACAAGATCAAGATGCACGAACGGCCTCTGATACAACAACAACACAGAGTGATAAAGT 3236
 dexYG GCAACAAGATCAAGATGCACGAACGGCCTCTGATACAACAACAACACAGAGTGATAAAGT 2738
 dsrX GCAACAAGATCAAGATGCACGAACGGCCTCTGATACAACAACAACACAGAGTGATAAAGT 2723
 dsrB TGACAGCCATCAAGACGCGCGTACTTTGTCTGACGACACAGCCCATCATGATGGCAAAAAC 3379
 dsrb742 TGACAGCCATCAAGACGCGCGTACTTTGTCTGACGACACAGCCCATCATGATGGCAAAAAC 3378
 dsrBCB4 TGACAGCCATCAAGACGCGCGTACTTTGTCTGACGACACAGCCCATCATGATGGCAAAAAC 3398
 dsrC TGACAGCCATCAAGACGCGCGTACTTTGTCTGACGACACAGCCCATCATGATGGCAAAAAC 3373
 dsrb742cb TGACAGCCATCAAGACGCGCGTACTTTGTCTGACGACACAGCCCATCATGATGGCAAAAAC 2147
 dsrR TTCCAGTACTCAAGATGCGCGCAACTGAAAGTAGTACAGCAACAACACTACTGATGGCAAAAAC 3626
 dsrP TTCCAGTACTCAAGATGCGCGCAACTGAAAGTAGTACAGCAACAACACTACTGATGGCAAAAAC 3752
 dsrT TTCCAGTACTCAAGATGCGCGCAACTGAAAGTAGTACAGCAACAACACTACTGATGGCAAAAAC 2888
 U38181 GAGTGATAGTCAAGATGCTAGAACCAAAAGCAGCCAGTCAAGAACTAAGGATGGCGATGT 3273
 dsrE GCAACAAGATCAAGATGCACGAACGGCCTCTGATACAACAACAACACAGAGTGATAAAGT 524
 dsrLM ATCCGACACACAGGATGCGCGCAACAGGGTCTAGCGCTGCAAAACAACACTGGTGACAC 521
 ** * * * * *

DEX GTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAGTCACTACGAAGGTTTCTCAAACCTTCCA 3026
 dsrD GTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAGTCACTACGAAGGTTTCTCAAACCTTCCA 3296
 dexYG GTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAGTCACTACGAAGGTTTCTCAAACCTTCCA 2798
 dsrX GTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAGTCACTACGAAGGTTTCTCAAACCTTCCA 2783
 dsrB CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 3439
 dsrb742 CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 3438
 dsrBCB4 CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 3328
 dsrC CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 3458
 dsrb742cb CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 3433
 dsrR CTTCCACTCAAATGCTGCTTTAGATTCTCAGGTTATTTACGAAGGTTTTTCAAATTTCCA 2207
 dsrP ATTGCATTCAAATGCCGCACTTGATTCTCAAGTTATTTATGAAAGTTTCTCTAACTTCCA 3686
 dsrT ATTGCATTCAAATGCCGCACTTGATTCTCAAGTTATTTATGAAAGTTTCTCTAACTTCCA 3812
 U38181 TTATCATTCAAATGCCGCACTTGATTCTCAAGTTATTTATGAAAGTTTCTCTAACTTCCA 2948
 dsrE TTATCATTCAAATGCTGCTTTAGATTCTAATGTGATTTATGAAAGGCTTCTCGAAATTTCCA 3333
 dsrLM GTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAGTCACTACGAAGGTTTCTCAAACCTTCCA 584
 dsrLS CTTACATTCAAATGCAGCATTGGACTCAAATGTGATTTATGAAAGGTTTTTCTAACTTCCA 581
 * ** * * * * *

DEX AGCATTTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAAACGTAGTCATCGCTCAGAATGCGGACCA 3086
dsrD AGCATTTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAAACGTAGTCATCGCTCAGAATGCGGACCA 3356
dexYG AGCATTTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAAACGTAGTCATCGCTCAGAATGCGGACCA 2858
dsrX AGCATTTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAAACGTAGTCATCGCTCAGAATGCGGACCA 2843
dsrB AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 3499
dsrb742 AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 3498
dsrBCB4 AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 3388
dsrC AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 3518
dsrb742cb AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 3493
dsrR AGCTTTTGCCACAAACACTGAAGACTATACAAAATGCTGTCATTGCAAAAAATGGTCAGTT 2267
dsrP ATCGACACCAACCACAGAAGCCGAATATGCTAATGTGCAAATTGCAAAACAATACTGATTT 3746
dsrT ATCTACACCAACAACAGAAGCTGAATATGCTAATGTGCAAATTGCAAAACAATACTGATTT 3872
U38181 AGACTTTTCCAAACACCCGATGAGTTTACGAACATTAATAATTGCTCAAAAATGTTAACTT 3008
dsrE AGCAATGCCTGAAAAGAATGATGACTTCACCAACGTAATAATTGCTCAAAAATGCTAAATT 3393
dsrLM AGCATTTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAAACGTAGTCATCGCTCAGAATGCGGACCA 644
dsrLS AGAGATGCCAACCAACCACGATGAGTTTACAAAACGTAAGAATCGCTCAAAAATGCTGATTT 641
* * ** * ** ** * * *

