

La aceituna verde de mesa Aloreña como fuente de probióticos y selección de una cepa de *Lactobacillus pentosus* con el mejor potencial probiótico

Beatriz Pérez Montoro¹, Nabil Benomar¹, Leyre Lavilla Lerma¹, María del Carmen Casado Muñoz¹, Marina Hidalgo Pestaña¹, Antonio Gálvez¹ y Hikmate Abriouel¹

¹Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, España, hikmate@ujaen.es

RESUMEN

Las cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de la fermentación natural de la aceituna verde de mesa Aloreña mostraron un gran potencial como probióticos ya que fueron capaces de sobrevivir a bajos pHs y altas concentraciones de sales biliares, además dichas cepas mostraron una actividad antimicrobiana frente a muchos patógenos. En este trabajo, hemos analizado en profundidad la capacidad de 9 cepas de *Lb. pentosus* para tolerar las condiciones gastrointestinales simuladas (pH 3.0 y pH 8.0). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *Lb. pentosus* AP2-15N, CF1-39, CF2-10N, CF2-12 y MP-10 mostraron una alta capacidad de supervivencia de 96.96-99.76% después de 3 h de incubación a pH 3.0 y de 92.97-99.80% después de 3 h de incubación a pH 8.0. Por otro lado, los resultados de la capacidad de adherencia de los lactobacilos a las células Caco mostraron que las cepas *Lb. pentosus* AP2-16N, CF1-6 y CF2-10N fueron las más destacables con una capacidad de adherencia de 18-30%. Al analizar todos los datos, la cepa *Lb. pentosus* CF2-10N fue seleccionada como la más adecuada para seguir analizando su potencial probiótico tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palabras clave. Aceituna Aloreña, *Lactobacillus pentosus*, probióticos.

INTRODUCCIÓN

La aceituna de mesa Manzanilla Aloreña es un producto típico de la región de Guadalhorce (Málaga) con Denominación de Origen Protegida (DOP) que resulta de una fermentación espontánea y natural la cual se lleva a cabo por la microbiota indígena (las bacterias del ácido láctico “BAL” y las levaduras) de los frutos. Los lactobacilos aislados de las salmueras de la aceituna Aloreña a lo largo del proceso de fermentación fueron identificados mediante métodos moleculares como *Lactobacillus pentosus* (Abriouel *et al.*, 2012).

Las cepas de *Lb. pentosus* mostraron un potencial probiótico ya que muchas de ellas fueron capaces de sobrevivir a bajos pHs y también en presencia de altas concentraciones de sales biliares (3%) (Abriouel *et al.*, 2012). Además, todos los lactobacilos mostraron una actividad antimicrobiana frente a muchos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella* (Abriouel *et al.*, 2012). En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos de relevancia clínica, los lactobacilos mostraron una resistencia intrínseca a algunos antibióticos pero fueron muy sensibles a otros. Sin embargo, los métodos moleculares revelaron la ausencia de genes de resistencia transferibles.

Teniendo en cuenta estos datos, hemos planteado el siguiente estudio para dilucidar en profundidad la capacidad de tolerancia de los lactobacilos a las condiciones gastrointestinales simuladas y también su capacidad de colonización del intestino como pasos previos para la selección de una cepa con el mejor perfil probiótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una colección de 9 cepas de *Lb. pentosus* aisladas de la fermentación natural de la aceituna verde de mesa Aloreña (Abriouel *et al.*, 2012) fueron seleccionadas en base a sus propiedades probióticas preliminares.

Tolerancia a las condiciones gastrointestinales. Las cepas de *Lb. pentosus* fueron analizadas en cuanto a su tolerancia a las condiciones gastrointestinales simuladas (pH 3.0 y pH 8.0). La determinación de la supervivencia se llevó a cabo de acuerdo con Chen *et al.* (2014).

Adherencia a las líneas celulares Caco. Los lactobacilos seleccionados en base a su tolerancia a las condiciones gastrointestinales simuladas fueron ensayados para determinar su capacidad de adherencia a la línea celular Caco (Enterocyte-like Caco-2 ECACC 86010202) de acuerdo con Lavilla Lerma *et al.* (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a los resultados preliminares de las propiedades probióticas ensayadas *in vitro* (tolerancia a acidez y sales biliares, actividad antimicrobiana), 9 cepas de *Lb. pentosus* fueron seleccionadas para llevar a cabo un análisis en profundidad de su faceta probiótica.