DEX ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3146
dsrD ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3416
dexYG ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 2918
dsrX ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 2903
dsrB ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3559
dsrb742 ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3558
dsrBCB4 ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3448
dsrC ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3578
dsrb742cb ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3553
dsrR ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 2327
dsrP ATACAAGAGTTGGGGAATTACGAAGCTTCCAGTTTCCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3806
dsrT ATACAAGAGTTGGGGAATTACGAAGCTTCCAGTTTCCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3932
U38181 ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3068
dsrE GTTTAAAGATTTAGGGATTACAAGCTTTGAATTAGCACCACAATATCGTTCAAGTACAGA 3453
dsrLM ATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAG 698
dsrLS GTTTAAGTATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACAATATCGTTCAAG 695
* ** * ** * ** * ** * * * ** * **

II.II. Alineamiento múltiple (CLUSTALX 2.1) de las secuencias de aminoácidos de los genes que codifican las dextransacarinas de *Lb. sakei* MN1, *Lb. curvatus* 1624, *Lb. sakei* Kg15 y *Lb. reuteri* 180. Se indican los aminoácidos idénticos en todas las secuencias (*), la conservación entre grupos de aminoácidos con propiedades muy similares (:) y la conservación entre grupos de aminoácidos con propiedades con baja similitud (.)

Lb. sakei MN1 MLRNNYFGETKTHYKLYKCGKNWAVMGISLFLPLGLGMLVT-----SQPVSADVTAT 51
Lb. curvatus 1624 MLRNNYFGETKTHYKLYKCGKNWAVMGISLFLPLGLGMLVT-----SQPVSADVTAT 51
Lb. sakei Kg15 MLRNNYFGETKTHYKLYKCGKNWAVMGISLFLPLGLGMLVT-----SQPVSADVTAT 51
Lb. reuteri 180 -----MEIKKHKFLYKSGKQVWTAAVATVAVSTALLYGGVAHADQQVQSSTTQEQTST 53
* * . * : * * * * . * * : * . . : . . : . . : * * * : * : *

Lb. sakei MN1 STSSSAVRTDAISESSSSAAKAETTSASSSSAVKAETTSASSSSAAKAETAAITTAGVAN 111
Lb. curvatus 1624 STSSSAVRTDAISESSSSAAKAETTSASSSSAVKAETTSASSSSAAKAETAAITTAGVAN 111
Lb. sakei Kg15 STSSSAVRTDAIS-----ASSSSAAKAETAAITTAGVAN 85
Lb. reuteri 180 VNADTTKTVNLDTNTDQPAQT'TDKNQVANDTTTNQSKTDSTSTTVKNPFIIPVSTLSSSD 113
. : . : . : : : : : : : : : : : : : . : : * . . :

Lb. sakei MN1 ADSQTSAEVTADSTSTSQVVTNNSNNQ-----NNTAQPAGQEAAPVSEDTSDDSE 162
Lb. curvatus 1624 ADSQTSAEVTADSTSTSQVVTNNSNNQ-----NNTAQPAGQEAAPVSEDTSDDSE 162
Lb. sakei Kg15 ADSQTSAEVTADSTSTSQVVTNNSNNQ-----NNTAQPAGQEAAPVSEDTSDDSE 136
Lb. reuteri 180 NEKQSQNYNKPDPNGNYGNVDAAYFNNQLHISGWHPATNASQGTDSRQVIVRDIRITTKTELG 173
: . * : . . * . . : * : ** : * : * : . . . : * : * : :

Lb. sakei MN1 RTTPT----- 167
Lb. curvatus 1624 RTTPT----- 167
Lb. sakei Kg15 RTTPT----- 141
Lb. reuteri 180 RTNVTNNVLRPDVKNVHNVYNADNSGFVNIINIDFSKMKDYRDSIEIVSRYSNGKSVSDW 233
** . *

Lb. sakei MN1 -----
Lb. curvatus 1624 -----
Lb. sakei Kg15 -----
Lb. reuteri 180 WSQPITFDKNYAYLDTFEVKNGELHATGWNATNKAINYNHFFVILFDRINGKEVTRQEV 293

Lb. sakei MN1 -----
Lb. curvatus 1624 -----
Lb. sakei Kg15 -----
Lb. reuteri 180 RDGQSRPDVAKVYPQVVGANNSGFDVTFNIGLDLYTHQYQILSRYSNADNGEGDYVTTYWF 353

Lb. sakei MN1 -----VANNDKPAIDSVDTSQPATAAPK-----ADTDVSTL 198
Lb. curvatus 1624 -----VANNDKPAIDSVDTSQPATAAPK-----ADTDVSTL 198
Lb. sakei Kg15 -----VANNDKPAIDSVDTSQPATAAPK-----ADTDVSTL 172
Lb. reuteri 180 APQSIAPANQSNQGYLDSFDISKNGEVTVTGWNATDLSLQTNHYVILFDQTAGQQVASA 413
. :. :. : * : * : * : . : . : . * . : . : .

Lb. sakei MN1 QVDATTKTDSDIKEDTPTDKTTDTKTVQLTTVEGTSKQVVTTPKEESSTDKSSSVVSKQT 258
Lb. curvatus 1624 QVDATTKTDSDIKEDTPTDKTTDTKTVQLTTVEGTSKQVVTTPKEESSTDKSSSVVSKQT 258
Lb. sakei Kg15 QVDATTKTDSDIKEDTPTDKTTDTKTVQLTTVEGTSKQVVTTPKEESSTDKSSSVVSKQT 232
Lb. reuteri 180 KVDLISRDPDAKAYPTVKAETSGFKVTFKVSNLQPGHQYSVVSFRFSADENGNNGDKRHT 473
: * * : . : * * . * . * . : . : . : . : * : : . . . : . : *

Lb. sakei MN1 DKTSLPTVATATATTVSKIPSVTG-----DYQFDEKTKTYT 294
Lb. curvatus 1624 DKTSLPTVATATATTVSKIPSVTG-----DYQFDEKTKTYT 294
Lb. sakei Kg15 DKTSLPTVATATATTVSKIPSVTG-----DYQFDEKTKTYT 268
Lb. reuteri 180 DYWYSPVTLNQTASNIDITIMTNSGLHITGWMASDNSINEATPYAIIILNNGREVTRKQLT 533
* * . . . * : : . . . : . : . : . : . : . : . : *

Lb. sakei MN1 FTGKDGHPVTGLVYANNILQYFDETGHVQKQYVVIAGHVYVYFDPASGAAQTGVN----- 349
Lb. curvatus 1624 FTGKDGHPVTGLVYANNILQYFDETGHVQKQYVVIAGHVYVYFDPASGAAQTGVN----- 349
Lb. sakei Kg15 FTGKDGHPVTGLVYANNILQYFDETGHVQKQYVVIAGHVYVYFDPASGAAQTGVN----- 323
Lb. reuteri 180 LIARPDVAAVYPSLYNSAVSGFDTTIKLTAQYQALNGQLQVLLRFSKAVDGNPNGTNTV 593
: . : * . : . * * * : . : * * : : * : : : * * . : . *

Lb. sakei MN1 -----QIDGKMGVFK----- 359
Lb. curvatus 1624 -----QIDGKMGVFK----- 359
Lb. sakei Kg15 -----QIDGKMGVFK----- 333
Lb. reuteri 180 TDQFSKNYATTGNGFDYVKNVNGQIEFSGWHATNQSNDKNSQWIIIVLVNGKEVKRQLVND 653
: : : : : * .

Lb. sakei MN1 -----SDGSQITSGFNSDNAG----- 375
Lb. curvatus 1624 -----SDGSQITSGFNSDNAG----- 375
Lb. sakei Kg15 -----SDGSQITSGFNSDNAG----- 349
Lb. reuteri 180 TKDGAAGFNRNDVYKVNPAIENSIMSGFQGIITLPTVKDENVQLVHRFNSDAKTGEGNY 713
. . . * : . * * * *

Lb. sakei MN1 -----NSYYFDES GMTVGTGRQTIAGKTYFFD-KDGLHRKGYSTIIDNQLYYFDL 423
Lb. curvatus 1624 -----NSYYFDES GMTVGTGRQTIAGKTYFFD-KDGLHRKGYSTIIDNQLYYFDL 423
Lb. sakei Kg15 -----NSYYFDES GMTVGTGRQTIAGKTYFFD-KDGLHRKGYSTIIDNQLYYFDL 397
Lb. reuteri 180 VDFWSEVMSVKDSFQKNGPLNQFGLQTINGQQYYIDPTTGQPRKNFLLQNGNDWIYFDK 773
: * : . : . * * * * : * * * . * : * * : . * : * * *

Lb. sakei MN1 KTGESVSTTTSNFKSGLTSQTDTPHNSAVNMSKDSFTTVDGFLTAESWYVPKDIQTS 483
Lb. curvatus 1624 KTGESVSTTTSNFKSGLTSQTDTPHNSAVNMSKDSFTTVDGFLTAESWYVPKDIQTS 483
Lb. sakei Kg15 KTGESVSTTTSNFKSGLTSQTDTPHNSAVNMSKDSFTTVDGFLTAESWYVPKDIQTS 457
Lb. reuteri 180 DTGAGTNALKLQFDKGTISADEQYRRGNEAYSDDKSIENVNGYLTADTWYRPPKQILKDG 833
. * * . . : . : * . * * * : : * . * . . . : * : * : * * * : * * * . . .

Lb. sakei MN1 TDWRASTPEDFRPIMMTWWPTKQIQAAAYLNHMVSEG--LLSSDKKFSATDDQTLNQA 541
Lb. curvatus 1624 TDWRASTPEDFRPIMMTWWPTKQIQAAAYLNHMVSEG--LLSSDKKFSATDDQTLNQA 541
Lb. sakei Kg15 TDWRASTPEDFRPIMMTWWPTKQIQAAAYLNHMVSEG--LLSSDKKFSATDDQTLNQA 515
Lb. reuteri 180 TTWTDSKETDMRPIILMWWPNTVQTQAYYLNMYKQYGNLLPASLPSFSTADSAELNHYSE 893
* * * . * : * * * : * * * . * * * : * * * . * : * * * : .