Supervivencia de *Lactobacillus pentosus* bajo condiciones simuladas gastrointestinales. La tasa de supervivencia registrada bajo ambas condiciones gastrointestinales: pH 3.0 (condiciones gástricas) y pH 8.0 (condiciones intestinales) fue altamente dependiente de la cepa de *Lb. pentosus* ensayada (Tablas 1 y 2). Las cepas de *Lb. pentosus* AP2-15N, CF1-39, CF2-10N, CF2-12 y MP-10 mostraron una alta capacidad de supervivencia de 96.96-99.76% después de 3 h de incubación a pH 3.0 (Tabla 1). Resultados similares se obtuvieron bajo condiciones intestinales simuladas a pH 8.0 (Tabla 2). Sin embargo, las cepas *Lb. pentosus* AP2-16N y CF2-5 mostraron una baja tasa de supervivencia de 58.62-65.07% (a pH 3.0) y de 64.24-70.26% (a pH 8.0) en comparación con las demás cepas.

Tabla 1. Supervivencia de los lactobacilos en condiciones gástricas simuladas.

DS: desviación estándar.

<i>Lb. pentosus</i>	TASA DE SUPERVIVENCIA (% ± DS) EN CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS (pH 3.0)		
	1 h	2 h	3 h
	AP2-15N	98,74±0,12	98,36±0,30
AP2-16N	92,19±0,08	78,29±0,58	65,07±0,97
CF1-6	93,11±0,84	84,52±0,25	81,85±0,51
CF1-39	100,86±0,41	100,04±0,37	97,67±0,66
CF2-5	102,76±0,95	75,51±0,99	58,62±0,58
CF2-10N	98,85±0,49	101,06±0,30	98,30±0,35
CF2-12	99,83±0,28	99,91±0,33	99,76±0,14
MP-10	99,90±0,71	99,83±0,46	96,96±0,19
5C2	100,05±0,85	83,19±0,45	77,07±0,10

Tabla 2. Supervivencia de los lactobacilos en condiciones intestinales simuladas.

DS: desviación estándar.

Capacidad de adherencia de *Lactobacillus pentosus* a las células Caco. Los resultados obtenidos demostraron que hay una variabilidad de la capacidad de adherencia a las células Caco dependiendo de la cepa de *Lb. pentosus* ensayada. Las cepas *Lb. pentosus* AP2-16N, CF1-6 y CF2-10N fueron las más destacables mostrando una capacidad de adherencia de 18-30% (Figura 1).

En base a las propiedades funcionales y tecnológicas (Abriouel *et al.*, 2012) y los resultados de la tolerancia a las condiciones gastrointestinales simuladas (pH 3.0 y pH 8.0) así como la capacidad de adherencia a las células Caco obtenidos en este estudio, podemos seleccionar cepas de *Lb. pentosus* con el mejor perfil probiótico.

<i>Lb. pentosus</i>	TASA DE SUPERVIVENCIA (% ± DS) EN CONDICIONES INTESTINALES SIMULADAS (pH 8.0)		
	1 h	2 h	3 h
	AP2-15N	97,69±0,09	96,47±0,18
AP2-16N	64,37±0,22	64,04±0,22	64,24±0,75
CF1-6	79,80±0,13	76,21±0,16	73,61±0,64
CF1-39	100,59±0,51	100,64±0,15	99,57±0,74
CF2-5	66,07±0,09	68,95±0,58	70,26±0,47
CF2-10N	99,81±0,26	99,27±0,17	99,80±0,03
CF2-12	99,61±0,05	99,57±0,06	99,65±0,16
MP-10	94,60±0,60	95,14±1,07	92,97±1,06
5C2	70,71±0,61	73,46±0,26	76,19±0,26

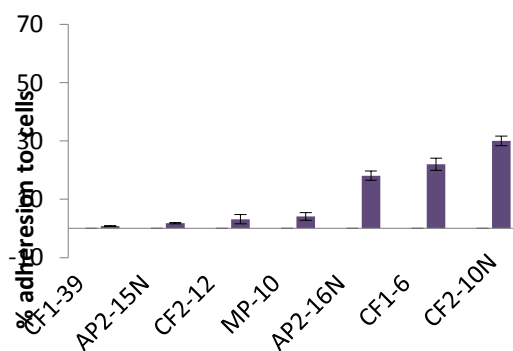


Figura 1. Capacidad de adherencia de las cepas de *Lb. pentosus* a las células Caco.

CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permitió seleccionar la cepa *Lb. pentosus* CF2-10N como la más adecuada para seguir analizando su potencial probiótico tanto *in vitro* como *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos AGL2013-43571-P (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, FEDER) y UJA2014/07/02 (Plan propio de la Universidad de Jaén).

BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology* **32**, 308–316.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., Chen, W., (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and a-glucosidase inhibitory activity. *Food Control* **35**, 65-72.
- Lavilla-Lerma, L., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., (2013). Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **163**, 136–145.