Lb. sakei MN1 AVQLQIELKIQQTKSVEWLRTTMHNFIKSQPGYNVTSETPSND--HLQGGALSYINSVLT 599
Lb. curvatus 1624 AVQLQIELKIQQTKSVEWLRTTMHNFIKSQPGYNVTSETPSND--HLQGGALSYINSVLT 599
Lb. sakei Kg15 AVQLQIELKIQQTKSVEWLRTTMHNFIKSQPGYNVTSETPSND--HLQGGALSYINSVLT 573
Lb. reuteri 180 LVQQNIEKRISSETGSDWLRITLMEHFVTKNSMWNKDSENVVYGGQLQGGGFLKYVNSDLT 953
* * : * * : * : * * : * * * * : . : . : * * * . . . : * * * * * * * * *

Lb. sakei MN1 PDANSNFRMLMNRNPTQQDGTRHYNTDTSEGGYELLANDVDNSNPVVQAEQLNWLYFLTH 659
Lb. curvatus 1624 PDANSNFRMLMNRNPTQQDGTRHYNTDTSEGGYELLANDVDNSNPVVQAEQLNWLYFLTH 659
Lb. sakei Kg15 PDANSNFRMLMNRNPTQQDGTRHYNTDTSEGGYELLANDVDNSNPVVQAEQLNWLYFLTH 633
Lb. reuteri 180 KYANSWRLMNRNPTATNIDGK-----NYGGAEFLLANDIDNSNPVVQAEELNWLYYLLMN 1006
* * * : * * * * . * : * * . * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *

Lb. sakei MN1 FGEIVKNDPSANFDSVRVDAVDNVDADLLNITAAAYFRDVGVDKNDLTANQHLSILEDWG 719
Lb. curvatus 1624 FGEIVKNDPSANFDSVRVDAVDNVDADLLNITAAAYFRDVGVDKNDLTANQHLSILEDWG 719
Lb. sakei Kg15 FGEIVKNDPSANFDSVRVDAVDNVDADLLNITAAAYFRDVGVDKNDLTANQHLSILEDWG 693
Lb. reuteri 180 FGTITGNPEANFDDGIRVDAVDNVDVLLSIAARDYFNAAAYNMEQSDASANKHINILEDWG 1066
* * * . * : * * * * : * * * * * * * * * * : * * * . * : . : * * : * * * * : * * * * *


```

DsrLS:      882 SALLKARIKYVAGGQTMVADKHDILTSVRFVGDGIMNASDKGSTTARTQGIGVIVSNNDALAL-KGDTVTL
3HZ3:      1227 TNLLKTRVKYVAGGQTMVADKNGILTNVRFVKGAMNATDTGTDETRTEGIGVVISNNTNLKLNLDGESVVL

DsrLS:      951 HMGIAHANQAYRALLTTTDDGLMKYTSNNGAPIRYTDANGDLIFTS-----ADIKGYQNVEVSGFLS
3HZ3:      1297 HMGAAHKNQYRAVILTTEDGVKNYTNDDAPVAYTDANGDLHFTNTNLDDGQYTAVRGYANPDVDTGYLA

DsrLS:     1013 VVVPVGASDTQDARATGSSAANKTGDTLHSNAALDSNVIYEGFSNFQEMPTTHDEFNTVKIAQNADLFKS
3HZ3:     1367 VVVPAGAADDQDARTAPSDEAHTTKTAYRSNAALDSNVIYEGFSNFYWPPTTESERTNVRIAQNADLFKS

DsrLS:     1083 WGVTSFQLAPQYRSSDDTSFLDSIIKNGYAFTRDYDLGFNTPTKYGDVDDLADAIRAMHSVGIQVMADFV
3HZ3:     1437 WGITTFELAPQYNSSKDGTFLLDSIIDNGYAFTRDYDLGMSTPNKYGSDEDLRNALQALHKAGLQAIADWV

DsrLS:     1153 PDQIYNLPGQEVVAVNRTNNGFTPNQSDLQNLQVYVNSKGGGEYQAKYGGEFLLDLRLEHPDLFTTNQI
3HZ3:     1507 PDQIYNLPGKEAVTVTRSDDHGTTWEVSPKKNVYIITNTIGGGEYQKKYGGEFLLDLQKEYPQLFSQVYP

DsrLS:     1223 STGVPIDGSTKIKESAKYFNGSDIQGKGADYVLKDGASQYEFKITSNANDESFLPKQFMNQ-DAMTGFT
3HZ3:     1577 VTQTTIDPSVKIKESAKYFNGTNIHRGAGYVLRSDNGKYYNLGTSTQ---QFLPSQLSQVQDNEGYGFV

DsrLS:     1292 TDEKGTYYSTSGYQAKQSFIQGDDQYYYFDADGYMVTGSQTIN---GKQYYFLPNGVELREAFQNAS
3HZ3:     1644 KEGNNYHYDENKQMVKDAFIQDSVGNWYLDKNGNMVANQSPVEISSGTYLFLNNGTSFRSGLVKTDA

DsrLS:     1359 GNTVYYGKTGSAVSKYVVDQSGVAYYFDVNGNMVAD
3HZ3:     1717 -GTYYYDGDGRMVRNQTVSDGA-MTYVLDENGLVSE

```

ANEXO III

Título del libro: "Food additives". Capítulo 5 (pp. 83-114).

Editor: El-Samragy, Y.

Editorial: Intech. Croacia.

Año: 2012.

ISBN: 978-953-51-0067-6.

5

Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria

María Laura Werning¹, Sara Notararigo¹, Montserrat Náchter², Pilar Fernández de Palencia¹, Rosa Aznar^{2,3} and Paloma López¹

¹*Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),*

²*Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC),*

³*Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València Spain*

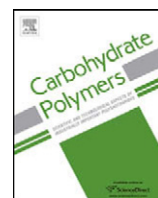
1. Introduction

Polysaccharides have been used traditionally by the food industry for their viscosifying, emulsifying and biothickening properties and more recently for manufacture of functional food due to their prebiotic and immunomodulating properties.

Bacteria can synthesize cytoplasmic storage polysaccharides (e.g. glycogen), cell wall structural polysaccharides such as peptidoglycan, and lipoteichoic acids of gram-positive bacteria, and the lipopolysaccharides anchored in the outer membrane of gram-negative bacteria. In addition, some bacteria can secrete polysaccharide layers on their surface, which together with a few glycoproteins, constitute the glycocalyx. These exocellular polymers comprise the capsular polysaccharides, which form a cohesive layer or capsule covalently linked to the cell surface, and the exopolysaccharides (EPS), which form a slime layer loosely attached to the cell surface or secreted into the environment (Brock, 2008). The physiological role of these molecules are not yet clearly understood, although it is generally recognized that exocellular polysaccharides are not normally used as energy and carbon sources by the producing microorganism. They can serve for a variety of functions including cell recognition and interaction, adherence to surfaces and biofilm formation.

The majority of the polysaccharides used as additives by the food industry such as pectin, cellulose and alginate are obtained from plants and algae. However, other biopolymers like xanthan and gellan, also used as bio-thickeners, are synthesized by gram-negative bacteria. Furthermore, lactic acid bacteria (LAB) producing EPS are used mainly in the dairy industry for improvement of the rheological properties of fermented products as well as for the manufacture of functional food.

The taste/texture benefits of the EPS produced by LAB in fermented foods are well established, because these organisms produce polymers that improve the rheological



Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria

Sara Notararigo^{a,1}, Montserrat Nácher-Vázquez^{b,1}, Idoia Ibarburu^{c,1}, M^a Laura Werning^a, Pilar Fernández de Palencia^a, M^a Teresa Dueñas^c, Rosa Aznar^{b,d}, Paloma López^{a,*}, Alicia Prieto^e

^a Department of Molecular Microbiology and Infection Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), CSIC, Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Spain

^c Department of Applied Chemistry, University of Basque Country (UPV/EHU), Paseo Manuel de Lardizábal 3, 20018 Donostia, Spain

^d Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

^e Department of Environmental Biology, CIB, CSIC, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2011

Received in revised form 26 March 2012

Accepted 4 May 2012

Available online 11 May 2012

Keywords:

Lactic acid bacteria
Homopolysaccharides
Heteropolysaccharides
Production
Purification
Methods

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) produce homopolysaccharides (HoPS) and heteropolysaccharides (HePS) with potential functional properties. In this work, we have performed a comparative analysis of production and purification trials of these biopolymers from bacterial culture supernatants. LAB strains belonging to four different genera, both natural as well as recombinant, were used as model systems for the production of HoPS and HePS. Two well characterized strains carrying the *gft* gene were used for β -glucan production, *Pediococcus parvulus* 2.6 (*P. parvulus* 2.6) isolated from cider, and the recombinant strain *Lactococcus lactis* NZ9000[pGTF] (*L. lactis* NZ9000[pGTF]). In addition, another cider isolate, *Lactobacillus suebicus* CUPV225 (*L. suebicus* CUPV225), and *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 (*L. mesenteroides* RTF10), isolated from meat products were included in the study. Chemical analysis of the EPS revealed that *L. mesenteroides* produces a dextran, *L. suebicus* a complex heteropolysaccharide, and the β -glucan producing-strains the expected 2-substituted (1,3)- β -glucan.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many LAB synthesize extracellular polysaccharides (exopolysaccharides, EPS), which remain attached to the outer cell wall forming a capsule or are released into the environment in the form of slimy, or ropy, EPS. These bacteria produce a wide variety of EPS with different composition, structure, molecular mass, and conformation. Most LAB synthesize HePS usually composed of D-galactose, D-glucose, and L-rhamnose. These polysaccharides are produced from sugar nucleotides by the activity of intracellular glycosyltransferases (Welman & Maddox, 2003). Other LAB produce HoPS containing only D-glucose (e.g.: dextran, reuteran, and mutan) or D-fructose (e.g.: levan and inulin) (Monsan et al., 2001). HoPS are usually synthesized by extracellular glycosyltransferases

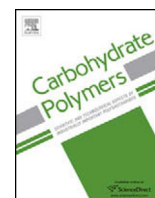
(glucan- or fructan-sucrases) using sucrose as the glycosyl donor. EPS formation by glycosyltransferases has been reported for strains of *Lactobacillus* (Kralj et al., 2004; Tiekling, Korakli, Ehrmann, Ganzle, & Vogel, 2003), *Leuconostoc* (Bounaix et al., 2010; Fraga Vidal et al., 2011; Seymour & Knapp, 1980), and *Weissella* (Galle, Schwab, Arendt, & Gaenzle, 2010) species. LAB strains belonging to the *Pediococcus*, *Lactobacillus*, and *Oenococcus* genera, isolated from cider and wine, produce a 2-substituted (1, 3)- β -D-glucan (Dols-Lafargue et al., 2008; Dueñas-Chasco et al., 1997, 1998; Ibarburu et al., 2007; Llaubères, Richard, Lonvaud, Dubourdiou, & Fournet, 1990). This β -glucan is synthesized in *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus suebicus*, and *Oenococcus oeni* by a single GTF glycosyltransferase, which is a membrane-bound protein that polymerizes glucosyl residues from UDP-glucose (Garai-Ibabe et al., 2010; Velasco et al., 2007; Werning et al., 2006, 2008).

The HePS from LAB play an important role in the rheology, texture and 'mouthfeel' of fermented milks (yoghurt, viili, långfil, etc.) (Welman & Maddox, 2003) and other fermented products, such as sorghum sourdoughs (Galle, Schwab, Arendt, & Gänzle, 2011). HoPS producers have been evaluated to a lesser extent and are used mainly for fermentation of non-dairy products. Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella* spp. as well as levan from *Lactobacillus sanfranciscensis* positively affect dough rheology and

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 837 31 12.

E-mail addresses: sikelia@cib.csic.es (S. Notararigo), montsensv@iata.csic.es (M. Nácher-Vázquez), idoia.ibarburu@ehu.es (I. Ibarburu), mlwerning75@hotmail.com (M.L. Werning), pfpalencia@cib.csic.es (P.F. de Palencia), mariateresa.duenas@ehu.es (M.T. Dueñas), rosa.aznar@uv.es (R. Aznar), plg@cib.csic.es (P. López), aliprieto@cib.csic.es (A. Prieto).

¹ These authors contributed equally to this work.



Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses



Montserrat Nácher-Vázquez^a, Natalia Ballesteros^a, Ángeles Canales^a,
Sylvia Rodríguez Saint-Jean^a, Sara Isabel Pérez-Prieto^a, Alicia Prieto^a, Rosa Aznar^{b,c},
Paloma López^{a,*}

^a Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, C.S.I.C., Agustín Escardino 7, Paterna, 46980 Valencia, Spain

^c Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Doctor Moliner 50, Burjassot, 46100 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2014

Received in revised form 1 February 2015

Accepted 6 February 2015

Available online 21 February 2015

Keywords:

Lactic acid bacteria

Exopolysaccharide

Dextran

Antiviral

Immunostimulants

Salmonid virus

IPNV

IHNV

ABSTRACT

Viral infections in the aquaculture of salmonids can lead to high mortality and substantial economic losses. Thus, there is industrial interest in new molecules active against these viruses. Here we describe the production, purification, and the physicochemical and structural characterization of high molecular weight dextrans synthesized by *Lactobacillus sakei* MN1 and *Leuconostoc mesenteroides* RTF10. The purified dextrans, and commercial dextrans with molecular weights ranging from 10 to 2000 kDa, were assayed in infected BF-2 and EPC fish cell-line monolayers for antiviral activity. Only T2000 and dextrans from MN1 and RTF10 had significant antiviral activity. This was similar to results obtained against infectious pancreatic necrosis virus. However the dextran from MN1 showed ten-fold higher activity against hematopoietic necrosis virus than T2000. *In vivo* assays using the MN1 polymer confirmed the *in vitro* results and revealed immunomodulatory activity. These results together with the high levels of dextran production (2 g L^{-1}) by *Lb. sakei* MN1, indicate the compounds potential utility as an antiviral agent in aquaculture.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonid fish viruses cause considerable losses to the aquaculture industry worldwide. Aquabirnaviruses such as the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), and novirhabdoviruses such as infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), cause acute

Abbreviations: BF-2, bluegill fry; CC₅₀, dextran concentration provoking 50% inhibition of cell growth; CDM, defined medium containing 0.8% glucose; CDMS, CDM without glucose and supplemented with 0.8% sucrose; TCID₅₀ mL⁻¹, virus titer infecting 50% of the cell culture; DOSY, diffusion ordered spectroscopy; EC₅₀, dextran concentration reducing the viral cytopathic effect to 50% of control value; EPC, epithelioma papulosum cyprinid; EPS, exopolysaccharide; FBS, fetal bovine serum; HK, head kidney; IHNV, infectious hematopoietic necrosis virus; IPNV, infectious pancreatic necrosis virus; IR, infrared; LAB, lactic acid bacteria; MM, L15 medium with 2% FBS; MOI, multiplicity of infection; MRS, Man Rogosa Sharpe broth; MRSS, MRS medium supplemented with 2% sucrose instead of glucose; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, Phosphate buffered saline; qPCR, quantitative real time PCR polymerase change reaction; RT-qPCR, reverse transcription qPCR; SI, selective index.

* Corresponding author. Tel.: +34 918373112; fax: +34 915360432.

E-mail address: plg@cib.csic.es (P. López).

diseases of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and several species of salmon. The mortalities are inversely proportional to the age of the fish and survivors remain carriers of the virus for long periods. IPNV was the first virus isolated from fish, in 1960, and is considered the most widely distributed aquatic virus (Rodríguez Saint-Jean, Borrego, & Pérez-Prieto, 2003). IHNV was first observed on the west coast of the USA in cultivated sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in 1953, and has been also isolated in Japan and several European and Asian countries (Bootland & Leong, 1999).

The use of existing antivirals against fish viruses has not been investigated in depth due to high product costs and potential toxicity. Alternative antivirals have been proposed such as olive leaf extract (Micol et al., 2005) and milk casein (Rodríguez Saint-Jean et al., 2012). Prevention and control of disease is currently approached in fish farming by the use of immunostimulants such as β -glucans from yeast, fungi or bacterial origin, alone or supplemented with other compounds (for example: mannose, LPS or vitamin C) (Ringø, Olsen, González-Vecino, Wadsworth, & Song, 2012). Thus, alternative antiviral molecules that could block replicating virus in infected individuals are of great interest in the



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.

(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300127955	
Solicitud Número PCT	PCT/ES2014/070464	
Fecha de recepción	05 junio 2014	
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid	
Referencia del expediente del solicitante o mandatario	PCT1641.966	
Solicitante	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes	2	
País	ES	
Título de la invención	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU USO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD ACTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN	
Documentos presentados	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-vlog.xml

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

0	Para uso de la oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No.	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	
0-4	Formulario PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-5	Petición El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PCT1641.966
I	Título de la invención	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU USO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD ACTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	Todos los Estados designados
II-4	Nombre	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)
II-5	Dirección	Serrano n° 117 28006 MADRID España
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-1	Solicitante y/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
III-1-2	Solicitante para	Todos los Estados designados
III-1-4	Nombre	UNIVERSITAT DE VALENCIA
III-1-5	Dirección	Avda. Blasco Ibañez nº 13 46010 VALENCIA España
III-1-6	Estado de nacionalidad	ES
III-1-7	Estado de domicilio	ES
III-2	Solicitante y/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-2-3	Inventor para	
III-2-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	NACHER VAZQUEZ, MONTSERRAT
III-2-5	Dirección	Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España
III-3	Solicitante y/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-3-3	Inventor para	
III-3-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	LOPEZ GARCIA, PALOMA
III-3-5	Dirección	Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España
III-4	Solicitante y/o inventor	
III-4-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-4-3	Inventor para	
III-4-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PRIETO ORZANO, ALICIA
III-4-5	Dirección	Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España
III-5	Solicitante y/o inventor	
III-5-1	Esta persona es:	Inventor únicamente
III-5-3	Inventor para	
III-5-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PEREZ PRIETO, SARA ISABEL
III-5-5	Dirección	Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-6 III-6-1 III-6-3 III-6-4 III-6-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELLIDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente RODRIGUEZ SAINT-JEAN, SYLVIA Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España
III-7 III-7-1 III-7-3 III-7-4 III-7-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELLIDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente MOHEDANO BONILLA, MARIA DE LA LUZ Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) C/ RAMIRO DE MAEZTU, 9 28040 Madrid España
III-8 III-8-1 III-8-3 III-8-4 III-8-5	Solicitante y/o inventor Esta persona es: Inventor para Nombre (APELLIDOS, Nombre) Dirección	Inventor únicamente AZNAR NOVELLA, ROSA UNIVERSITAT DE VALENCIA Avda. Blasco Ibañez nº 13 46010 Valencia España
IV-1 III-1-1 III-1-2 III-1-3 III-1-4 III-1-5 III-1-5(a)	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como: Nombre (APELLIDOS, Nombre) Dirección No. de teléfono No. de facsímil Correo electrónico Autorización a utilizar el correo-e) Se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar esta dirección de correo-e para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean:	Mandatario PONS ARIÑO, ANGEL Glorieta Rubén Darío, 4 28010 Madrid España 91 700 7600 91 308 6103 patentes@pons.es por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel)

Chapter 22

c0110

Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides

Adrian Pérez-Ramos, Montserrat Nacher-Vazquez, Sara Notararigo, Paloma López and M^a Luz Mohedano
Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

s0010

1 INTRODUCTION

p0015

The exopolysaccharides (EPS) are heterogeneous long-chain polymers, which are synthesized and released mainly by bacteria and microalgae into their surroundings during growth (Sutherland, 1972). These polymers can form an adherent cohesive layer around the cell surface, when they are called capsular polysaccharides, or can be excreted outside the cell wall when they are called exocellular polysaccharides (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilan, 2005).

p0020

Although the biological function of EPS in the microorganisms is not clear, they nevertheless have been exploited as bio-thickeners in the food industry of dietary products. EPS produced mainly by lactic acid bacteria (LAB) have food applications, as viscosifying agents, stabilizers, emulsifiers, gelling agents, or water-binding agents as well as health applications such as reduction of cholesterol levels, reduction of formation of pathogenic biofilms, modulation of adhesion to epithelial cells, and a prebiotic effect by increasing levels of bifidobacteria in the intestinal tract (Patel and Prajapati, 2013).

p0025

When it was demonstrated that they also play an important role as modulators of the gut microbiota, and the immune system, as anti-carcinogenic agents and antioxidants, their use was extended to the functional food formula to promote the host's benefits. Currently, research interest in bacterial EPS is growing owing to the chemical properties that these polymers exhibit. Indeed their exploitation in pharmaceutical products, medical devices, and cosmetics is becoming a new trend to replace traditional hydrocolloid production (Freitas et al., 2011).

p0030

These aspects constitute an important field of research that could lead to the production of fermented functional foods which benefit human and animal health. Therefore, in this chapter, in addition to describing the nature, origin, and structure of bacterial EPS, we review the current knowledge concerning the functional properties of EPS. We also describe their actual usages and future potential applications to improve rheology of fermented food and for developing of functional food for humans and animals.

s0015

2 CLASSIFICATION OF EXOPOLYSACCHARIDES

p0035

EPS consist of linear or branched, repeating units of sugar or sugar derivatives. These sugar units are mainly glucose, galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetyl galactosamine, rhamnose and *L*-fucose, in variable ratios, sometimes with other inorganic and organic residues such as phosphate, sulfate, succinate, acetate, pyruvate, and glycerol (Finore et al., 2014; Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilan, 2005).

p0040

EPS from microbial sources can be classified, based on their monosaccharide composition and biosynthetic pathways into two groups: homopolysaccharides (HoPS) and heteropolysaccharides (HePS). The HoPS contain a single type of monosaccharide, *D*-glucose or *D*-fructose joined by either a single linkage type (e.g. 1,2 or 1,4) or by a combination of a limited number of linkage types (e.g. 1,2 and 1,4). The HePS comprise repeating units of different monosaccharides and they vary in number from tri- to octa-saccharides. They possess a variety of two or more different types of monosaccharides and frequently have a range of different linkage patterns. The HePS may also contain nonsugar molecules.

p0045

The HoPS usually display high molecular masses (up to 10⁷ Da), many of them are synthesized by LAB and can be classified into four groups: α -*D*-glucans, β -*D*-glucans, β -*D*-fructans and others, like polygalactan (De Vuyst and Degeest, 1999). According to the linkages in the main chain, the α -*D*-glucans are subdivided into dextrans (α -1,6), mutans (α -1,3), glucans (α -1,2), reuterans (α -1,4), alternans, (α -1,3), and α -(1,6).

APLICACIONES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS EN LA CALIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS

MONTERRAT NÁCHER VÁZQUEZ^{1,2}, IDOIA IBARBURU LÓPEZ³, SARA NOTARARIGO¹, PILAR FERNÁNDEZ DE PALENCIA DELGADO¹, ROSA AZNAR NOVELLA^{2,4}, M^a TERESA DUEÑAS CHASCO³, PALOMA LÓPEZ GARCÍA¹

¹Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España.

²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC. Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, España.

³Departamento de Química Aplicada. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizábal 3, 20018 Donostia, España.

⁴Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, España.

5D.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen una gran importancia industrial como bacterias iniciadoras o coadyuvantes en la producción de alimentos fermentados producidos a nivel industrial, tales como derivados lácteos, cárnicos fermentados y masas panarias. Así mismo, en alimentos fermentados artesanales producidos a pequeña escala, las poblaciones naturales de BAL dominan el proceso de fermentación confiriendo características singulares al producto. Además, algunas BAL presentan características beneficiosas para la salud (propiedades probióticas) o capacidades metabólicas extraordinarias como son la producción de enzimas (i.e. amilasas, fitasas), vitaminas (i.e. folatos, riboflavina) o exopolisacáridos (EPS), de especial interés para la industria agroalimentaria y para la formulación de nuevos alimentos funcionales (revisado por Anastasio *et al.*, 2010; Badel *et al.*, 2011; Capozzi *et al.*, 2012). Por otro lado, la capacidad de las BAL para producir bacteriocinas las convierte en candidatos para su aplicación como bioconservantes (ver detalles en el capítulo 5E de este libro).

Muchas de las especies de BAL tienen el *status* de GRAS "Generally Recognized As Safe" según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) o QPS "Qualified Presumption of Safety" según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) lo que facilita su aplicación en alimentos y, por tanto, suscita su interés industrial.

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que, más allá de su valor nutricional básico, ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre ellos se encuentran los alimentos probióticos, que contienen cultivos bacterianos u otros microorganismos no patógenos que después de ser ingeridos ejercen beneficios para la salud y promueven una microbiota intestinal saludable. Muchos de estos alimentos están elaborados con BAL y gozan actualmente de un amplio mercado que se encuentra en continua expansión.

Las BAL con capacidades metabólicas extraordinarias presentan un elevado potencial en la elaboración/formulación de nuevos alimentos funcionales de alto valor añadido (revisado por Zanini *et al.*, 2012). Los estudios actuales sobre su aplicación en funcionalidad de alimentos demuestran que BAL productoras de fitasas pueden mejorar la solubilización de minerales en masas ácidas durante la fermentación panaria (Anastasio *et al.*, 2010) y BAL superproductoras de riboflavina pueden utilizarse para elaborar pan y pasta enriquecidos en vitamina B₂ (revisado por Capozzi *et al.*, 2012). Además, algunas BAL sintetizan EPS que son secretados al medio, mejorando las características sensoriales y tecnológicas de varios productos fermentados, fundamentalmente productos lácteos y los basados en cereales. BAL productoras de heteropolisacáridos (HePS) mejoran la viscosidad y textura de leches fermentadas, tales como yogurt, kéfir y queso con bajo contenido en grasa (revisado por Badel *et al.*, 2011). Algunas cepas de BAL productoras de otro tipo de EPS, los homopolisacáridos (HoPS), mejoran las propiedades viscoelásticas de masas ácidas, que podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores para reducir el uso de hidrocoloides, como aditivos texturizantes, en la elaboración de productos de panadería. Por otro lado, los EPS sintetizados por BAL tienen un gran interés en la industria agroalimentaria dado que se les han atribuido efectos beneficiosos para la salud humana.

